

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE JABOTICABAL - SP**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE
EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE ESPÉCIES
DE *Croton* FRENTE *Staphylococcus aureus*
CAUSADOR DE MASTITE BOVINA**

**Talita Thomaz Nader
Médica veterinária**

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE JABOTICABAL - SP

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE
EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE ESPÉCIES
DE *Croton* FRENTE *Staphylococcus aureus*
CAUSADOR DE MASTITE BOVINA**

Talita Thomaz Nader

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira

Defesa de Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

2014

N135a Nader, Talita Thomaz
Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos e substâncias isoladas de espécies de *Croton* frente *Staphylococcus aureus* causador de mastite bovina / Talita Thomaz Nader. -- Jaboticabal, 2014

xv, 92 p. ; il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Luiz Augusto do Amaral

Co-orientadora: Ana Maria Soares Pereira

Banca examinadora: Lucif Abrao Nascif Junior, Karina Paes Burguer, Fernando Ávila, Elisabeth Pizzolitto, Ana Maria Soares Pereira

Bibliografia

1. Biofilme. 2. *Croton antisiphiliticus*. 3. *Croton urucurana*. 4. Extrato vegetal. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:618.9:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE ESPÉCIES DE *Croton* FRENTE *Staphylococcus aureus* CAUSADOR DE MASTITE BOVINA

AUTORA: TALITA THOMAZ NADER


ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA MARIA SOARES PEREIRA


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ANA MARIA SOARES PEREIRA
Universidade de Ribeirão Preto / Ribeirão Preto/SP


Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. LUCIF ABRÃO NASCIF JUNIOR
Universidade de Franca / Franca/SP


Profa. Dra. ELISABETH LOSHCHAGIN PIZZOLITTO
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Data da realização: 30 de janeiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TALITA THOMAZ NADER - Nascida aos 19 de junho de 1979, em Ribeirão Preto - SP, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia - MG, em julho de 2003. Durante a graduação realizou estágios em diversas áreas. Em 2005 iniciou o curso de Especialização em Homeopatia Veterinária, no Instituto Homeopático François Lamasson (IHFL), Ribeirão Preto - SP, concluído em 2008. Durante o ano de 2007 fez estágio no Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto - SP. Em março de 2008 ingressou no programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal - SP, onde desenvolveu o projeto de pesquisa como bolsista do CNPq, com auxílio financeiro de pesquisa da FAPESP. O mestrado foi concluído em 2010, cuja dissertação intitulou-se Potencial de atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais do Cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus*. Em janeiro de 2009 ingressou como membro do corpo docente do IHFL, onde permanece atualmente em atividade. Em março de 2010 iniciou o Curso de Doutorado seguindo na mesma área de pesquisa e instituição que realizou o mestrado, também bolsista do CNPq, com auxílio financeiro da FAPESP.

EPÍGRAFE

“Quando você se compromete profundamente com o que está fazendo, quando suas ações lhe são agradáveis e, ao mesmo tempo, úteis para os outros, quando não se cansa ao buscar a doce satisfação de sua vida e de seu trabalho, então está fazendo aquilo para o que nasceu.”

Gary Zukav

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus grandes amores...

Que tiveram toda a compreensão, paciência e carinho necessários para que eu
pudesse concluir este ciclo.

Meu marido Bruno e meus filhos Isabel e Miguel, gratidão por vocês
escolherem compartilhar comigo esta existência e despertar o que há de
melhor em mim: o amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pelas possibilidades diárias de realização e evolução, pela saúde do corpo e da alma que me oferece condição de trabalhar e aprender. Por me permitir encontrar pessoas tão especiais nesta caminhada, pois sem elas não seria possível.

Ao meu querido orientador prof. Luiz Augusto do Amaral pela confiança, pelos exemplos de respeito, humildade e generosidade, e por ser uma dessas pessoas especiais que ocupa um lugar eterno em nossos corações.

Agradeço imensamente a minha coorientadora profa. Ana Maria Soares Pereira, que me acolheu prontamente com muita atenção e carinho. Pela sua dedicação, amizade, paciência e compreensão nos momentos de dificuldade. Mas, acima de tudo, por compartilhar ensinamentos tão nobres que transcenderam os resultados deste trabalho e alimentaram a minha alma.

À Juliana Coppede (Juju) por me ouvir, ajudar, apoiar, ensinar e por me abraçar. Por tornar o meu dia a dia mais alegre e colorido.

À Poliana Melo, pelo auxílio, atenção e estímulo, sempre que necessário.

Aos funcionários e professores do Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, pelo convívio agradável, pelos ensinamentos e pela colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao meu Pai, por eu estar aqui, pelo exemplo do exercício profissional e por me apresentar este universo acadêmico que hoje me encanta.

À minha Mãe, por eu estar aqui, pelo acolhimento de sempre, pelo exemplo de garra e pela ajuda de todo momento, cuidando dos meus filhos e viabilizando a realização deste trabalho.

À minha irmã Tatiana, pela amizade, cumplicidade e presença eterna.

Aos meus sobrinhos Nina, Chico e Dora, que enchem o meu coração e a minha casa de alegria.

Ao meu marido Bruno, pelo apoio, companheirismo, carinho e por permanecer amorosamente ao meu lado.

E minha eterna e maior gratidão aos meus filhos, Isabel e Miguel, que despertam em mim o verdadeiro amor, e me fazem refletir diariamente sobre o que é essencial e o que vale a pena!

SUMÁRIO

Assunto	Página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	Xii
LISTA DE FIGURAS.....	Xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	Xvi
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Plantas Medicinais.....	19
2.2. Cerrado.....	22
2.2.1. <i>Croton</i>	22
2.2.1.1. <i>Croton antisiphiliticus</i>	23
2.2.1.2. <i>Croton urucurana</i>	24
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> : agente etiológico da mastite bovina.....	25
2.4. Tratamento e controle da mastite bovina.....	29
2.5. Saúde Pública.....	31
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Geral.....	34
3.2. Específicos.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Coleta das espécies vegetais.....	35
4.2. Obtenção dos extratos brutos.....	36
4.3. Padronização de solubilização dos extratos vegetais.....	38
4.4. Obtenção dos microrganismos.....	39
4.5. Avaliação da atividade antibacteriana em célula livre.....	40
4.6. Produção de biofilme <i>in vitro</i>	41
4.7. Avaliação da atividade antibacteriana em biofilme.....	42
4.7.1. Cristal Violeta (CV).....	43
4.7.2. Contagem de unidades formadora de colônia (UFC)	43

4.8. Fitoquímica das espécies alvo.....	45
4.8.1. Cromatografia em coluna (CC).....	45
4.8.2. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).....	46
4.8.3. Placas preparativas de camada delgada.....	47
4.8.4. Cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrômetro de massa (EM) – (CG/EM).....	48
4.8.5. Bioautografia.....	49
4.9. Dosagens dos tratamentos.....	51
4.10. Microscopia eletrônica por varredura.....	52
4.11. Local de realização do trabalho.....	53
4.12. Análise estatística.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1. Determinação da MIC dos antibióticos.....	55
5.2. Células livres.....	56
5.3. Biofilme.....	58
5.3.1. Cristal Violeta.....	58
5.3.2. Contagem de unidades formadoras de colônia.....	62
5.4. Avaliação fitoquímica.....	64
5.4.1. Cromatografia em coluna.....	64
5.4.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa.....	65
5.4.3. Bioautografia.....	66
5.4.4. Cromatografia em camada delgada.....	67
5.5. Microscopia eletrônica por varredura.....	71
6. CONCLUSÃO.....	73
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
8. REFERENCIAS.....	75
ANEXO 1. Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa da fração hexano/acetato de <i>Croton antisiphiliticus</i>	86
ANEXO 2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa da fração acetato de <i>Croton urucurana</i>	89

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE EXTRATO E SUBSTÂNCIAS
ISOLADAS DE ESPÉCIES DE *Croton* FRENTE *Staphylococcus aureus*
CAUSADOR DE MASTITE BOVINA**

RESUMO - O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial de atividade antimicrobiana de extratos vegetais e substâncias isoladas de *Croton antisiphiliticus* e *C. urucurana*, espécies nativas do Cerrado, sobre estirpes de *Staphylococcus aureus*, isoladas de leite de vacas com mastite. Os microrganismos foram cultivados na forma livre e em biofilme. Os extratos foram avaliados quanto à capacidade de inibição da formação do biofilme e erradicação do mesmo. Foram utilizados os antibióticos sulfato de gentamicina como comparativo e sulfato de vancomicina como controle negativo. As plantas foram coletadas na época seca e chuvosa. A quantificação da atividade antimicrobiana foi realizada por meio do cristal violeta e da contagem de unidades formadoras de colônia. Os resultados obtidos demonstram que ambas espécies vegetais inibiram a formação do biofilme de *S. aureus*. O extrato bruto e frações de *C. antisiphiliticus* apresentaram atividade antimicrobiana semelhante à gentamicina, enquanto os compostos vegetais com características apolares, oriundos de *C. urucurana* foram significativamente mais ativos contra *S. aureus* em biofilme que o antibiótico vancomicina, reduzindo cerca de 5 logs da população bacteriana. Nas condições ensaiadas, não houve influência sazonal na atividade antimicrobiana dos extratos. Entre as duas espécies de *Croton* avaliadas, conclui-se que *C. urucurana* foi a espécie mais promissora quanto a atividade antimicrobiana frente estirpes de *S. aureus*, causadoras de mastite bovina.

Palavras-chave: Biofilme, *Croton antisiphiliticus*, *Croton urucurana*, Extrato vegetal.

**IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF EXTRACTS AND SUBSTANCES
ISOLATED OF ESPECIES *Croton* AGAINST
Staphylococcus aureus CAUSING BOVINE MATITIS**

ABSTRACT - The present study aimed to evaluate the potential antimicrobial activity of plant extracts and substances isolated from *Croton antisiphiliticus* and *C. urucurana*, species in the Cerrado, against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. The microorganisms were grown in free form and in biofilm. The extracts were evaluated for their ability to inhibit biofilm formation and eradication. We used the antibiotic gentamicin as a comparison and vancomycin as negative control. The plants were collected in the dry and rainy season. Quantification of antimicrobial activity was performed using the crystal violet and count of colony forming units. The results show that both species inhibited the biofilm formation of *S. aureus*. The crude extract and fractions of *C. antisiphiliticus* presented antimicrobial activity similar to gentamicin, while the plant compounds with non polar characteristics, arising from *C. urucurana* were significantly more active in cells in biofilms of *S. aureus* than the antibiotic vancomycin, reducing around 5 logs of the bacterial population. In the conditions tested, there was no seasonal influence on antimicrobial activity of the extracts. Between the two species of *Croton* evaluated, between the two *Croton* species evaluated, it is concluded that *C. urucurana* was the most promising antimicrobial activity against strains of *S. aureus* causing bovine mastitis.

Key words: Biofilm, *Croton antisiphiliticus*, *Croton urucurana*, Plant extract.

LISTA DE TABELAS	Página
1. Determinação da concentração inibitória mínima da vancomicina, sobre células livres e em biofilme de <i>S. aureus</i> , sob diferentes métodos.....	55
2. MIC dos extratos de <i>Croton antisiphiliticus</i> e <i>C. urucurana</i> , preparados nas épocas chuvosa e seca, na concentração de 5 mg.mL ⁻¹ , sobre células livres de <i>Staphylococcus aureus</i> , em comparação com gentamicina e vancomicina, expressos em porcentagem.....	57
3. MBIC dos extratos de <i>Croton antisiphiliticus</i> e <i>C. urucurana</i> , na concentração de 5 mg.mL ⁻¹ , preparados a partir de coletas na época chuvosa e seca, na formação de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> , por meio do CV, em comparação com gentamicina e vancomicina, expressos em porcentagem.....	59
4. MBEC dos extratos de <i>Croton antisiphiliticus</i> e <i>C. urucurana</i> (5 mg.mL ⁻¹), preparados a partir de coletas na época chuvosa e seca, bem como diterpeno isolado a partir de <i>C. antisiphiliticus</i> (250 µg.mL ⁻¹), frente <i>Staphylococcus aureus</i> em biofilme, por meio do CV, em comparação com gentamicina e vancomicina, expressos em porcentagem.....	61
5. MBEC dos extratos de <i>Croton antisiphiliticus</i> , <i>C. urucurana</i> (5 mg.mL ⁻¹) e diterpeno isolado de <i>C. antisiphiliticus</i> (250 µg.mL ⁻¹), frente <i>Staphylococcus aureus</i> em biofilme, por meio da UFC.mL ⁻¹ , em comparação com gentamicina e vancomicina, expressos em escala logarítmica.....	63
6. MBEC das frações de <i>Croton antisiphiliticus</i> e <i>C. urucurana</i> obtidas por cromatografia em coluna, frente <i>S. aureus</i> em biofilme, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias. Resultados expressos em escala logarítmica.....	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Espécime de <i>Croton antisiphiliticus</i>	23
2. Espécime de <i>Croton urucurana</i>	24
3. Fluxograma de coleta de material vegetal.....	35
4. A. Folha e Raiz de <i>Croton antisiphiliticus</i> coletadas no município de Araxá – MG. B. Casca e entrecasca de <i>Croton urucurana</i> coletadas no município de Jardinópolis – SP.....	36
5. Secagem em estufa de caule e entrecasca, e folhas de <i>Croton urucurana</i>	37
6. A. Rotaevaporação. B. Extrato clorofórmico da raiz de <i>Croton antisiphiliticus</i>	37
7. Extratos solubilizados com DMSO e Tween 80 (2,5%). 1.Extrato aquoso. 2.Extrato hexano. 3.Extrato clorofórmio. 4.Extrato metanol.....	38
8. Determinação da concentração inibitória mínima em células livres utilizando cloreto de trifeniltetrazólico (TTC). A coloração avermelhada indica presença de células bacterianas viáveis.....	40
9. Ácido ent-kaur-16-en-18-óico, isolado a partir de raízes de <i>Croton antisiphiliticus</i> (PEREIRA et al, 2012).....	42
10. Visualização do Cristal Violeta indicando ausência (poços claros) e presença de biomassa bacteriana (poços corados).....	43
11. Unidades formadoras de colônia por meio da técnica de gotejamento.....	44
12. Cromatografia em coluna do extrato da raiz de <i>Croton antisiphiliticus</i>	46
13. Cromatoplaça revelada com vanilina sulfúrica.....	47
14. Raspagem da placa de sílica para recuperação de substância isolada.....	48

15. Bioautografia para avaliação da atividade das frações vegetais frente <i>S. aureus</i> livre.....	49
16. Fluxograma de purificação de extratos e frações de <i>Croton antisiphiliticus</i>	50
17. Fluxograma de purificação de extratos e frações de <i>Croton urucurana</i>	51
18. Fluxograma das dosagens utilizadas no experimento dos compostos vegetais e antibióticos.....	52
19. Cupons de aço inoxidável utilizados para aderência de biofilme de <i>S. aureus</i>	53
20. Poços contendo cupons de aço para aderência bacteriana em placa de microtitulação.....	53
21. Frações de <i>Croton urucurana</i> obtidas por meio da cromatografia em coluna.....	64
22. Bioautografia das frações CAN1 e CUR3 apresentando halos de inibição na multiplicação de <i>S. aureus</i> livre.....	67
23. Placa cromatográfica de fração CUR3 com 8 bandas, indicadas pelas setas.....	67
24. Cromatograma da fração CUR3.4 de <i>Croton urucurana</i> , emitido por CG.....	68
25. Cromatograma da fração CUR3.5 de <i>Croton urucurana</i> , emitido por CG.....	69
26. Cromatograma da fração CUR3.7 de <i>Croton urucurana</i> , emitido por CG.....	69
27. Placa preparativa revelada com vanilina sulfúrica e luz ultravioleta, indicando a separação entre as frações CUR3.7A e CUR3.7B de <i>Croton urucurana</i>	70
28. Atividade das subfrações e substâncias isoladas de <i>Croton urucurana</i> na redução da UFC.mL ⁻¹ de <i>S. aureus</i> em biofilme. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott Knott ($\alpha=0,05$).....	71

29. Eletromiografias dos tratamentos sob o biofilme de *S. aureus*, aderido em cupons de aço, obtidas por microscopia eletrônica por varredura. A. Fração de *C. antisiphyliticus* CAN1. B. Fração de *C. urucurana* CUR3. C. Subfração de *C. urucurana* CUR3.4/5. D. Subfração de *C. urucurana* CUR3.7. E. Vancomicina. F. Controle do inoculo livre de tratamento..... 72

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
BHI.....	Brain Heart Infusion
CAN.....	Fração oriunda do extrato vegetal de <i>Croton antisiphiliticus</i>
CBM.....	Concentração Bactericida Mínima
CC.....	Cromatografia em coluna
CCD.....	Camada delgada comparativa
CCDC.....	Cromatografia em camada delgada comparativa
CG.....	Cromatografia gasosa
CG/EM.....	Cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massa
CTI.....	Centro de terapia intensiva
CUR.....	Fração oriunda do extrato vegetal de <i>Croton urucurana</i>
CV.....	Cristal violeta
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
Log.....	Logarítmico
MBEC.....	Concentração mínima de erradicação do biofilme
MBIC.....	Concentração mínima de inibição do biofilme
MEV.....	Microscopia eletrônica por varredura
MIC.....	Concentração inibitória mínima
MRSA.....	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a metilicina
TTC.....	Cloreto de trifeniltetrazóico
UFC.....	Unidades formadoras de colônia
UI.....	Unidade de internação
VISA.....	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária a vancomicina
VRSA.....	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a vancomicina

1. INTRODUÇÃO

O uso de extratos vegetais com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. A Organização Mundial da Saúde estima que grande parte da população do planeta utiliza de algum modo, plantas medicinais como medicamentos.

A capacidade terapêutica dos compostos vegetais é atribuída à síntese de substâncias químicas que participam dos mecanismos de defesa da planta, denominadas metabólitos secundários. Há diversos fatores que podem influenciar na produção dessas substâncias químicas e como consequência, na ação terapêutica da planta.

Em medicina veterinária, os extratos vegetais de plantas ou substâncias ativas vêm sendo utilizados para tratamentos de parasitoses e enfermidades infecciosas, inclusive em tratamentos de mastite bovina.

A mastite, processo inflamatório da glândula mamária, é classificada de acordo com a forma de apresentação, podendo ser clínica ou subclínica. *Staphylococcus aureus* destaca-se como o principal agente etiológico da mastite contagiosa e importante microrganismo na epidemiologia de doenças veiculadas por alimentos, devido a sua alta prevalência e produção de toxinas termorresistentes causadoras de intoxicações alimentares no ser humano.

O tratamento da mastite bovina é convencionalmente realizado com antibioticoterapia. Além do uso ostensivo e inadequado que proporciona pressão seletiva para resistência bacteriana a diversos princípios ativos, as características do microrganismo envolvido também podem interferir no sucesso terapêutico.

Staphylococcus aureus possui estirpes capazes de produzir biofilmes que favorecem a elevada resistência aos antimicrobianos disponíveis no mercado. Estudos utilizando extratos vegetais com atividade antibiofilme apresentaram resultados notáveis.

Além da dificuldade de controlar a mastite, enfermidade de grande impacto econômico e epidemiológico, os tratamentos atualmente disponíveis acarretam sérios prejuízos ao consumidor, à indústria e ao rebanho, devido ao risco da presença de resíduos de antibióticos no produto final.

Considerando a riqueza da flora do Cerrado que apresenta espécies com comprovada atividade antimicrobiana justificou-se o desenvolvimento deste projeto, que objetivou identificar fitocomplexos ou substâncias puras em espécies de *Croton* capazes de minimizar os agravos relacionados à resistência bacteriana, principalmente pela formação de biofilme por *Staphylococcus aureus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plantas Medicinais

O uso de extratos vegetais com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Segundo Garcia (1995), a Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população do planeta utiliza plantas medicinais de forma terapêutica, envolvendo a utilização de cerca de 25.000 espécies.

Nos anos 80, o desenvolvimento da pesquisa científica resultou na identificação de 121 compostos de origem vegetal, sendo que no período de 1983 a 1994, 6% dos medicamentos aprovados originaram-se diretamente de espécies vegetais, 24% foram oriundos de produtos derivados e 9% foram desenvolvidos pela modelagem molecular, sendo que as estruturas moleculares dos compostos serviram como precursores de processos de sínteses químicas. Metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em metabólitos secundários de origem vegetal (ALVES, 2001). Estudo mais recente estima que 50% dos fármacos empregados para o tratamento de infecções são de origem natural ou semissintética e 19,4% dos medicamentos sintéticos são baseados em protótipos de produtos naturais (PRETTO, 2005). Em contrapartida, pesquisas no Brasil ainda são incipientes, tanto para avaliação do uso seguro de plantas medicinais, como também no controle da comercialização (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005). Segundo Amorim et al. (2003), apenas 8% das espécies vegetais brasileiras foram estudadas em busca de moléculas bioativas.

A identificação de novos compostos presentes nas plantas busca ampliar os recursos tecnológicos nacionais em diversos setores: através da redução de possíveis efeitos indesejados que algumas substâncias químicas sintéticas podem provocar por meio da diminuição da resistência bacteriana, e minimizando os custos no desenvolvimento de medicamentos (AVANCINI, WIEST e MUNDSTOCK, 2000).

O potencial de fornecimento de novas substâncias pelas plantas deve-se à incrível capacidade desses organismos em biossintetizar os mais variados tipos de

estruturas moleculares. Dentre os diversos constituintes químicos, as propriedades terapêuticas estão especialmente relacionadas aos chamados metabólitos secundários, que são compostos micromoleculares evolutivamente selecionados para conferir vantagens adaptativas às plantas. Essas substâncias são formadas por vários caminhos biossintéticos e produzem moléculas dotadas de grande diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais. Participam dos mecanismos de defesa desenvolvidos para a sobrevivência do vegetal, atuando diretamente sobre agentes patogênicos, predadores e também polinizadores (SALISBURY e ROSS, 1992).

Os terpenóides representam a segunda maior classe de metabólitos secundários com maior número de constituintes ativos e são encontrados em abundância nas plantas superiores. Encontram-se subdivididos em classes (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos) e são caracterizados por composição molecular do tipo C_5H_{10} , denominada unidade isopreno. São ativos contra diversos microorganismos e apresentam atividade bactericida. Embora seu mecanismo de ação não esteja completamente elucidado, é provável que envolva a ruptura da membrana celular da bactéria por compostos lipofílicos (COWANN, 1999; ARANTES et al., 2005).

Há uma série de fatores que podem influenciar no conteúdo dos metabólitos secundários das plantas, tais como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, ciclo circadiano, radiação ultravioleta, altitude, disponibilidade de nutrientes, exposição a patógenos, interações e adaptações co-evolutivas do ecossistema envolvido, dentre outros. Assim, a época em que uma planta é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante (ALVES, 2001; GOBBO - NETO e LOPES, 2007).

Nader (2010) observou variação da concentração inibitória mínima (MIC) de extratos clorofórmicos oriundos de duas coletas da raiz de *Croton antispyhiliticus* em épocas diferentes, sobre estirpes de *Staphylococcus aureus*.

Bara et al. (2006) enfatizaram a necessidade da realização de análises para determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais e análises de identidade e pureza de plantas, pois a utilização de extratos padronizados centrados

em grupos específicos de princípios ativos com homogeneidade química do produto, pode contribuir para melhoria da qualidade das matérias-primas vegetais e conseqüentemente dos medicamentos futuramente elaborados (CALIXTO, 2000; CAPASSO et al., 2000).

Em medicina veterinária, também há a utilização de plantas medicinais ou de substâncias ativas. Em comunidades rurais o emprego de plantas medicinais para tratamento de animais sempre se fez presente. De acordo com Silva et al. (2013), das 52 famílias de um assentamento rural no Estado do Rio de Janeiro, 63,5% tratam seus animais com plantas medicinais. Em um questionário aplicado aos discentes de medicina veterinária do Estado do Rio Grande do Norte, 73,9% conhecem a fitoterapia, dos quais 36,2 % usaram-na e obtiveram resultados eficazes (ALMEIDA, FREITAS e PEREIRA, 2006). Profissionais adeptos à fitoterapia também revelam alta frequência de sucessos em tratamento de parasitoses e enfermidades infecciosas, inclusive em tratamentos de mastite bovina (COSTA, 1998).

Mitidiero (2012) avaliou os aspectos sanitários e de produção de uma bovinocultura leiteira na qual os animais eram tratados apenas com homeopatia, bioterápicos e fitoterapia e concluiu que em relação à mastite, foi viável realizar o controle sanitário em um rebanho leiteiro de alta produção pelo uso destas terapêuticas em substituição aos medicamentos alopáticos, com redução nos custos de produção, sem comprometer o desempenho produtivo e sem os riscos da contaminação do leite por resíduos.

Schuch (2008) avaliou a atividade antisséptica e desinfetante de extratos vegetais e decoctos das espécies *Baccharis trimera*, *Bidens pilosa*, *Eucalyptus sp.*, *Polygonum hidropiper* e *Tagetes minuta* frente *Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus spp.*, e *Pseudomonas aeruginosas*, causadores de mastite bovina e concluiu que os extratos vegetais apresentaram atividade antibacteriana, com destaque para a espécie *Eucalyptus sp.*, que inativou todos os microrganismos avaliados.

2.2. Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, considerado um complexo vegetacional de grande heterogeneidade em plantas nativas, ocupa 23% do território nacional que corresponde a dois milhões de km² (RIBEIRO e WALTER, 1998). Segundo estudo, restam intactos apenas 20% do bioma original (ALHO, 2005). O Cerrado está classificado como área *hotspots*, que são regiões com pelo menos 1.500 espécies endêmicas de plantas e que tenham perdido mais de 3/4 de sua vegetação original (MYERS et al, 2000). Lembrando que os recursos naturais uma vez extintos, não estarão disponíveis às futuras gerações, nota-se grande carência de ações voltadas para a identificação e preservação de plantas do Cerrado com potencial terapêutico.

Dentre a vasta diversidade vegetal existente neste bioma, no presente estudo, duas plantas comumente encontradas foram selecionadas para investigação quanto ao potencial de atividade antibacteriana *in vitro* e composição química: *Croton antisiphiliticus* e *Croton urucurana*.

2.2.1. *Croton*

O gênero *Croton* é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae, com cerca de 1.200 espécies, amplamente distribuídos em regiões de clima tropical de todo o globo (GOVAERTS, FRODIN e RADCLIFFE-SMITH, 2000). Apresentam-se na forma de subarbustos, arbustos ou árvores, folhas sempre inteiras, flores com pétalas vilosas ao longo das margens, com tricomas longos, sementes globosas, subglobosas a elipsoides (CARUZO e CORDEIRO, 2007). Extratos ou infusões de diferentes partes de plantas pertencentes a este gênero são utilizados tradicionalmente como remédios no tratamento de ferimentos infectados (CHEN, CAI e PHILLIPSON, 1994; ESMERALDINO, SOUZA E SAMPAIO, 2005, FENNER et al., 2006).

2.2.1.1. *Croton antisiphiliticus*

Croton antisiphiliticus Mart. é conhecido popularmente como Pé-de-perdiz (Figura 1). Suas folhas frescas são utilizadas no tratamento de lesões de pele de etiologia fúngica, e no Estado de Minas Gerais é utilizado pela população como cicatrizante (RODRIGUES, CARVALHO E GOMES, 2002; FENNER et al., 2006).

Segundo Nader (2010), o extrato clorofórmico de *Croton antisiphiliticus*, na concentração de 5 mg.mL⁻¹, apresentou destacada atividade bactericida *in vitro*, inibindo a multiplicação de todas as estirpes avaliadas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de leite de animais com mastite e de fontes de contaminação consideradas fatores de risco para a ocorrência da doença. Os resultados foram superiores aos obtidos com o antibiótico sulfato de gentamicina (30 mg.mL⁻¹) utilizado no estudo.

Um estudo fitoquímico do extrato clorofórmico de raiz de *Croton antisiphiliticus* demonstrou que o ácido ent-kaur-16-en-18-oic foi isolado como componente majoritário e apresentou atividade antibacteriana frente *S. aureus*, com MIC de 250 µg.mL⁻¹ (PEREIRA et al., 2012). O ácido karionoico isolado a partir de *Aralia continentalis* também teve efeito inibitório na formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* (JEONG et al., 2013).



Figura 1. Espécime de *Croton antisiphiliticus*.

2.2.1.2. *Croton urucurana*

Croton urucurana Baill. apresenta-se na forma arbórea podendo atingir de 6 a 8 metros de altura, com copa aberta e tronco claro (Figura 2). Suas folhas têm a forma de coração e as flores são pequenas e esbranquiçadas, dispostas em inflorescências espigadas terminais. Quando seu tronco é cortado ou ferido, elimina uma seiva que em contato com o ar se torna resinosa e adquire a cor vermelha como sangue. Fato que originou alguns de seus nomes populares como Sangra D'água e Sangue de Dragão (LORENZI e MATOS, 2002). Comumente encontrada em mata ciliar e em terrenos úmidos e pantanosos de quase todo o Brasil, ocorrendo especialmente na região amazônica e no Cerrado. São empregadas medicinalmente pela população para tratamento de feridas, como anti-inflamatório, cicatrizante e antirreumático (LORENZI e MATOS, 2002; MILO et al., 2002).



Figura 2. Espécime de *Croton urucurana*.

Uma pesquisa realizada com substâncias isoladas e frações do extrato etanólico de *C. urucurana* identificou a substância ácido acetil aleuritólico como

sendo a mais ativa contra *S.aureus* e *Salmonella* (PERES et al., 1997). Ensaio preliminares quanto à atividade antibacteriana da planta demonstraram que a fração hexânica de *Croton urucurana* inibiu consideravelmente a multiplicação da bactéria Gram positiva *Enterococcus faecalis* (ZUCHINALLI, 2009). Simionatto et al. (2007) observaram que o óleo essencial de *C. urucurana* foi ativo sobre *Staphylococcus aureus* com MIC de 2,5 mg.mL⁻¹. O látex extraído de *C. urucurana* também apresentou atividade, com MIC inferior a 1 mg.mL⁻¹, sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, tais como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* e *Proteus mirabilis* (SILVA JUNIOR et al., 2009).

Em estudos fitoquímicos também foram isolados e identificados diterpenos, classificados como clerodanos (que contêm dois anéis cíclicos com uma cadeia lateral), na espécie vegetal *Croton urucurana*, porém não foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana (PERES et al., 1998; PIZZOLATTI et al., 2013).

2.3. *Staphylococcus aureus*: agente etiológico da mastite bovina

A mastite bovina é um processo de caráter principalmente infeccioso, na qual está envolvida uma série de microrganismos, comumente bactérias, com predominância dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 1996; LANGONI, 2007).

É caracterizada por um processo inflamatório da glândula mamária e classificada de acordo com a forma de apresentação, podendo ser clínica ou subclínica (IDF, 1987).

Na mastite bovina clínica evidenciam-se alterações físicas do úbere como edema, dor e hiperemia, e o animal acometido pode apresentar febre e anorexia. Também ocorrem alterações no leite, caracterizadas por aspecto aquoso, presença de grumos e pus (PIANTA, 1997).

A forma subclínica não apresenta sinais clínicos, as alterações ocorrem na composição do leite, sendo possível o isolamento do microrganismo patogênico a partir deste (BRAMLEY e DODD, 1984). Esta evolui para a forma clínica da

enfermidade, ou tem remissão espontânea, ou ainda pode persistir subclínicamente, o que ocorre na maioria dos quartos mamários acometidos. Deste modo, a mastite subclínica, apresenta grande impacto na produtividade dos animais, já que sua prevalência é maior quando comparada à manifestação na forma clínica (PHILPOT, 1998).

O gênero *Staphylococcus*, comumente envolvido na etiologia da enfermidade, pertence à família Staphylococcaceae. São bactérias Gram positivas, imóveis, agrupadas em massas irregulares ou em forma de cachos de uva, aeróbias ou anaeróbias facultativas e catalase positiva, ou seja, decompõem o peróxido de hidrogênio (KONEMAN e ALLEN, 2008). *Staphylococcus aureus* são coagulase positiva, β -hemolíticos e fermentadores de manitol. Apesar de classificados como microrganismos mesófilos, demonstram multiplicação em temperaturas entre 7 e 47,8°C (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

As células de *Staphylococcus aureus* apresentam alguns componentes de superfícies e produzem várias substâncias extracelulares que contribuem para a sua virulência. Dentre elas destacam-se os ácidos teicóicos, proteína A, adesinas, hemolisinas e outras enzimas que contribuem para a sua aderência, efeitos antifagocitários, lesão plaquetária e reações histamínicas. Tais fatores de virulência estão relacionados à sua patogenicidade, e são mediados por genes plasmidiais. Assim, o microrganismo utiliza-se de diversas estratégias para sobrepujar as defesas microambientais do hospedeiro infectado (PEREIRA e SIQUEIRA JUNIOR, 1995; BANNERMAN, 2003).

A capacidade deste gênero em formar biofilmes em tecidos infectados é mais um fator de virulência que protege o microrganismo. De acordo com Costerton Stewart e Greenberg (1999), os biofilmes são constituídos de bactérias aderidas a qualquer superfície (biótica ou abiótica), envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos. Contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, que formam uma espécie de crosta, sob a qual os microrganismos continuam a se multiplicar. Desta forma, nos biofilmes os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes físicos e químicos, como os produtos utilizados nos procedimentos de higienização (MARQUES et al., 2007).

Adicionalmente, os biofilmes apresentam características de desenvolvimento

e traços fenotípicos únicos, quando comparados com as mesmas células presentes em culturas planctônicas, que os tornam 10 a 1000 vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos e fatores imunes do hospedeiro (DAVEY e O'TOOLE, 2000; ZANIN et al., 2006).

Várias espécies de *Staphylococcus* apresentam capacidade de formar biofilme (CHOKR et al., 2005). Melo (2008) revelou que 85% a 98,9% das estirpes de *S. aureus* isoladas de mastite bovina subclínica, foram fenotipicamente e genotipicamente produtoras de biofilme. Nos animais produtores de leite os biofilmes podem ser formados na glândula mamária das fêmeas acometidas e também nas tubulações e equipamentos envolvidos no processo de obtenção e processamento do leite. De acordo com Arcuri (2000), na cadeia de produção de alimentos, há uma correlação positiva entre a falha nos procedimentos de higiene e a formação destes filmes bacterianos.

Pesquisas recentes têm demonstrado resultados significativos na inibição da formação do biofilme ou redução da biomassa utilizando extratos vegetais e substâncias isoladas. Freire et al. (2009) concluíram que os extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Syzygium cumini* (jambolão) apresentaram efetiva ação antibacteriana nos biofilmes formados de *Staphylococcus* spp. isolados da cavidade bucal de indivíduos submetidos à terapia com antibióticos por tempo prolongado para o tratamento da tuberculose pulmonar. O farnesol, álcool de origem vegetal, apresentou atividade no biofilme de *Staphylococcus epidermidis*, indicando um sinergismo quando associado com antibióticos convencionalmente utilizados (GOMES, 2010). Saising et al. (2012) verificaram excelente atividade do extrato etanólico de *Rhodomyrtus tomentosa* (murta peluda) e substância isolada na prevenção da formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*, bem como, diminuiu significativamente a multiplicação celular em biofilme, com desempenho superior a vancomicina. Cobrado et al. (2012) constataram que a substância hamamelitannin, obtida a partir de extrato de *Hamamelis virginiana* (hamamelis), reduziu significativamente a atividade metabólica das células de *Staphylococcus aureus* em biofilme e concluíram que inibidores microbianos de origem vegetal podem se tornar uma ferramenta terapêutica promissora.

Algumas espécies de *Croton* também apresentaram atividade antibiofilme. Segundo Carneiro et al. (2011), um diterpeno isolado a partir de extrato etanólico de *Croton nepetaefolius* inibiu consideravelmente a formação de biofilme de *S. aureus*, mesmo não demonstrando atividade inibitória frente a bactéria cultivada na forma planctônica. Este mesmo diterpeno, denominado Casbano, também apresentou atividade inibitória na formação do biofilme de espécies de *Streptococcus* da mucosa oral (SÁ et al., 2012).

Assim, os fatores de virulência do *Staphylococcus aureus* afetam diretamente a condição de resposta do sistema imunológico do hospedeiro e a atuação de antibacterianos, tornando a infecção persistente. Na glândula mamária, a cronicidade da infecção danifica o epitélio secretor da glândula, prejudica a produção leiteira e dificulta o processo de cura (SABOUR et al., 2004).

Outro aspecto importante na patogenicidade do *Staphylococcus aureus* é a produção de toxinas no alimento contaminado, podendo, pela sua ingestão, provocar intoxicações mesmo na ausência do processo infeccioso. As enterotoxinas estafilocócicas são produzidas entre 10 e 46°C, e apresentam elevada resistência térmica, podendo persistir no alimento cozido e no leite pasteurizado (SMITH, BUCHANAN e PALUMBO, 1983).

A contaminação microbiana do leite pode ocorrer por duas vias principais: pela incorporação de microrganismos que estão presentes no úbere, diretamente para o leite; ou pelo contato do leite com utensílios e equipamentos contaminados durante as operações de ordenha ou da coleta e armazenamento (FEHLHABER e JANESTSCHKE, 1995). Neste último caso, deve-se ressaltar a importância do ser humano como reservatório e veiculador do *S. aureus* (JAY, 1994).

Embora existam variações nas taxas de isolamento conforme autor e região, *Staphylococcus aureus* está entre os microrganismos mais prevalentes mundialmente nos rebanhos leiteiros. Martins, Silva e Nakazato (2010) avaliaram 279 amostras de leite provenientes de quartos mamários mastíticos na região de Cuiabá (MT) e a bactéria *S. aureus* foi a mais prevalente, presente em 44% das amostras. Um levantamento da mastite bovina e seus agentes etiológicos na região sudoeste do Paraná verificou uma prevalência de até 81,9% da doença nos rebanhos analisados, sendo *S. aureus* o microrganismo mais prevalente (MELLO et

al., 2012). Na região sul do Estado do Rio Grande do Sul, dentre um grupo de animais positivos para *Staphylococcus* coagulase positivo, 85,7% corresponderam ao *S. aureus* (BANDEIRA et al., 2013).

Em síntese, a bactéria *Staphylococcus aureus* destaca-se como o microrganismo causador de mastite contagiosa de maior importância, de maior ocorrência nos rebanhos mundiais, e de tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antibióticos.

2.4. Tratamento e controle da mastite bovina

Usualmente, o tratamento da mastite infecciosa é realizado mediante a administração de antimicrobianos, entretanto o alto custo e a resistência bacteriana dificultam este processo (NETO et al., 2012).

Dentre os *Staphylococcus* spp. isolados por Fontana et al. (2010), a gentamicina foi o antibiótico mais eficiente (78,4%). Os isolados de *S. aureus* mostraram 100% de resistência à oxacilina, penicilina e ampicilina, sendo o gene da β -lactamase encontrado em 90,3% das amostras.

Um levantamento realizado nos estabelecimentos agropecuários da região de Uberlândia (MG) constatou que dentre os medicamentos vendidos com a finalidade de tratamento de mastite bovina, 50% eram à base de sulfato de gentamicina, 28,47% de cefalosporinas e 14,28% de penicilinas, sendo que todos os medicamentos foram vendidos sem prescrição veterinária, ou seja, comprados diretamente no balcão pelo produtor rural, e na maioria das vezes a escolha do medicamento foi feita com base na opinião do vendedor (BRANCO, DIAS e LIMA-RIBEIRO, 2012). A gentamicina é um antibiótico (pertencente à classe dos aminoglicosídeos) com atividade bactericida, muito utilizado em medicina veterinária e inibi a síntese proteica nos ribossomos das bactérias sensíveis (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2006).

Estudos de atividade bacteriana *in vitro* de extratos vegetais sobre agentes da mastite bovina vêm sendo realizados, pois há a necessidade de se descobrir novos compostos que sejam eficazes para o controle e tratamento da doença. As soluções aquosa e alcoólica de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e o extrato de *Mimosa*

tenuiflora (jurema preta) inibiram a multiplicação *in vitro* de *S. aureus* (SOUZA e CONCEIÇÃO, 2007; BEZERRA et al., 2009). Do mesmo modo, Loguercio et al. (2006) constataram que 94,4% dos *Staphylococcus* sp. e 85,2% dos *Streptococcus* sp., isolados de leite de animais com mastite, foram sensíveis à própolis.

Saeki, Peixoto e Matsumoto (2011) detectaram uma prevalência do agente *S. aureus* em 60,32% dos 62 animais diagnosticados com mastite bovina, com um perfil de 100% de sensibilidade à gentamicina e 92,10% ao extrato de própolis.

Além da terapêutica adequada para o controle efetivo da mastite bovina faz-se necessário o conhecimento sobre os microrganismos e suas interações com a glândula mamária, meio ambiente e sistema produtivo (MOTA, 2008).

Um ponto crítico no controle da mastite bovina causada por *S. aureus* é a presença do agente em diversos pontos da cadeia produtiva do leite, como os equipamentos e fômites utilizados na obtenção e processamento do leite, mãos, fossas nasais e garganta do ordenhador, sendo consideradas importantes fontes de infecção (ZENI, 2012). A possibilidade da utilização de produtos naturais como antissépticos e sanitizantes no sistema de obtenção do leite pode melhorar a qualidade da ordenha (higiênico-sanitárias), contribuindo significativamente no controle desta enfermidade.

Mitidiero (2012) concluiu que o controle sanitário em um rebanho leiteiro de alta produção pode ser feito pela utilização da homeopatia, bioterápicos e fitoterapia em substituição aos medicamentos alopáticos, com redução nos custos de produção, sem comprometer o desempenho produtivo e sem os riscos da contaminação do leite por resíduos. Schuch (2008) determinou como positiva a atividade antisséptica e desinfetante de algumas plantas medicinais sobre microrganismos causadores de mastite (*Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Pseudomonas*). Sperotto et al. (2012) observou que o decocto de *Achyrocline satureioides* promoveu a inativação de estirpes de *S. aureus* isoladas de animais com mastite bovina.

2.5. Saúde Pública

Existem diversas implicações à saúde pública envolvendo o agente *Staphylococcus aureus*. Dentre os aspectos mais relevantes estão a resistência bacteriana aos antibióticos, a comercialização de lácteos e derivados contendo resíduo de drogas utilizadas no tratamento das mastites e as intoxicações por meio de veiculação de microrganismos ou toxinas contidas em alimentos contaminados (VASCONCELLOS e ITO, 2011; NETO et al., 2012).

Questões relacionadas à resistência a drogas antimicrobianas têm sido reconhecidas desde o princípio da inserção de antibióticos na terapêutica clínica, favorecendo a permanência e multiplicação de linhagens resistentes. O emprego de diversos antibióticos administrados por diferentes vias e com períodos de tratamento, dosagens e formas de eliminações variáveis propicia o desenvolvimento de microrganismos patogênicos resistentes, bem como a ocorrência de resíduos de antibióticos no leite e derivados (SOUZA e BENEDET, 2000). Os mecanismos pelos quais os genes de resistência se movimentam entre os organismos são complexos e o desenvolvimento de diferentes mecanismos bioquímicos que conferem multirresistencia requer uma grande versatilidade genética (PEREIRA, BARRETO e SIQUEIRA JUNIOR, 1997). Segundo alguns autores, o aparecimento e a dispersão de novas variedades de microrganismos resistentes é o principal problema gerado pelo uso de drogas antimicrobianas nas condições anteriormente descritas (TORTORA et al., 2000; NUNES e D'ANGELINO, 2007). No caso do *S. aureus*, a resistência múltipla é resultado da presença de plasmídeos, mutações cromossômicas, elementos transponíveis, e também da produção de biofilme (HIRAMATSU et al., 2001; MELCHIOR, VAARKAMP e FINK-GREMMELS, 2006).

Coimbra, Coimbra-Filho e Lima (2012) analisaram a prevalência microbiana e os índices de resistência das principais estirpes isoladas de pacientes do Centro de Tratamento Intensivo (CTI) e da Unidade de Internação (UI) de um Hospital Público do Rio de Janeiro, e demonstraram que a prevalência dos *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) foi de 26% na UI e 77% no CTI. Tais dados corroboram Catão et al. (2013), no Estado da Paraíba.

Existem ainda, estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) e com resistência intermediária à vancomicina (VISA) (HOLMES et al., 2012). A vancomicina é um antibiótico glicopeptídeo, que apresenta boa difusão tecidual e excreção renal. Atua inibindo a síntese da membrana celular (peptideoglicano), alterando sua permeabilidade e resultando em lise celular (ESTES e DERENDORF, 2010).

No que diz respeito ao aspecto de segurança alimentar, que tem sido tema científico, político e econômico, os países têm demonstrado uma preocupação com a busca de alternativas mais eficientes para controle e garantia da inocuidade dos alimentos (FLORES, GREGORI e ARAÚJO, 2013).

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite, conseqüente dos tratamentos aplicados no animal em lactação, gera sérios prejuízos não apenas para o consumidor, mas também para a indústria, uma vez que diminui ou inibi a atividade das bactérias lactofermentadoras, minimizando o aproveitamento da matéria-prima (NUNES e D'ANGELINO, 2007). Vieira et al. (2012) detectaram resíduos de antibióticos em 15 das 79 amostras (19%) de leite pasteurizado do tipo B de diferentes fabricantes, adquiridos em estabelecimentos comerciais do Estado do Paraná. No Estado de Santa Catarina foram analisadas embalagens comerciais de 322 amostras de leite tipo C e 62 do tipo longa vida, sendo que em 50% e 52%, respectivamente, detectou-se a presença de antibiótico residual (SOUZA, 1998).

As intoxicações alimentares causadas por *S. aureus* ocasionam sérias conseqüências para a saúde humana. Discute-se ainda a possibilidade de veiculação das toxinas não apenas pelo leite cru contaminado, mas também por produtos lácteos termicamente tratados (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; CUNHA e CUNHA, 2007). Estirpes de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas foram inoculadas em leite UHT (Ultra High Temperature) e submetidas a altas temperaturas e temperaturas oscilantes, e mesmo diante do choque térmico foram capazes de produzir enterotoxinas (CHAPAVAL et al., 2010).

Dentre 200 amostras de leite analisadas em Minas Gerais, 72,5% apresentaram um perfil genotípico de enterotoxigenicidade e de resistência à metilicina, representando um risco potencial à saúde pública (DIAS et al., 2011).

Silva, Bergamini e Oliveira (2010) relataram que dentre os agentes etiológicos isolados de diferentes alimentos suspeitos de causarem toxinfecções alimentares na região de Ribeirão Preto (SP), entre 2005 e 2008, o *S. aureus* foi o mais prevalente, com populações iguais ou maiores que 10^5 UFC.g⁻¹ em produtos de confeitaria e em alimentos à base de carne e cereais.

A simples presença de estirpes toxigênicas de *S. aureus* no leite não provoca, necessariamente, intoxicações em seres humanos, porém o risco existe e é maior para crianças, principalmente de tenra idade. A percepção de risco é aumentada ao se considerar que esse microrganismo é o mais envolvido nas infecções intramamárias e está amplamente disseminado em diversas fontes de infecção como a água, equipamentos de ordenha, tetos dos animais, mãos do ordenhador, equipamentos da indústria e com prevalência de estirpes com elevado potencial toxigênico (SÁ et al., 2004).

Assim, diante dos fatos apresentados, o emprego de novas terapêuticas pode atuar de forma mais eficiente gerando um produto final de melhor qualidade, para beneficiar consumidores, produtores, indústria e meio ambiente. A utilização de espécies vegetais com atividade antimicrobiana e a prospecção de moléculas ativas são uma possibilidade muito promissora. O Brasil, rico em biodiversidade, apresenta espécies vegetais alvo, que poderão compor um medicamento antimicrobiano ou substâncias antissépticas ou sanitizantes que auxiliem na prevenção da mastite bovina.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o potencial de atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos e substâncias isoladas das espécies vegetais *Croton antisyphiliticus* e *C. urucurana*, frente *Staphylococcus aureus* livre e em biofilme, isolados de leite de vacas com mastite.

3.2. Específicos

- Avaliar o perfil de sensibilidade e resistência das estirpes de *Staphylococcus aureus* livre e em biofilme, frente aos antibióticos gentamicina e vancomicina;
- Avaliar a capacidade dos extratos vegetais de inibir a formação do biofilme e de erradicá-lo;
- Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima dos extratos vegetais e das substâncias isoladas, frente *Staphylococcus aureus* livre e em biofilme;
- Purificar e isolar os compostos mais ativos dos extratos vegetais por meio de métodos cromatográficos;
- Avaliar a influência sazonal na atividade antibacteriana dos extratos vegetais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta das espécies vegetais

As coletas foram realizadas em duas épocas distintas, sendo uma coleta no período chuvoso (dezembro/2010) e outra no período seco (agosto/2011) (Figura 3). Plantas de *Croton antisiphiliticus* foram coletadas na reserva ecológica Ecocerrado, no Município de Araxá – MG e foram utilizadas a raiz e folhas (Figura 4A). Folhas, casca e entrecasca de *Croton urucurana* foram coletadas no Município de Jardinópolis – SP (Figura 4B).

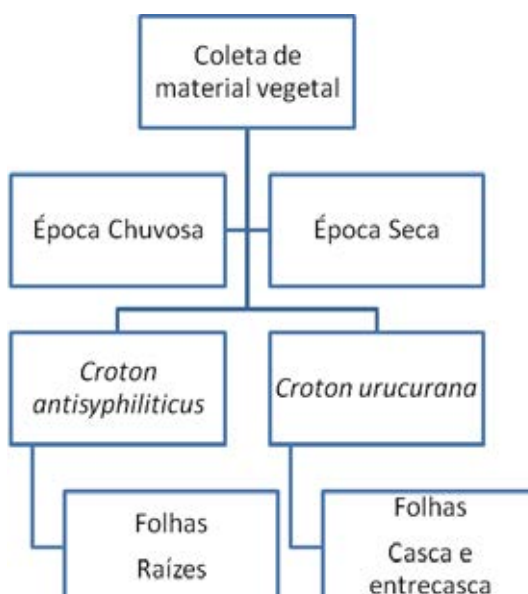


Figura 3. Fluxograma de coleta de material vegetal.

A localização geográfica da coleta da espécie *C. antisiphiliticus* Mart. foi latitude 19°48'53,8", longitude 46°24'18,3" e altitude 1121m. As partes vegetais de *C. urucurana* Baill. foram coletadas na latitude 21°11'55,5", longitude 47°44'08,8" e altitude 566m. Foram realizadas as identificações taxonômicas do material vegetal coletado e as exsicatas (amostra de planta seca, fixada em uma cartolina, acompanhada de uma etiqueta contendo informações sobre o vegetal e o local de coleta) foram depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), identificadas pelos números de voucher 1686 (*C. antisiphiliticus*) e 2558 (*C. urucurana*).

Esse trabalho obteve autorização especial de acesso e de remessa de amostra de componentes do patrimônio genético emitido pelo IBAMA (Processo 02001.005079/2011-41).



Figura 4. A. Folha e Raiz de *Croton antisiphiliticus* coletadas no Município de Araxá – MG. B. Casca e entrecasca de *Croton urucurana* coletadas no Município de Jardinópolis – SP.

4.2. Obtenção dos extratos brutos

As partes vegetais coletadas foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 50°C (Figura 5), e em seguida, moídas em moinho de facas tipo Willey (Marconi®). O material resultante da moagem foi peneirado para padronização da granulometria (48 mesh).



Figura 5. Secagem em estufa de caule, entrecasca e folhas de *Croton urucurana*.

Para a preparação dos extratos, o material vegetal seco foi pesado e misturado aos solventes orgânicos com diferentes polaridades: hexano, clorofórmio e metanol, na proporção 1:10 (P/V). Esta mistura permaneceu em processo de maceração estática, em temperatura ambiente, com homogeneização periódica, por dez dias. Posteriormente, a solução planta e solvente foi filtrada em papel filtro Whatman n°1 e rotaevaporados para concentração dos extratos (Figura 6A e B).

O extrato aquoso foi preparado a partir de infusão do pó vegetal em água fervente por 1 hora, seguida de filtração, na mesma proporção descrita (P/V). O extrato obtido foi congelado, liofilizado e estocado sob temperatura de refrigeração.

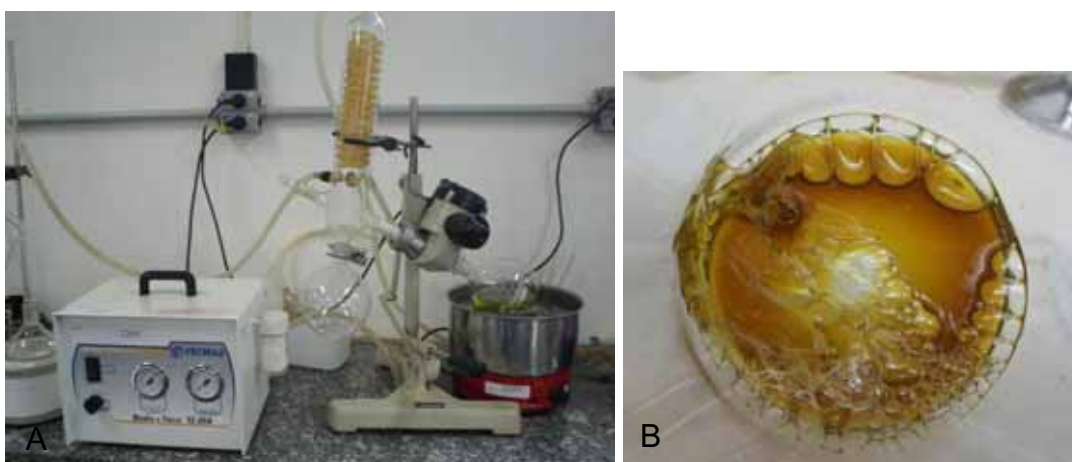


Figura 6. A. Rotaevaporação. B. Extrato clorofórmico da raiz de *Croton antispyhiliticus*.

4.3. Padronização de solubilização dos extratos vegetais

Considerando a diversidade da composição química e características dos extratos foi necessário padronizar a solubilização deste material.

O extrato aquoso foi solubilizado em água destilada autoclavada. Os extratos clorofórmico, hexânico e metanólico foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), homogeneizados em vórtex, seguido da adição de Tween 80, ambos na concentração de 2,5% (Figura 7). Todo o processo de solubilização dos extratos ocorreu em fluxo laminar, em temperatura ambiente. Todos os extratos foram preparados na concentração de 10 mg.mL^{-1} .

O DMSO é um solvente polar muito utilizado e o Tween 80 é um polissorbato hidrofílico com propriedades surfactante e emulsionante (detergente).



Figura 7. Extratos solubilizados com DMSO e Tween 80 (2,5%).
1.Extrato aquoso. 2.Extrato hexano. 3.Extrato clorofórmio.
4.Extrato metanol.

Os extratos hexânico e metanólico oriundos da raiz de *C. antisiphiliticus*, bem como os extratos metanólico da casca e hexânico da folha de *C. urucurana* não solubilizaram totalmente e, portanto foram excluídos do experimento. A constatação da solubilização dos extratos ocorreu por meio da observação visual, na qual os

extratos totalmente solubilizados apresentaram um aspecto homogêneo, enquanto os extratos parcialmente solúveis apresentaram precipitações ou grumos dispersos na solução.

4.4. Obtenção dos microrganismos

As estirpes de *Staphylococcus aureus* utilizadas no experimento foram isoladas de leite de vacas com mastite e caracterizadas como produtoras de biofilme por Melo (2008). De acordo com o autor, a identificação fenotípica da produção do biofilme ocorreu por meio do método Agar Congo Vermelho e a caracterização genotípica deu-se pela expressão gênica de *Ica A* e *Ica D*. Estas estirpes foram cedidas ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Jaboticabal e estocadas em freezer -80°C. A estirpe padrão ATCC 25923 foi utilizada como controle, tanto na forma livre quanto em biofilme.

Para os ensaios em célula livre foram utilizadas 10 estirpes de *Staphylococcus aureus*, enquanto na avaliação em biofilme foram utilizadas 05 estirpes, sendo uma ATCC 25923. Tal diferenciação ocorreu em função de dificuldades encontradas na padronização das técnicas que determinaram a MIC do biofilme e também em razão da limitação na massa de extrato vegetal disponível.

O inóculo de microrganismo (livre de tratamento) foi utilizado como controle positivo, o sulfato de vancomicina (Sigma aldrich®) como controle negativo e o sulfato de gentamicina (Sigma aldrich®) como tratamento comparativo, sendo este último na concentração de 30 mg.mL⁻¹ por ser a apresentação comercial mais utilizada do produto (NADER FILHO et al., 2007; ZAFALON et al., 2007; FONTANA et al., 2010; BRANCO, DIAS e LIMA-RIBEIRO, 2012). Para a utilização do sulfato de vancomicina, como controle negativo, determinou-se a MIC em diferentes condições de multiplicação celular e métodos de detecção da atividade antibacteriana. A literatura determina que a dosagem da vancomicina utilizada para estirpes sensíveis é de 2 µg.mL⁻¹, para resistência intermediária entre 4 µg.mL⁻¹ e 8 µg.mL⁻¹, e para estirpes resistentes 32 µg.mL⁻¹, sendo que a concentração plasmática desejável da droga em seres humanos está em torno de 20 µg.mL⁻¹ (LIU et al., 2011).

4.5. Avaliação da atividade antibacteriana em célula livre

Para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos vegetais e substâncias isoladas em células livres de *S. aureus* foi determinada a concentração inibitória mínima (MIC), por meio do método de microdiluição em placa. A MIC é definida pela menor concentração da substância antimicrobiana capaz de inibir a multiplicação de um isolado bacteriano (CLSI, 2012).

Em placas estéreis de poliestireno com 96 poços em fundo "U" foram adicionados 100 μL por poço de inóculo bacteriano contendo *S. aureus* em meio líquido Brain Heart Infusion (BHI - Himedia[®]) e 100 μL dos extratos em diferentes concentrações (5; 2,5 e 1,25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Foram realizados os controles de inocuidade dos veículos, do extrato vegetal ou substância isolada e do meio de cultura. A escolha pela utilização do meio de cultura BHI em detrimento do meio de cultura Muller Hinton, sugerido pela literatura, ocorreu devido a facilidade de multiplicação e adesão bacteriana observada no meio referido.

A leitura das placas foi realizada visualmente, com adição de 50 μL de cloreto de trifeniltetrazólico (TTC – Sigma aldrich[®]) em cada poço, indicador de multiplicação bacteriana, que apresenta coloração avermelhada na presença de células ativas (Figura 8).

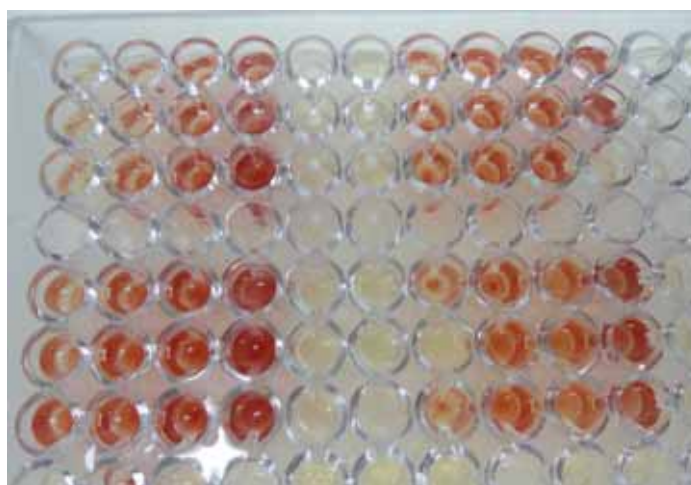


Figura 8. Determinação da concentração inibitória mínima em células livres utilizando cloreto de trifeniltetrazólico (TTC). A coloração avermelhada indica presença de células bacterianas viáveis.

A concentração bactericida mínima (CBM), definida como a menor concentração do antimicrobiano necessária para inviabilizar a célula microbiana, determina a atividade bactericida ou bacteriostática dos compostos vegetais. Quando os resultados da CBM são comparados com os valores da MIC, pode-se avaliar se o composto é bactericida ou bacteriostático (BARON e FINEGOLD, 1990).

Para determinação da CBM, segundo SMITH-PALMER, STEWART e FYFE (1998) com modificações, foi retirada uma alíquota do material contido nos orifícios que demonstraram inibição no desenvolvimento bacteriano por meio do MIC, e semeou-se em placa de Petri estéril contendo ágar BHI. Após incubação em estufa bacteriológica por 24 horas, a 37°C, as culturas foram inspecionadas visualmente e os resultados foram interpretados da seguinte maneira: presença de multiplicação bacteriana indicou ação bacteriostática, e ausência de desenvolvimento do microrganismo sugeriu ação bactericida.

4.6. Produção de biofilme *in vitro*

A metodologia de produção de biofilme *in vitro* foi desenvolvida de acordo com GOMES (2010), com modificações. As estirpes de *S. aureus* produtoras de biofilme foram cultivadas individualmente em ágar BHI a 37°C, e incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica. Colônias foram alçadas e colocadas em meio líquido BHI contendo 2% de glicose. Este inóculo foi padronizado em espectrofotômetro (546nm), correspondendo a 10^5 UFC.mL⁻¹.

Foram adicionados 100 µL da suspensão bacteriana padronizada e 100 µL do meio líquido BHI enriquecido com glicose (2%) nos poços das placas de microtitulação. Após incubação em agitação a 120 rpm, a 37°C, por 24 horas, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de solução salina 0,9% autoclavada para remoção das células não aderidas. O material bacteriano que permanecia nos poços após as lavagens era constituído de células bacterianas aderidas.

4.7. Avaliação da atividade antibacteriana em biofilme

As substâncias podem atuar basicamente de duas formas em relação aos biofilmes: inibindo a sua formação ou atuando sobre o biofilme já formado.

Para a determinação da concentração mínima de inibição do biofilme (MBIC), os extratos vegetais foram adicionados juntamente com o inóculo e incubados a 37°C sob agitação (120 rpm), por 24 horas. Em seguida foi realizado o processo de lavagem (item 4.6. descrito anteriormente), para eliminação de células livres.

Para determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC), formou-se o biofilme por 24 horas sob agitação, os poços foram lavados para eliminar as células em suspensão e em seguida adicionou-se ao meio de cultura os extratos vegetais em diferentes concentrações (5; 2,5 e 1,25 mg.mL⁻¹). A incubação foi realizada por 24 horas (37°C), sob agitação (GOMES, 2010).

A avaliação da atividade antibiofilme foi executada por meio de dois testes: o teste do Cristal Violeta (CV), que mensura a quantidade de biomassa formada (matriz) e a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC.mL⁻¹), que quantifica o número de células que permaneceram aderidas ao biofilme – aplicado apenas para verificar a MBEC.

Além dos extratos preparados neste estudo, também foi avaliado o potencial de erradicação de biofilme de um diterpeno (Figura 9) isolado de raízes de *Croton antisiphiliticus*, por Pereira et al. (2012), na concentração de 250 µg.mL⁻¹.

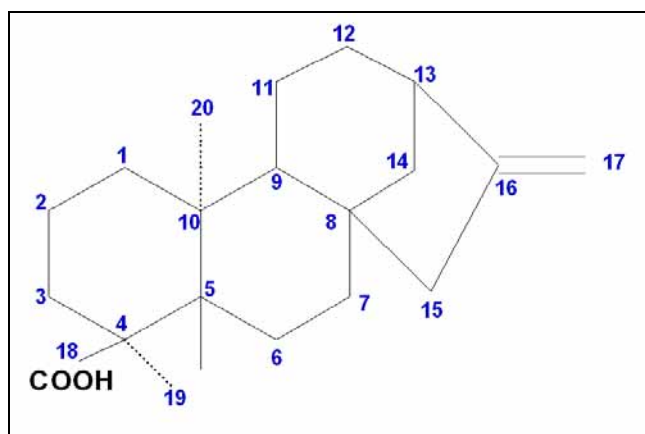


Figura 9. Ácido ent-kaur-16-en-18-óico, isolado a partir de raízes de *Croton antisiphiliticus* (PEREIRA et al, 2012).

4.7.1. Cristal violeta (CV)

A técnica do CV consistiu na lavagem dos poços para remoção das células livres, seguida da adição de 200 µl de metanol para fixação das células aderidas (permanência por 15 minutos), adição de 200 µl do CV (solução Violeta Cristal em meio aquoso Dinamica[®]), lavagem com água destilada e uso de ácido acético a 33% (200 µl) para leitura de densidade óptica do biofilme (GOMES, 2010). O inóculo livre de tratamento foi o controle positivo (100% de aderência). O CV é um corante básico que se liga a moléculas de superfície e polissacarídeos de carga negativa presentes na matriz extracelular (LI, YAN e XU, 2003). Esta técnica tem a propriedade de mensurar a quantidade de biomassa formada (matriz) e não a viabilidade celular. A intensidade da coloração arroxeada varia de acordo com a quantidade de biomassa aderida, ou seja, quanto mais biomassa, mais intensa a coloração (Figura 10).

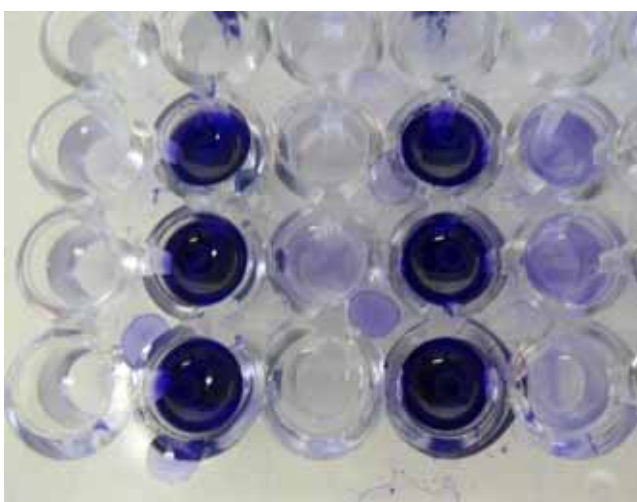


Figura 10. Visualização do Cristal Violeta indicando ausência (poços claros) e presença de biomassa bacteriana (poços corados).

4.7.2. Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

A contagem de unidades formadoras de colônia permite quantificar as células que estão viáveis no biofilme.

Após a formação do biofilme nas placas de microtitulação, os poços foram lavados com solução salina estéril (item 4.6. descrito anteriormente). Em seguida

adicionou-se 200 μL da solução salina para que o conteúdo aderido às paredes do poço fosse raspado, utilizando, individualmente para cada poço, ponteiros estéreis de 200 μL . Após a raspagem, a placa foi submetida a um banho de ultrassom para promover desagregação das células bacterianas (GOMES, 2010). O tempo de exposição ao ultrassom que conferiu maior desagregação sem ocasionar morte celular neste experimento foi padronizado em 8 minutos, na frequência de 40 Hz (Unique[®] Ultrasonic Cleaner). Após homogeneização, uma alíquota de 10 μL da solução contida em cada poço (células bacterianas + solução salina) foi retirada e adicionada em eppendorf, contendo 90 μL de solução salina estéril. A partir desta solução realizou-se a diluição em série em até doze vezes. Então, fez-se o plaqueamento (em triplicata) em placas de Petri de 90 mm contendo ágar BHI, na forma de gotejamento (3 gotas/10 μL cada) e incubou-se por 24 horas a 37°C, para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (Figura 11) (GOMES, 2010).



Figura 11. Unidades formadoras de colônia de *Staphylococcus aureus* por meio da técnica de gotejamento.

4.8. Fitoquímica das espécies alvo

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios antibacterianos foram selecionados os extratos clorofórmio da raiz de *C. antisyphiliticus* (36,5 g) e hexano da casca de *C. urucurana* (15,3 g).

4.8.1. Cromatografia em Coluna (CC)

Consiste em uma técnica de separação cuja fase estacionária ocorre dentro de uma coluna de vidro, preenchida por uma substância adsorvente (sílica). A substância a ser analisada é colocada na parte superior da coluna e o eluente (solvente) é vertido em quantidade suficiente para promover a separação. A coluna possui uma torneira na extremidade inferior por onde elui o líquido contendo as substâncias que são separadas de acordo com a polaridade do solvente. Neste experimento, a coluna medindo 5 cm de diâmetro e 45 cm de altura, foi preenchida com 500 gramas de sílica gel e 1 litro de hexano. Os extratos foram adicionados ao topo da sílica e os solventes hexano, hexano/acetato de etila nas proporções 98:2 e 50:50, acetato de etila, acetato de etila/metanol 50:50 e metanol foram eluidos através da coluna (Figura 12). Ao fim deste processo foram obtidas 9 frações. Posteriormente estas foram solubilizadas em DMSO 2,5% e avaliadas quanto à atividade antibacteriana.



Figura 12. Cromatografia em coluna do extrato da raiz de *Croton antisiphiliticus*.

4.8.2. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

A CCDC é uma técnica de separação rápida para análise qualitativa de extrato bruto e/ou frações semipurificadas. Composta por uma fase móvel líquida que ascende por uma fase fixa, constituída de uma fina camada de adsorvente (sílica) espalhada em uma placa de alumínio ou vidro. Uma pequena quantidade da amostra é colocada na base da placa que é submersa em uma cuba contendo os solventes apropriados, para que as substâncias ascendam ou corram pela placa e, após eluição completa retira-se a cromatoplaça da cuba. Na separação, obtém-se uma série vertical de manchas na placa que podem ser reveladas com uso de luz ultra violeta, vapores de iodo, solução de sulfato cérico, entre outros. Neste experimento, as análises foram feitas em placas de alumínio DC-Fertigfolien ALUGRAM[®] Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel). As revelações das cromatoplaças foram efetuadas com luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 360 nm e também mediante o uso do revelador vanilina sulfúrica (Figura 13).

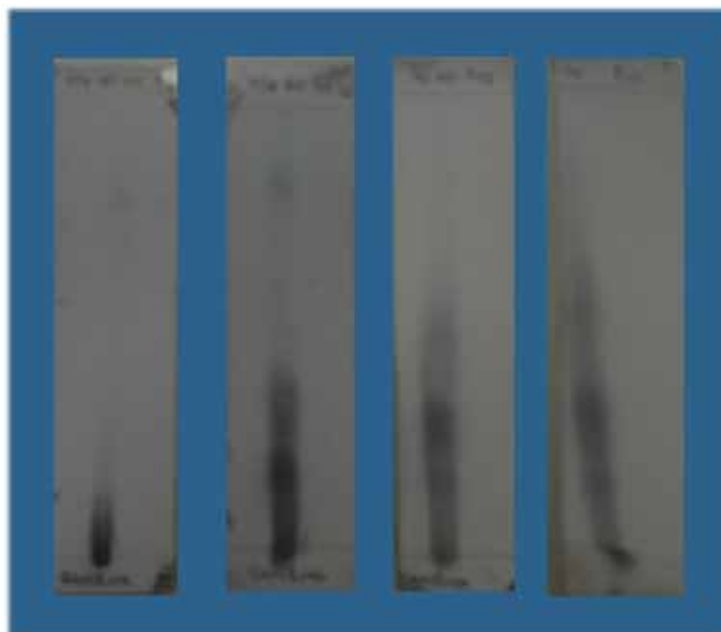


Figura 13. Cromatoplaça revelada com vanilina sulfúrica.

4.8.3. Placas preparativas de Camada Delgada

As placas preparativas de camada delgada permitem separar compostos com diferentes pesos moleculares (DC-Fertigfolien ALUGRAM[®] Xtra SIL G/UV₂₅₄ Macherey-Nagel). As amostras são aplicadas horizontalmente na forma de uma banda ao longo de toda a largura da placa (20 cm) e eluída com solvente orgânico. Uma fração oriunda do extrato de *C. urucurana* foi aplicada em placa preparativa e as diversas bandas obtidas foram raspadas isoladamente e colocadas em frascos separados com solvente, para recuperação da substância adsorvida na sílica (Figura 14). Em seguida, o solvente foi rotaevaporado e as substâncias isoladas foram submetidas à cromatografia gasosa para avaliação do grau de pureza.



Figura 14. Raspagem da placa de sílica para recuperação de substância isolada.

4.8.4. Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a Espectrômetro de Massa (EM) – (CG/EM)

A CG é uma técnica utilizada para separação e análise de misturas de substâncias apolares. A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás denominado de fase móvel ou gás de arraste. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação da mistura. Um dispositivo gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluido e o registro destes sinais forma um cromatograma. As substâncias são registradas na forma de picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa. A EM é um método para identificar os diferentes átomos que compõe uma substância, sendo que a massa e a carga dos íons podem ser medidas por sua posição no espectro, identificando os elementos e isótopos presentes na amostra.

No presente estudo, duas frações oriundas da cromatografia em coluna, que demonstraram atividade antibiofilme significativa, foram submetidas à cromatografia gasosa e o perfil químico das substâncias foi obtido por CG/EM, utilizando-se aparelho Varian 3900 com detector seletivo de massa, modelo Saturn 2100T. As condições de análise foram: Coluna capilar: DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm);

Injetor: 240 °C; Detector: 230 °C; Impacto de Elétrons: 70eV; Gás de arraste: He; Fluxo: 1,0 mL.min⁻¹; Split: 1/20; Programa de Temperatura: 60 °C – 240 °C, 3°C/minuto. Volume de Injeção: 1 µL de solução (1 µL da fração purificada /1mL Hexano).

A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG/EM (Nist 08 lib.e Wiley 7lib).

4.8.5. Bioautografia

É uma cromatografia de camada fina, que utilizando placas de CCD, aplicam-se diversos solventes para eluição. A cromatoplaça, com o extrato vegetal ou fração eluidos, é colocada dentro de uma placa de Petri devidamente esterilizada e verte-se o ágar contendo o inóculo padronizado (Figura 15). Após incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, realiza-se a leitura por meio de um corante adequado que revela o halo de inibição formado. Esta técnica tem como objetivo identificar a banda ou região cromatográfica que apresenta atividade inibitória (SAXENA et al., 1995).



Figura 15. Bioautografia para avaliação da atividade das frações vegetais frente *S. aureus* livre.

Foram analisadas duas frações por bioautografia, advindas de coluna cromatográfica, sendo uma fração hexano/acetato de etila (50:50), oriunda do extrato clorofórmico de *C. antisihpyliticus*, denominada CAN1, e uma fração acetato

de etila proveniente do extrato hexânico de *C. urucurana*, denominada CUR3. Uma solução na concentração de 10mg.mL^{-1} de cada fração foi aplicada na margem inferior de 2 placas cromatográficas de sílica em alumínio, que foram eluídas em hexano/acetato de etila. O corante revelador utilizado neste experimento foi o cloreto de trifeniltetrazóico (TTC – Sigma aldrich®).

Todo o processo de purificação dos extratos, obtenção e avaliação das frações foi esquematizado nas figuras 16 e 17.

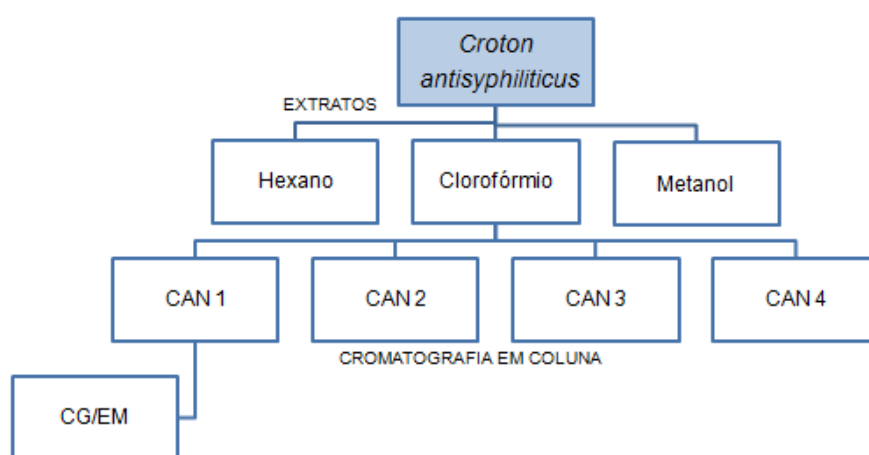


Figura 16. Fluxograma de purificação de extratos e frações de *Croton antisyphiliticus*.

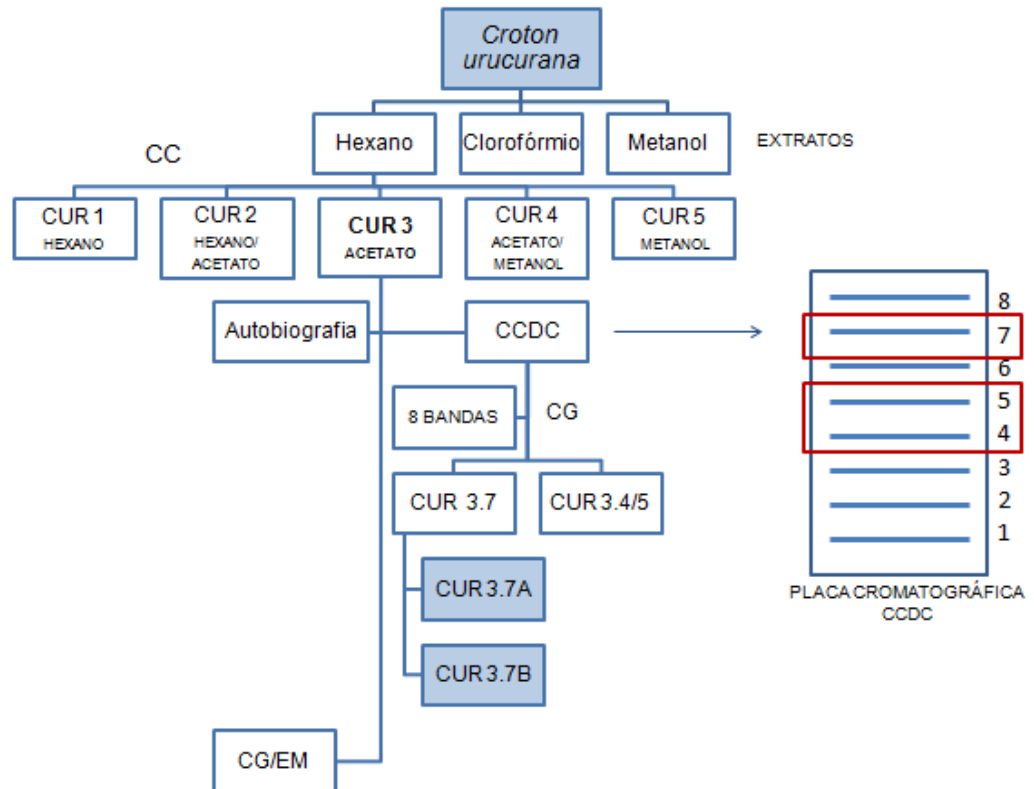


Figura 17. Fluxograma de purificação de extratos e frações de *Croton urucurana*.

4.9. Dosagens dos Tratamentos

As dosagens utilizadas no experimento variaram de acordo com o tratamento. Os extratos brutos, frações, subfrações e substâncias isoladas foram avaliados nas respectivas concentrações de 5 mg.ml^{-1} , $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ e $500 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$. O antibiótico gentamicina foi utilizado na concentração de 30 mg.ml^{-1} , enquanto a vancomicina variou entre 2 a $32 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Figura 18).

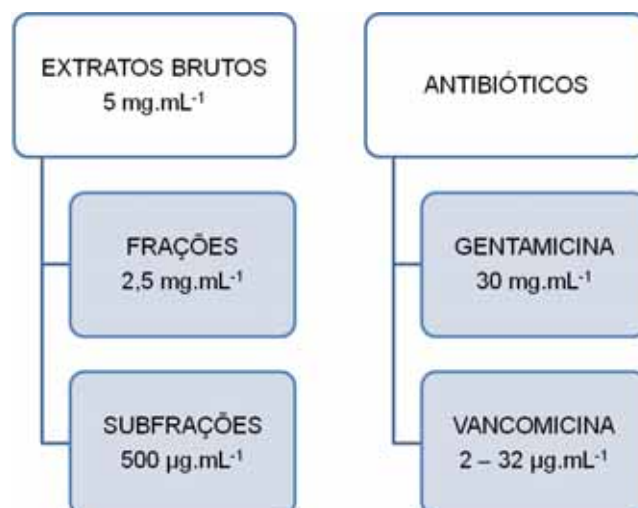


Figura 18. Fluxograma das dosagens utilizadas no experimento dos compostos vegetais e antibióticos.

4.10. Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV)

Para a realização da MEV, biofilmes de *S. aureus* foram aderidos em cupons de aço inoxidável, medindo 5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura (Figura 19 e 20). Neste experimento, o aço inoxidável foi utilizado como superfície de adesão pois os equipamentos e tubulações dos sistemas de obtenção e processamento do leite são constituídos deste material e considerados importantes fontes de infecção na epidemiologia da mastite bovina.

Para a adesão dos biofilmes nos cupons de aço foi utilizada a metodologia descrita para a determinação da concentração inibitória mínima de inibição do biofilme (MBIC) (item 4.7. descrito anteriormente). Foram adicionados aos poços o inóculo padronizado, os tratamentos a serem avaliados e um cupom de aço (previamente esterilizado) em cada poço, seguido de incubação por 24 horas, em agitação (37°C). Os tratamentos avaliados foram as frações, subfrações e o antibiótico vancomicina.

As imagens foram obtidas por meio de um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 5410, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia da Unesp de Jaboticabal.



Figura 19. Cupons de aço inoxidável utilizados para aderência de biofilme de *S. aureus*.

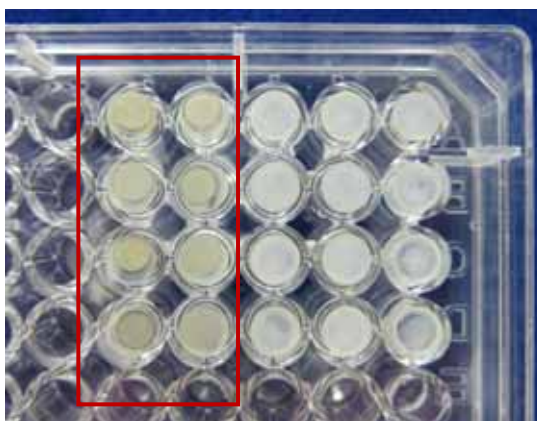


Figura 20. Poços contendo cupons de aço para aderência bacteriana em placa de microtitulação.

Após incubação, os cupons de aço foram fixados em Glutaraldeído 3%, por 48 horas, e lavados em solução tampão de fosfato. Realizou-se a fixação em tetróxido de ósmio a 1%, por 6 horas. Em seguida, ocorreu a desidratação das amostras em série alcoólica (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%) e secagem no secador de ponto crítico (ALVES, 2004). Os stubs foram montados e submetidos à metalização por 120 segundos, para posterior realização das eletromiografias de superfície.

4.11. Local de realização do trabalho

A preparação dos extratos vegetais e avaliação fitoquímica ocorreram no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

Os ensaios com os microrganismos foram executados no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da UNAERP.

4.12. Análise estatística

A análise estatística do experimento foi realizada pelo programa SISVAR, desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras, versão Sisvar 5.1 Build 72 (FERREIRA, 2011). O teste estatístico aplicado foi Scott Knott, para comparação entre as médias obtidas, com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação da MIC dos antibióticos

A MIC do sulfato de vancomicina variou de acordo com a condição de multiplicação celular e com o método de avaliação da atividade antibacteriana. Na cultura de célula livre a dosagem de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi suficiente para eliminar todas as estirpes, enquanto que na inibição do biofilme, a dosagem foi de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em se tratando do biofilme formado (24 horas), a técnica do CV demonstrou que $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de vancomicina foi o suficiente para eliminar 100% da biomassa, porém na UFC a dosagem de $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não foi capaz de eliminar as bactérias aderidas (Tabela 1).

Tabela 1. Determinação da concentração inibitória mínima da vancomicina, sobre células livres e em biofilme de *S. aureus*, sob diferentes métodos.

Concentrações Vancomicina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Célula Livre MIC ⁽¹⁾ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Biofilme		
		MBIC ⁽²⁾ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MBEC/CV ⁽³⁾ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MBEC/UFC.mL ⁻¹⁽⁴⁾ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
32- 2	2	4	8	32*

*Concentração insuficiente para eliminação das estirpes em biofilme

(1) Concentração Inibitória Mínima

(2) Concentração Mínima de Inibição do Biofilme

(3) Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme/ Cristal Violeta

(4) Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme/ Unidades Formadoras de Colônias

O aumento da MIC da vancomicina para inibir as células aderidas justifica-se pela resistência que estas células apresentam ao se multiplicarem no biofilme (DAVEY e O'TOOLE, 2000). A MIC da vancomicina para erradicar biofilmes maduros de *S. aureus* foi 64 a 32.000 vezes maior do que para células planctônicas (REITER, et al., 2012). Coraça-Huber et al. (2012) avaliaram a atividade da vancomicina frente *S. aureus* e determinou MIC de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as células planctônicas e MBEC acima de $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as células aderidas.

De acordo com Peters et al. (2008) existem diferentes métodos, reprodutíveis e aplicáveis, que podem ser utilizados para a quantificação de biofilme bacteriano em placas de microtitulação. A técnica do CV, embora quantifique a biomassa presente, não permite avaliar a presença de células mortas ou vivas. Enquanto que

na UFC desconsidera-se a matriz formada e quantificam-se as células viáveis que permaneceram aderidas no poço (PITTS et al., 2003). Tais peculiaridades justificam as diferenças encontradas entre os resultados das dosagens do sulfato de vancomicina no presente estudo, demonstrando, portanto, a necessidade de utilização de métodos complementares.

A maior concentração da vancomicina avaliada neste experimento foi de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pois é a dosagem máxima recomendada para seres humanos na presença de estirpes resistentes (LIU et al., 2011).

5.2. Células livres

A tabela 2 mostra as médias de atividade antibacteriana dos extratos brutos das duas espécies vegetais, na concentração de 5 mg.mL^{-1} , frente estirpes de *S. aureus* cultivadas na forma livre. Os resultados demonstraram uma variação da atividade inibitória entre 20% e 45% das estirpes, sendo que os antibióticos gentamicina e vancomicina inibiram 100%, caracterizando, portanto, a sensibilidade destas estirpes.

Este perfil de 100% de sensibilidade das estirpes frente ao antibiótico gentamicina foi compatível com o perfil das amostras de *S. aureus* envolvidas na etiologia da mastite bovina, encontrado por Saeki, Peixoto e Matsumoto (2011). Divergindo, porém, dos resultados de Nader (2010), que identificou uma sensibilidade à gentamicina de apenas 25% das estirpes de *S. aureus*, também causadoras de mastite bovina, ressaltando que essas amostras não foram as mesmas utilizadas no presente estudo.

A sensibilidade bacteriana aos antibióticos depende das características genéticas das linhagens e do histórico de exposição terapêutica, sendo que a resistência adquirida tem origem genética e decorre de modificações na estrutura ou no funcionamento da célula bacteriana que bloqueiam a ação dos antimicrobianos (HOEFLER et al., 2006).

Os extratos que atuaram sobre maior número de estirpes foram o extrato clorofórmico de raiz de *C. antispyhiliticus* e hexânico de casca de *C. urucurana*.

Tabela 2. MIC dos extratos de *Croton antisiphiliticus* e *C. urucurana*, preparados nas épocas chuvosa e seca, na concentração de 5 mg.mL⁻¹, sobre células livres de *Staphylococcus aureus*, em comparação com gentamicina e vancomicina, expressos em porcentagem.

Parte vegetal/ Solventes	Atividade inibitória sobre <i>S. aureus</i> livre (%)	
	Chuvosa	Seca
<i>Croton antisiphiliticus</i>		
Raiz/ Água	20 b	-
Raiz/ Clorofórmio	40 b A	45 b A
Folha/ Clorofórmio	20 b	-
Folha/ Hexano	20 b	-
<i>Croton urucurana</i>		
Casca/ Clorofórmio	30 b	-
Casca/ Hexano	30 b A	35 b A
Folha/ Clorofórmio	30 b	-
Gentamicina	100 a	
Vancomicina	100 a	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott Knott ($\alpha=0,05$).

Em relação ao extrato clorofórmico de raiz de *C. antisiphiliticus* verificou-se uma inibição da multiplicação de 45% das estirpes de *S. aureus*, diferindo dos dados apresentados por Nader (2010), que constatou que o mesmo extrato foi capaz de atuar em 100% de *S. aureus*. Tal fato pode ser explicado pela diferenciação entre as estirpes de *S. aureus* utilizadas em ambos experimentos, embora todas estiveram envolvidas na etiologia da mastite bovina, foram isoladas de diferentes propriedades leiteiras, em momentos distintos.

Em comparação com os resultados obtidos por Nader (2010), observa-se que este extrato vegetal apresentou atividade adversa à gentamicina, ou seja, quando avaliado frente estirpes resistentes ao antibiótico, demonstrou mais expressiva atividade inibitória (100%), e quando ensaiado frente estirpes sensíveis, no presente estudo, apresentou atividade antibacteriana reduzida (45%). Sabendo-se que a gentamicina atua na inibição da síntese proteica dos ribossomos das células sensíveis (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2006), é possível que o extrato de *C. antisiphiliticus* possua outro sítio de ação.

A atividade antibacteriana dos extratos de *C. urucurana*, foi em média, em 30% das estirpes. A sensibilidade de *S. aureus* frente aos extratos avaliados corrobora os diversos autores que identificaram a atuação não apenas do extrato, mas também de frações e substâncias isoladas desta planta, na inibição da multiplicação de *S. aureus* (PERES et al., 1997; SIMIONATTO et al., 2007; SILVA JUNIOR et al., 2009).

Nas condições ensaiadas, não foi observada diferença estatística significativa entre a atividade inibitória dos extratos oriundos de coletas na época chuvosa e seca, frente estirpes de *S. aureus* ($p > 0,05$). Tais resultados discordam de Nader (2010), que demonstrou haver diferença na atividade antibacteriana dos extratos provenientes de *C. antisiphiliticus* e de *Baccharis dracunculifolia*, preparados a partir de material vegetal coletado nas épocas chuvosa e seca. Do mesmo modo, Alves (2001) e Gobbo-Neto (2007), consideram a sazonalidade um fator importante que pode interferir na composição dos metabólitos secundários das plantas, e por consequência, na atividade antimicrobiana dos extratos vegetais (SALISBURY e ROSS, 1992). A não variação da atividade antibacteriana dos extratos vegetais encontradas no presente estudo pode estar relacionada à presença de compostos constituintes do vegetal, e que, portanto, não se alteram significativamente com as variações climáticas.

Os extratos metanólicos obtidos das folhas das plantas não foram avaliados quanto à atividade antibacteriana devido à coloração intensa, que causou turvação, dificultando a leitura e a obtenção de resultados confiáveis.

De acordo com a CBM, a atividade dos extratos vegetais foi bactericida.

5.3. Biofilme

5.3.1. Cristal Violeta

Em se tratando da inibição da formação da biomassa, a MBIC dos extratos vegetais (5 mg.mL^{-1}) apresentou uma variação entre 30,48% e 88,89%, enquanto a vancomicina ($4 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) inibiu 100% e a gentamicina (30 mg.mL^{-1}) 85,45% (Tabela 3).

Tabela 3. MBIC dos extratos de *Croton antisiphiliticus* e *C. urucurana*, na concentração de 5 mg.mL⁻¹, preparados a partir de coletas na época chuvosa e seca, na formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*, por meio do CV, em comparação com gentamicina e vancomicina, expressos em porcentagem.

Partes Vegetais/Solvente	MBIC	
	Chuvosa	Seca
<i>Croton antisiphiliticus</i>		
Raiz / Água	30,48 b	-
Raiz / Clorofórmio	87,59 a A	88,55 a A
Folha / Clorofórmio	88,04 a	-
Folha / Hexano	88,89 a	-
<i>Croton urucurana</i>		
Casca / Clorofórmio	85,67 a	-
Casca / Hexano	87,08 a A	88,94 a A
Folha / Clorofórmio	88,08 a	-
Gentamicina 30 mg.mL ⁻¹	85,35 a	
Vancomicina 4 µg.mL ⁻¹	100 a	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott Knott ($\alpha=0,05$).

Com exceção do extrato aquoso de raiz de *C. antisiphiliticus* que apresentou atividade inibitória significativamente inferior (30,48%) ($p<0,05$), os demais extratos avaliados apresentaram MBIC em torno de 87%, não diferindo estatisticamente entre si e também em relação à atividade dos antibióticos ($p>0,05$). Notou-se, portanto, que a atuação destes extratos sobre a biomassa de *S. aureus* foi semelhante aos antibióticos em estudo, fato não observado nos ensaios realizados com células livres. Carneiro et al. (2011) determinou que a atividade inibitória do diterpeno casbano, isolado a partir de *Croton nepetaefolius*, também foi mais relevante no biofilme de *S. aureus* quando comparada às células cultivadas na forma planctônica, corroborando, portanto, os resultados encontrados.

De acordo com Costerton, Stewart e Greenberg (1999), a matriz bacteriana que envolve as células aderidas, é constituída principalmente por polímeros orgânicos, contendo também proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas. Os extratos vegetais, por serem constituídos de diversas substâncias químicas de origem natural, podem apresentar uma ação significativa sobre a estrutura da biomassa bacteriana. Gomes (2010) constatou que o farnesol,

álcool de origem vegetal, destrói a matriz e a estrutura do biofilme, reduzindo a quantidade do exopolissacarídeo, poli-N-acetilglicosamina (PNAG) na matriz do biofilme de *Staphylococcus epidermidis*. O extrato etanólico de *Rhodomyrtus tomentosa* também atuou expressivamente no biofilme de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* (SAISING et al., 2012). É importante ressaltar que a atividade dos antimicrobianos em biofilmes depende do seu peso molecular, da presença de cargas positivas, do coeficiente de permeabilidade e da atividade bactericida (HIDAYAT et al., 2006).

Conforme já observado anteriormente, não houve diferença estatística significativa na MBIC dos extratos preparados a partir de material vegetal coletado na época chuvosa e seca do ano ($p > 0,05$).

Na tabela 4 verifica-se a atuação dos extratos vegetais na erradicação da biomassa formada, por meio do CV, após 24 horas de incubação. A variação da MBEC foi entre 11,29% a 100%, sendo que a gentamicina (30 mg.mL^{-1}) erradicou 13,92% do biofilme formado e a vancomicina 100%, na concentração de $8 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O extrato hexânico de casca de *C. urucurana* (5 mg.mL^{-1}), bem como o diterpeno isolado de *C. antisyphiliticus* ($250 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) destacaram-se com ação significativamente superior à gentamicina, erradicando cerca de 50% e 56% da biomassa bacteriana, respectivamente, porém inferior a vancomicina, que eliminou 100% ($p < 0,05$).

Tabela 4. MBEC dos extratos de *Croton antisiphiliticus* e *C. urucurana* (5 mg.mL⁻¹), preparados a partir de coletas na época chuvosa e seca, bem como diterpeno isolado a partir de *C. antisiphiliticus* (250 µg.mL⁻¹), frente *Staphylococcus aureus* em biofilme, por meio do CV, em comparação com gentamicina e vancomicina, expressos em porcentagem.

Partes Vegetais/Solvente	MBEC	
	Chuvosa	Seca
<i>Croton antisiphiliticus</i>		
Raiz / Água	11,29 d	-
Raiz / Clorofórmio	27,69 c A	28,49 c A
Folha / Clorofórmio	24,38 c	-
Folha / Hexano	19,11 c	-
Diterpeno	56,06 b	
<i>Croton urucurana</i>		
Casca / Clorofórmio	28,69 c	-
Casca / Hexano	49,52 b B	50,03 b B
Folha / Clorofórmio	12,69 d	-
Gentamicina 30 mg.mL ⁻¹		13,92 c
Vancomicina 8 µg.mL ⁻¹		100 a

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott Knott ($\alpha=0,05$).

Segundo PEREIRA et al. (2012), o diterpeno avaliado no presente estudo, denominado ácido ent-kaur-16-en-18-oic, foi isolado como componente majoritário do extrato clorofórmico de *C. antisiphiliticus* e apresentou MIC de 250 µg.mL⁻¹ frente *S. aureus* livre. Pesquisas também identificaram atividade antibiofilme do diterpeno casbano, isolado a partir de outra espécie de *Croton*, denominada *C. nepetaefolius*, frente *S. aureus* e espécies de *Streptococcus* (CARNEIRO et al., 2011; SÁ et al., 2012). Os terpenóides representam a segunda maior classe de metabólitos secundários presentes em plantas, com maior número de constituintes ativos, estes atuam sobre diversos microrganismos e presume-se que a atividade bactericida esteja relacionada à ruptura da membrana celular da bactéria por compostos lipofílicos (COWANN, 1999; ARANTES et al., 2005).

Os extratos hexânico de folhas, clorofórmico de folhas e raiz de *C. antisiphiliticus* e clorofórmico da casca de *C. urucurana* ($p>0,05$) demonstraram atividade MBEC semelhante à gentamicina, enquanto o extrato aquoso de *C.*

antisiphiliticus e clorofórmico de folha de *C. urucurana* foram significativamente inferiores aos demais ($p < 0,5$).

A MBEC dos extratos não variou em função da época de coleta das plantas, coincidindo com os resultados obtidos nos ensaios anteriores.

5.3.2. Contagem de Unidades Formadoras de Colônia

Este método foi utilizado para quantificar as células bacterianas viáveis no biofilme e aplicado aos extratos e substâncias que tiveram atividade destacada na técnica do CV (MBEC). É importante ressaltar que para avaliação da susceptibilidade das bactérias no biofilme, o método da UFC é o mais indicado, pois o CV não detecta a presença de células mortas ou vivas, apenas mensura por meio de espectrofotometria a biomassa formada (PEETERS, NELIS e COENYE, 2008).

A atividade inibitória dos tratamentos na população de *S. aureus* em biofilme foram descritas na Tabela 5. A vancomicina ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e os extratos de *C. antisiphiliticus* e *C. urucurana* (5 mg.mL^{-1}) apresentaram médias estatisticamente semelhantes na redução da população bacteriana, em torno de 4 logarítmicos ($p > 0,05$). Enquanto o diterpeno isolado ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a gentamicina (30 mg.mL^{-1}), apresentaram atividade inferior, reduzindo cerca de 3 logarítmicos da população de *Staphylococcus aureus*. Rose e Poppens (2008) conseguiram uma redução de 1,8 logarítmicos na população de *S. aureus* em biofilme utilizando vancomicina na concentração de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Portanto, nas condições ensaiadas, *S. aureus* em biofilme foram igualmente susceptíveis à vancomicina e aos extratos clorofórmico de raiz de *C. antisiphiliticus* e hexânico de casca de *C. urucurana*. Enquanto a gentamicina e o diterpeno isolado, também reduziram a população bacteriana, porém com atividade inferior aos demais tratamentos ($p < 0,05$).

Tabela 5. MBEC dos extratos de *Croton antisiphiliticus*, *C. urucurana* (5 mg.mL⁻¹) e diterpeno isolado de *C. antisiphiliticus* (250 µg.mL⁻¹), frente *Staphylococcus aureus* em biofilme, por meio da UFC, em comparação com gentamicina e vancomicina, expressos em escala logarítmica.

Tratamentos	Log UFC.mL ⁻¹ (MBEC)	Redução da população bacteriana (Log UFC.mL ⁻¹)
<i>Croton antisiphiliticus</i>	*9,97	*4,57 a
5 mg.mL ⁻¹	**10,45	**4,09 a
<i>Croton urucurana</i>	*10,38	*4,16 a
5 mg.mL ⁻¹	**10,47	**4,07 a
Diterpeno 250 µg.mL ⁻¹	11,42	3,12 b
Gentamicina 30 mg.mL ⁻¹	11,40	3,14 b
Vancomicina 32 µg.mL ⁻¹	9,94	4,6 a
Controle***	14,54	0 c

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott Knott ($\alpha=0,05$). *seca; **chuvas; ***estirpes livre de tratamentos.

Os resultados obtidos no presente trabalho concordam com GOMES (2010), que constatou que o farnesol, álcool de origem vegetal, possui ação semelhante aos antibióticos utilizados no estudo, frente estirpes de *Staphylococcus epidermidis* em biofilme. Freire et al. (2009), utilizando o extrato glicólico de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), também conseguiram uma redução de 3,95 logarítmicos na população de *S. aureus* em biofilme, isolados da cavidade bucal de indivíduos submetidos à antibioticoterapia prolongada.

Até o presente momento, não há relatos na literatura da atividade antibacteriana de extratos e substâncias isoladas de *C. antisiphiliticus* e *C. urucurana*, frente a células bacterianas em biofilme.

5.4. Avaliação fitoquímica

5.4.1. Cromatografia em coluna

Foram obtidas a partir de cromatografia em coluna 4 frações do extrato clorofórmio da raiz de *Croton antisiphiliticus* denominadas CAN1, CAN2, CAN3 e CAN4 e 5 frações do extrato hexânico da casca de *Croton urucurana* denominadas CUR1, CUR2, CUR3, CUR4 e CUR5 (Figura 21).



Figura 21. Frações de *Croton urucurana* obtidas por meio da cromatografia em coluna.

As frações obtidas por meio da CC foram avaliadas quanto a atividade no biofilme formado de *S. aureus* (MBEC), na concentração de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Na tabela 6 foram descritos os resultados obtidos (UFC), bem como a planta originária e o solvente utilizado para obtenção das frações.

As frações CAN1, oriunda de *C. antisiphiliticus*, e CUR2, CUR3 e CUR4, obtidas de *C. urucurana* apresentaram atividade mais expressiva na redução da população bacteriana em biofilme do que as demais ($p < 0,05$).

Tabela 6. MBEC das frações de *Croton antisiphiliticus* e *C. urucurana* obtidas por cromatografia em coluna, frente *S. aureus* em biofilme, por meio da contagem de unidades formadoras de colônia. Resultados expressos em escala logarítmica.

Frações 2,5 mg.mL ⁻¹	Origem	Solventes	MBEC log UFC.mL ⁻¹	Redução da população bacteriana
CAN1	<i>C. antisiphiliticus</i>	H:A (50:50)	11,41	3,43 a
CAN2	<i>C. antisiphiliticus</i>	A	13,35	1,49 b
CAN3	<i>C. antisiphiliticus</i>	A:M (50:50)	13,92	0,92 b
CAN4	<i>C. antisiphiliticus</i>	M	14,77	0,07 b
CUR1	<i>C. urucurana</i>	H:A (98:2)	12,69	2,15 b
CUR2	<i>C. urucurana</i>	H:A (50:50)	10,89	3,95 a
CUR3	<i>C. urucurana</i>	A	10,38	4,46 a
CUR4	<i>C. urucurana</i>	A:M (50:50)	11,40	3,44 a
CUR5	<i>C. urucurana</i>	M	14,25	0,59 b
Controle*			14,84	0 b

H: hexano; A: acetato de etila; M: metanol

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott Knott ($\alpha=0,05$). * estirpes livre de tratamentos.

Baseado nestes resultados, as frações CAN1 e CUR3 foram submetidas a avaliação por espectrometria de massa, com o intuito de identificar as possíveis substâncias ativas.

5.4.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa

As análises por CG/MS mostraram que a fração CAN1 de *C. antisiphiliticus* continha 39 compostos apolares, sendo que os compostos majoritários foram alfa gurjuneno (15,50%) e dehidro-aromadendreno (14,11%), ambos sesquiterpenos do tipo tricíclico (Anexo1).

Pereira et al. (2012) identificou o ácido ent-kaur-16-en-18-oic como o diterpeno majoritário do extrato clorofórmico de raiz de *C. antisiphiliticus*. A obtenção dos compostos majoritários está diretamente relacionada à metodologia e aos solventes empregados nos processos de separação e

purificação, justificando, portanto, a obtenção de compostos majoritários no presente estudo diferentes dos apresentados por Pereira et al. (2012).

A fração CUR3 de *C. urucurana* foi constituída por 70 compostos apolares, com predominância de P-menth-1-ene-3.8-diol (14,96%), óxido limoneno (15,85%) e alfa copaeno-11-OL (11,72%), sendo os dois primeiros monoterpenos e o último sesquiterpeno (Anexo 2).

Estudo fitoquímico da espécie *C. urucurana* identificou a presença de um novo terpenóide (sesquiterpeno), isolado a partir de uma fração acetato de etila, oriunda do extrato hexânico da casca do caule (ZUCHINALLI, 2009). Pizzolatti et al. (2013) encontraram diterpenos clerodanos em extrato vegetal da casca da referida planta.

5.4.3. Bioautografia

A revelação das placas submetidas à bioautografia das frações CAN1 e CUR3 identificou as regiões cromatográficas que formaram os halos de inibição. Os controles positivos foram a fração CAN1 e CUR3 não eluídas, e o controle negativo foi o veículo sem ativo, situado no centro da placa, entre os controles positivos (Figura 21). Esta técnica, de execução simples e rápida, teve como objetivo identificar a banda ou região cromatográfica com atividade inibitória na multiplicação de bactérias livres (SAXENA et al., 1995).

Marston (2011) considera a bioautografia a técnica ideal para investigação de atividade biológica de constituintes vegetais, pois requer uma quantidade muito pequena da amostra a ser analisada, não há interferência de solventes, direciona o constituinte alvo, além de ser fácil e rapidamente exequível.

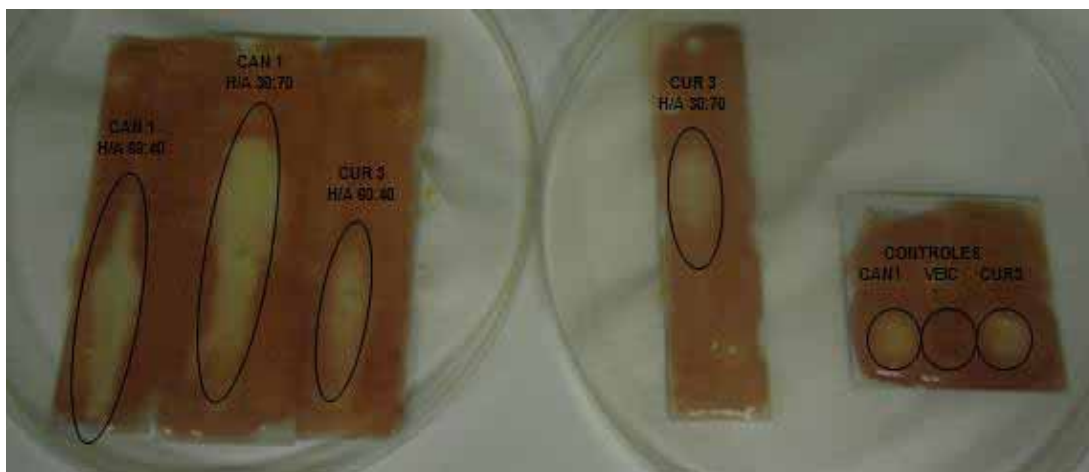


Figura 22. Bioautografia das frações CAN1 e CUR3 apresentando halos de inibição na multiplicação de *S. aureus* livre.

5.4.4. Cromatografia em Camada Delgada

Baseado em todos os dados obtidos optou-se por dar continuidade ao processo de purificação da fração CUR3 de *C. urucurana*.

Através da CCDC foram identificadas oito bandas cromatográficas desta fração (Figura 23), das quais, duas apresentaram-se em concentração maior, o que possibilitou o isolamento.



Figura 23. Placa cromatográfica de fração CUR3 com 8 bandas identificadas, indicadas pelas setas.

A subfração CUR3.4/5, constituída pelas sub-frações CUR3.4 (Figura 24) e CUR3.5 (Figura 25) apresentaram 6 substâncias. E a subfração CUR3.7, constituída por duas substâncias (Figura 26).

Os resultados obtidos a partir dos cromatogramas em CG/MS permitiram a reunião das frações CUR3.4 e CUR3.5 de *C. urucurana* por apresentarem perfil químico semelhante (Figura 24 e 25). Enquanto a fração CUR 3.7 permaneceu isolada por apresentar cromatograma diferenciado (Figura 26). Os compostos majoritários apresentaram características de mono e sesquiterpenos quando comparados às estruturas das substâncias armazenadas na biblioteca Nist do CG/MS.

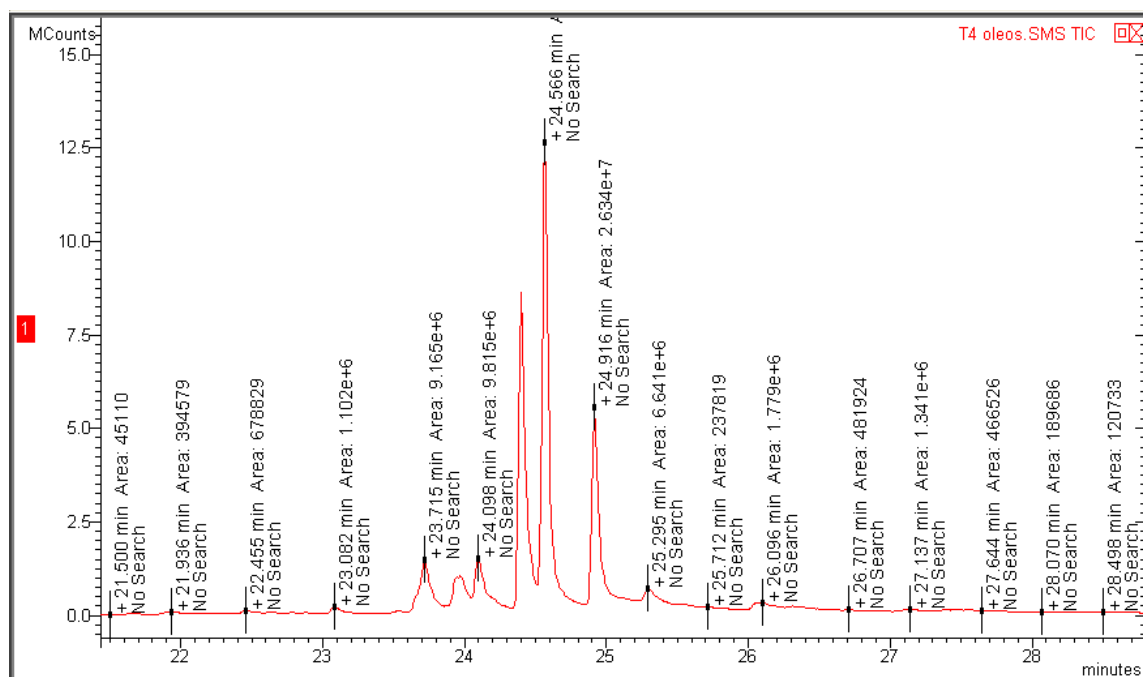


Figura 24. Cromatograma da fração CUR3.4 de *Croton urucurana*, emitido por CG.

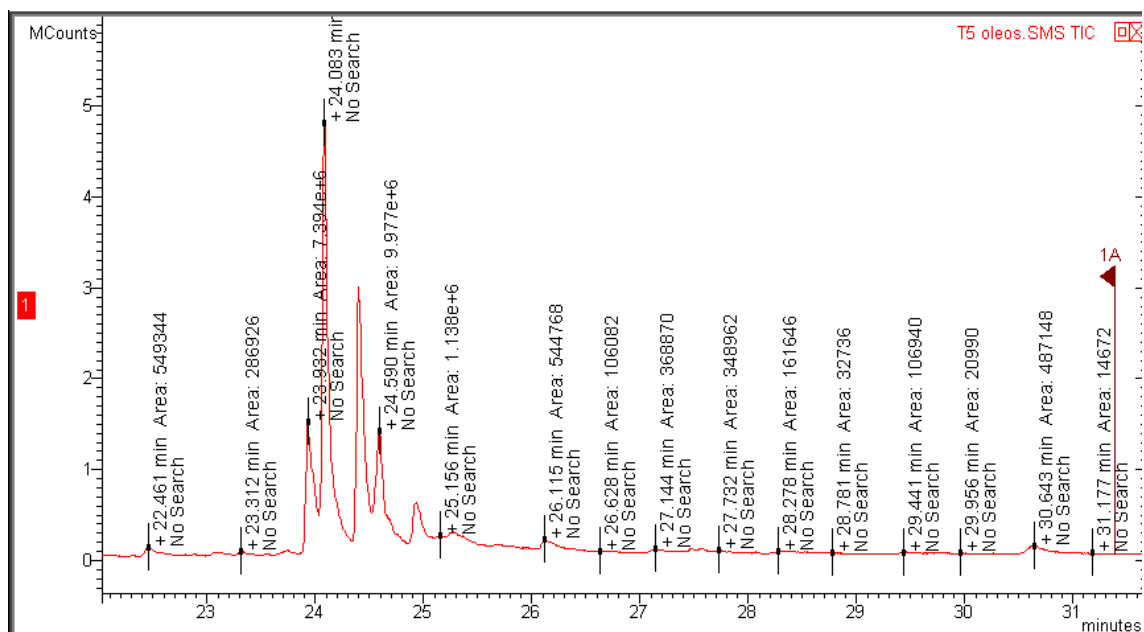


Figura 25. Cromatograma da fração CUR3.5 de *Croton urucurana*, emitido por CG.

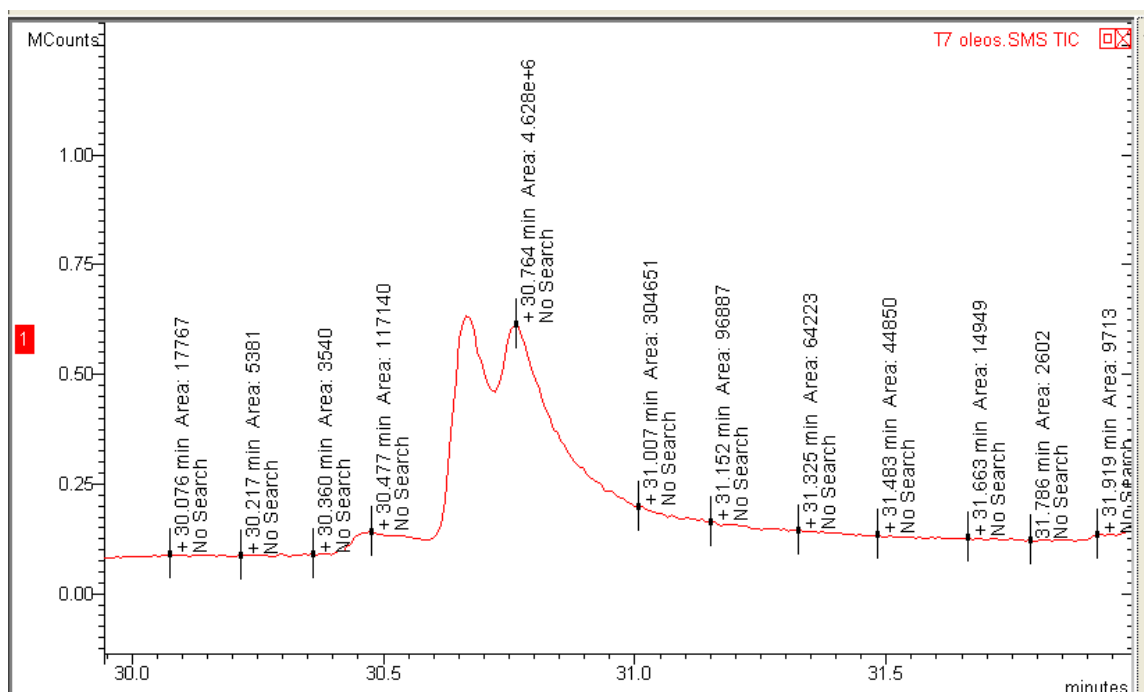


Figura 26. Cromatograma da fração CUR3.7 de *Croton urucurana*, emitido por CG.

Placas preparativas da subfração CUR3.7 foram submetidas à eluição com hexano e acetato de etila (30:70) e foram identificadas duas substâncias distintas, denominadas CUR3.7A e CUR3.7B (Figura 27). Após recuperação das bandas cromatográficas foi obtida uma amostra de 1 mg de cada substância, que

submetidas novamente à cromatografia gasosa foi confirmada sua pureza (CUR3.7A). Na substância identificada como CUR3.7B, ainda havia traços da primeira, sendo necessário, portanto, eluí-las novamente.



Figura 27. Placa preparativa revelada com vanilina sulfúrica e luz ultravioleta, indicando a separação entre as frações CUR3.7A e CUR3.7B de *Croton urucurana*.

Após a obtenção destas substâncias puras, todas as subfrações e substâncias isoladas foram submetidas à contagem de unidades formadoras de colônia. A MBEC da subfração CUR3.4/5, e substâncias CUR3.7A e CUR3.7B, na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foi estatisticamente superior à atividade da fração CUR3.7 e dos antibióticos vancomicina e gentamicina frente *S. aureus* em biofilme ($p < 0,05$) (Figura 28).

Rios e Reccio (2005) consideram interessante, em termos de prospecção terapêutica, a atividade antimicrobiana de extratos vegetais em concentrações inferiores a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e, em se tratando de substâncias puras a concentração máxima aceitável seria de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em contrapartida, Eloff (2004) define como 100 mg.mL^{-1} , a maior concentração tolerável para atividade antimicrobiana de extratos vegetais. No estudo vigente, os extratos vegetais e substâncias isoladas apresentaram atividade antibiofilme em concentrações maiores que os valores propostos por Rios e Reccio (2005) e significativamente inferior aos valores sugeridos por Eloff (2004).

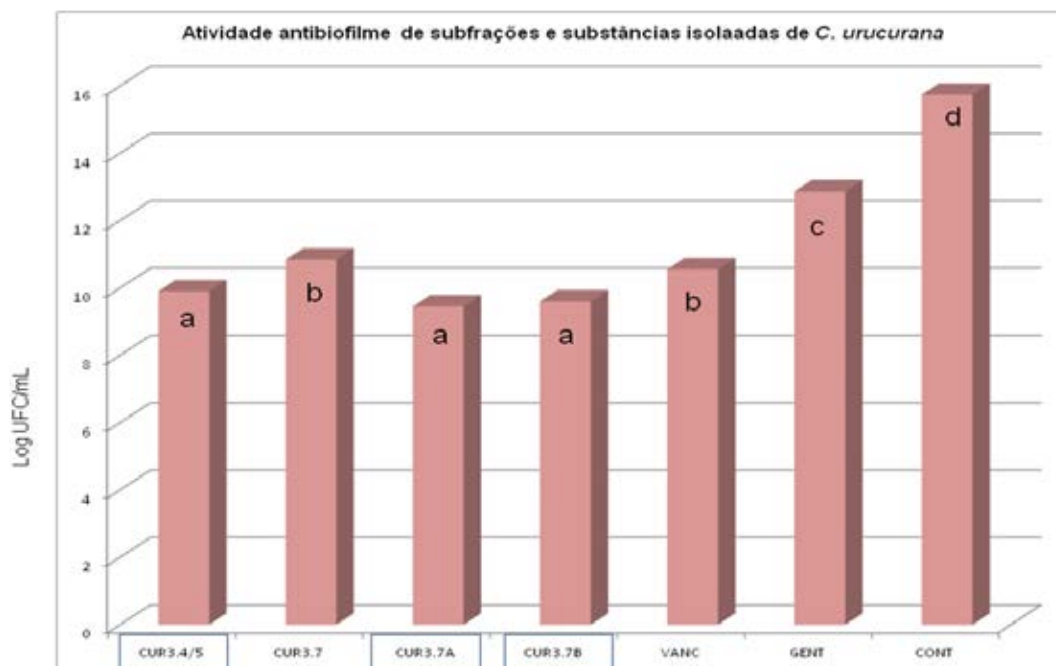


Figura 28. Atividade das subfrações e substâncias isoladas de *Croton urucurana* na redução da UFC de *S. aureus* em biofilme. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott Knott ($\alpha=0,05$).

5.5. Microscopia eletrônica por varredura (MEV)

As eletromiografias geradas na microscopia por varredura estão apresentadas na figura 29.

Nas imagens obtidas observa-se uma inibição significativa na população bacteriana aderida em todos os tratamentos avaliados, com destaque para as subfrações oriundas do extrato hexânico de *C. urucurana*, CUR3.4/5 e CUR3.7, nas quais não foram encontradas colônias aderidas. O controle do inóculo de *S. aureus* apresentou expressiva aderência no cupom de aço, conforme esperado.

O aço inoxidável, descoberto na Inglaterra em 1912, corresponde a uma liga composta por ferro e cromo. O cromo, devido à sua alta afinidade com o oxigênio, tende a se combinar com este formando uma fina camada de óxido de cromo, responsável pela resistência à corrosão e pela hidrofobicidade do aço inoxidável. Neste contexto, a adesão bacteriana está diretamente relacionada ao grau de hidrofobicidade da superfície, ou seja, quanto mais hidrofóbica, maior a sua capacidade de se ligar (SHENG, TING e PEHKONEN, 2007). Um teste de

hidrofobicidade, realizado por Yokoo et al. (2004), demonstrou que *S. aureus* possui características hidrofóbicas, facilitando portanto, a adesão na superfície referida.

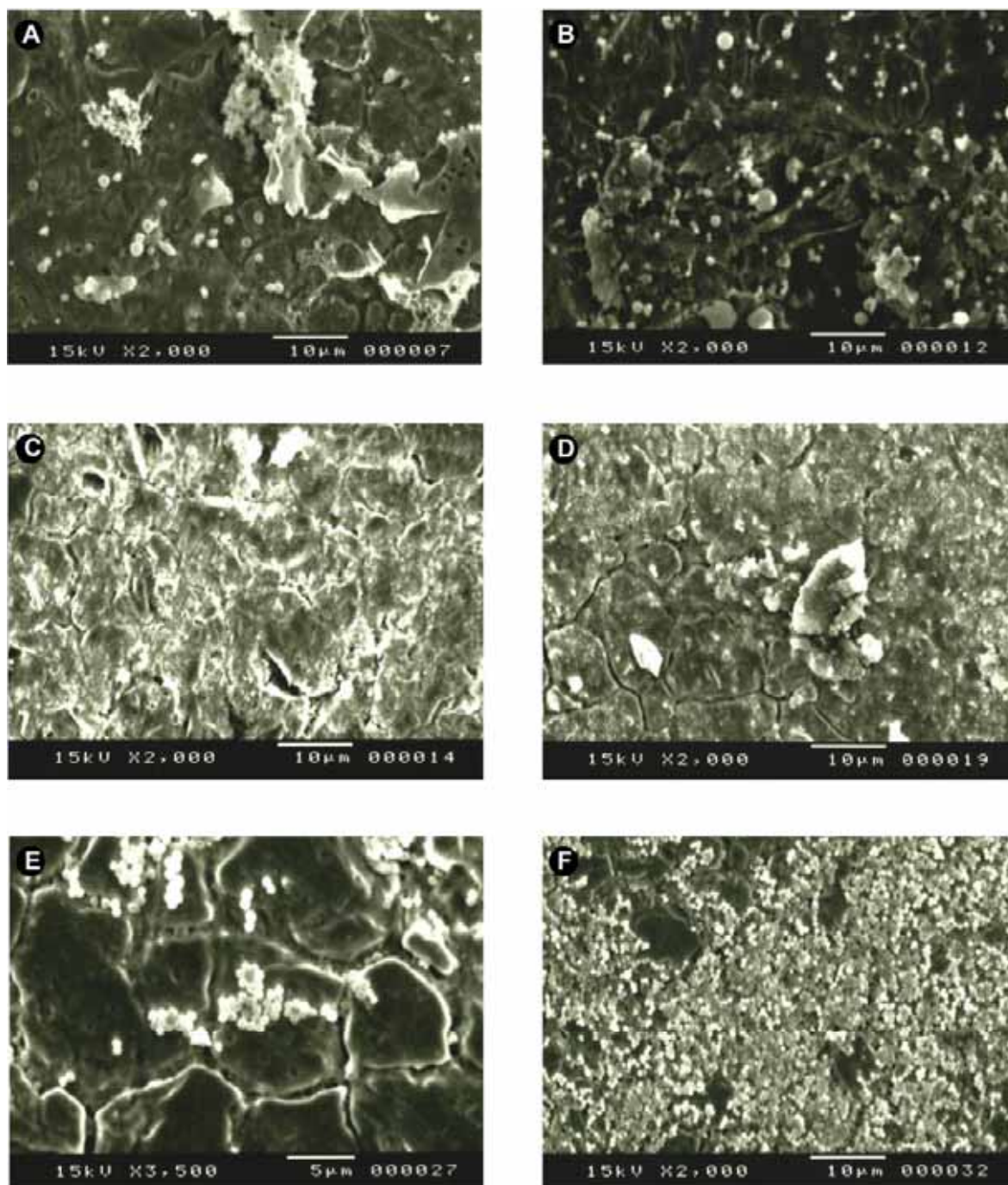


Figura 29. Eletromiografias da atividade dos tratamentos no biofilme de *S. aureus*, aderido em cupons de aço e obtidas por microscopia eletrônica por varredura. A.Fração de *C. antisiphyliticus* CAN1. B.Fração de *C. urucurana* CUR3. C. Subfração de *C. urucurana* CUR3.4/5. D.Subfração de *C. urucurana* CUR3.7. E.Vancomicina. F.Controle do inóculo livre de tratamento.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo as estirpes de *Staphylococcus aureus* cultivadas na forma livre foram sensíveis aos antibióticos gentamicina e vancomicina, no entanto quando cultivadas em biofilme foram expressivamente resistentes aos antibióticos.

Extratos brutos de ambas espécies de *Croton* inibiram a formação do biofilme de *S. aureus*, semelhantemente aos antibióticos.

O extrato bruto clorofórmico de *Croton antisiphiliticus* apresentou atividade no biofilme formado de *S. aureus* equivalente ao antibiótico gentamicina e a fração purificada foi superior a este antibiótico.

Quanto ao *Croton urucurana*, o extrato bruto hexânico também foi menos ativo quando comparado às frações enriquecidas e substâncias puras. Estes compostos, com características apolares, apresentaram atividade inibitória significativamente superior aos antibióticos gentamicina e vancomicina, frente *S. aureus* em biofilme.

Em células livres, os extratos vegetais apresentaram atividade inibitória frente *S. aureus* inferior aos antibióticos avaliados.

Nas condições ensaiadas, não foi observada influencia sazonal na composição química dos extratos vegetais e por consequência na atividade antibacteriana das espécies de *Croton*.

Entre as duas espécies de *Croton* avaliadas, *C. urucurana* foi a espécie mais promissora quanto a atividade antibacteriana frente *S. aureus*, causadores de mastite bovina, apresentando potencial terapêutico e preventivo na enfermidade em estudo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados apresentados, torna-se interessante a identificação das substâncias químicas isoladas nas subfrações de *Croton urucurana* (CUR3.7A e CUR3.7B) que apresentaram relevante atividade antibiofilme frente *S. aureus*, bem como o fracionamento e separação das substâncias presentes na subfração CUR3.4/5, que também apresentou atividade antibiofilme destacada.

Embora novos estudos sejam necessários, o presente estudo aponta valiosas possibilidades futuras na aplicabilidade dos produtos naturais avaliados.

Considerando que a higienização eficaz dos equipamentos e fômites envolvidos na cadeia produtiva do leite contribuem significativamente no controle da mastite bovina, um aspecto importante seria a incorporação dessas substâncias naturais na produção de antissépticos e sanitizantes utilizados nos equipamentos das indústrias e plataformas de obtenção de leite, uma vez que demonstraram efeito inibitório significativo na adesão do *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável.

Outro ponto relevante na utilização de produtos naturais no tratamento e controle da mastite seria a manutenção da saúde do rebanho e seu desempenho produtivo reduzindo os custos de produção e ainda, gerando um produto final com menor risco de contaminação de resíduos e também com menor impacto ambiental.

Assim, os extratos vegetais e substâncias isoladas de *Croton urucurana* poderão ser ferramentas notáveis não apenas no tratamento, mas também no controle e prevenção da mastite bovina, aspectos primordiais para impedir a instalação e permanência da doença em um rebanho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHO, C.J.R. Desafios para a conservação do Cerrado, em face das atuais tendências de uso e ocupação. In: SCARIOT, A. SOUSA-SILVA, J.C. FELFILI, J.M. (org) **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 376-381.

ALMEIDA, K.S.; FREITAS, F.L.C.; PEREIRA, T.F.C. Etnoveterinária: a fitoterapia na visão do futuro profissional veterinário. **Revista Verde**, v.1, n.1, p.67-74, 2006.

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA, 2004. 43 p.

ALVES, H.M. Plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, Rio de Janeiro, n.3, p.10-15, 2001.

AMORIM, E.L.C.; LIMA, C.S.A.; HIGINO, J.S.; SILVA, L.R.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarma**, v.15, n.1-3, p.66-69, 2003.

ARANTES, V.P.; SATO, D.N.; VILEGAS, W.; SANTOS, L.C.; LEITE, C.Q.F. Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.26, n.3, p.195-198, 2005.

ARCURI, E. F. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Revista Leite e Derivados**, v.9, n.53, p.40-45, 2000.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; MUNDSTOCK, E. Bacteriostatic and bactericidal activity of the *Baccharis trimera* (Less.) D.C. - Compositae decocto, as disinfectant or antiseptic. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.3, p.230-234, 2000.

BANDEIRA, F.S.; PICOLI, T.; ZANI, J.L.; DA SILVA, W.P.; FISCHER, G. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região Sul do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.01-06, 2013.

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci grow aerobically. In: MURRAY, P.R., et al. (Eds). **Manual of Clinical Microbiology**. 8 ed. Washington: American Society for Microbiology, p.384-404, 2003.

BARA, M.T.F., RIBEIRO, P.A.M.; ARANTES, M.C.B.; AMORIM, L.L.S.S.; PAULA, J.R. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.211-215, 2006.

BARON, E.J.; FINEGOLD, S.M. **Bailey e Scott's - Diagnostic Microbiology**, 8 ed. The C.V. Mosby Co: St. Louis, 1990.

BEZERRA, D.A.C.; PEREIRA, A.V.; LÔBO, K.M.S.; RODRIGUES, O.G.; ATHAYDE, C.R.; MOTA, R.A.; MEDEIROS, E.S.; RODRIGUES, S.C. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.4, p.814-817, 2009.

BRAMLEY, A.J.; DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: Mastitis control progress and prospects. **Journal of Dairy Research**, v.51, n.3, p.481-512, 1984.

BRANCO, L. O.; DIAS, R.F.; LIMA-RIBEIRO, A.M.C. Bases de medicamentos para mastite mais vendidas na região de Uberlândia. **Veterinária Notícias**, v.18. n. 2, p. 26, 2012.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 11 ed. Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill, 1821p, 2006.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.2, p.179-189, 2000.

CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p.58-65, 2000.

CARNEIRO, V.A.; SANTOS, H.S.; ARRUDA, F.V.S.; BANDEIRA, P.N.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; PEREIRA, M.A., HENRIQUES, M., CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H. Casbane Diterpene as a Promising Natural Antimicrobial Agent against Biofilm-Associated Infections. **Molecules**, v.16, p.190-201, 2011. Disponível em <doi:10.3390/molecules16010190>.

CARUZO, M.B.R.; CORDEIRO, I. Sinopse da tribo *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s.) no Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, v.34, n.4, p.571-585, 2007.

CATÃO, R.M.R., FREITAS E SILVA, P.M.; FEITOSA, R.J.P.; PIMENTEL, M.C.; PEREIRA, H.S. Prevalência de infecções hospitalares por *staphylococcus aureus* e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. **Revista de Enfermagem UFPE**, v.7, n.8, p.5257-64, 2013.

CHAPAVAL, L.; MOON, D.H.; GOMES, J.E.; DUARTE, F.R.; TSAI, S.M.; NASSU, R.T. Efeito da temperatura sobre a produção de enterotoxina estafilocócica em leite. **Higiene Alimentar**, v. 24, n.180/181, p.162-167, 2010.

CHEN, Z.P.; CAI, Y.; PHILLIPSON, J.D. Studies on the antitumor, antibacterial, and wound-healing properties of Dragon's blood. **Planta Medica**, v.60, n.6, p.541-545, 1994. Disponível em <doi: 10.1055/s-2006-959567>.

CHOKR, A., WATIER, D.; ELEAUME, H.; PANGON, B.; GHNASSIA, J.C.; MACK, D.; JABBOURI, S. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Internacional Journal of Medical Microbiology**, v.296, p.381-388, 2005. Disponível em <doi:10.1016/j.ijmm.2006.02.018>.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard, Ninth Edition (M07-A9), 2012.

COBRADO, L., AZEVEDO, M.M.; SILVA-DIAS, A.; PEDRO RAMOS, J.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 1159–1162, 2012. Disponível em <doi:10.1093/jac/dks007>.

COIMBRA, M.V.S; COIMBRA-FILHO, M.V.S.; LIMA, N.C. Estudo da prevalência e dos índices de resistência microbiana em um hospital público do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Vigilância Sanitária**. v.1, n.1, p. 58-67, 2012.

CORAÇA-HUBER, D.C.; FILLE, M.; HAUSDORFER, J.; PFALLER, K.; NOGLER, M. *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antibiotic susceptibility tests on polystyrene and metal surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 12, n.6, p.1235–1243, 2012. Disponível em <doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05288>.

COSTA, B. Homeopatia na cura e prevenção de doenças. **Revista Balde Branco**, n.405, p.28-33, 1998.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v.284, n.5418, p.1318-1322, 1999.

COWANN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

CUNHA, A.S.; CUNHA, M.R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus*, através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência as drogas. **Saúde e Ambiente em Revista**, v.2, n.1, p.105-114, 2007.

DAVEY M.E.; O'TOOLE G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.4, p.847-67, 2000.

DIAS, N.L.; SILVA, D.C.B.; OLIVEIRA, D.C.B.S.; FONSECA JUNIOR, A.A.; SALES, M.L.; SILVA, N. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à metilina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1547-1552, 2011.

ESMERALDINO, L.E.; SOUZA, A.M., SAMPAIO, S.V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**, v.12, n.8, p. 570-576, 2005.

ESTES, K.S.; DERENDORF, H. Comparison of the pharmacokinetic properties of vancomycin, linezolid, tigecyclin, and daptomycin. **European Journal of Medical Research**, v.15, n.12, p.533-543, 2010. Disponível em <doi 10.1186/2047-783X-15-12-533>.

ELOFF, J.N. Quantification the bioactivity of plants extracts during screening and bioassay guided fractionation. **Phytomedicine**, v.11, n.4, p.370-371, 2004.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FEHLHABER, K; JANETSCHKE, P. **Higiene Veterinaria de los Alimentos**. Zaragoza : Acribia, 669 p, 1995.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.3, p.369-394, 2006.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FLORES, M.P.; GREGORI, M.S.; ARAÚJO, L.E.B. A segurança alimentar e os modelos de produção agrária químico dependentes. **Revista Eletrônica do Curso de Direito UFSM**, v.8, p. 318-328. Disponível em <doi: 10.5902/19813694>.

FONTANA, V.L.D.S; GIANNINI, M.J.S.M.; LEITE, C.Q.F.; MIRANDA, E.T.; ALMEIDA, A.M.F., FONTANA, C.A.P.; SOUZA, C.M., STELLA, A.E. Etiologia da mastite subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene β -Lactamase em *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.4, p.552-559, 2010.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 182p, 2005.

FREIRE, F.; PEREIRA, C.A.; COSTA, A.C.P.B.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Avaliação antibacteriana *in vitro* dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* e *Syzygium cumini* sobre biofilmes de estafilococos coagulase-negativo e positivo. IN: 21° CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 2009, São José do Rio Preto, **Anais...** Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, 2009.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v.11, n.3, p.495-500, 1995.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, P.N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GOMES, I.A.G. **New therapeutic strategies against *Staphylococcus epidermidis* biofilms**. 2010. 137p. Dissertation for PhD degree in Biomedical Engineering, Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal. 2010.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G.; RADCLIFFE-SMITH, A. **World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**, v.2, Royal Botanical Gardens, 2000.

HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiology**, v.9, n.10, p.486-493, 2001.

HIDAYAT, L.K., HSU, D.I.; QUIST, R.; SHRINER, K.A., BERINGER, A.W. High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: efficacy and toxicity. **Archives of Internal Medicine**, v.166, n.19, p.2138-2144, 2006.

HOEFLER, R.; VIDOTTI, C.C.F.; MENEZES, E.S.; PINHEIRO, S. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **Farmacoterapêutica**. Brasília: CEBRIM/CFF, ano XI, n.4, p.1-4, 2006.

HOLMES, N.E.; JOHNSON, P.D.R.; HOWDEN, B.P. The relationship between hVISA, VISA, high vancomycin MIC and outcome in serious *Staphylococcus aureus* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, 2012. Disponível em <doi:10.1128/JCM.00775-12>.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Bovine mastitis: definition and guidelines for diagnosis**. Brussels, Belgium: International Dairy Federation: Bulletin 211, 1987. 24p.

JAY, J.M. **Microbiología Moderna de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 804p, 1994.

JEONG, S.I.; KIM, B.S.; KEUM, K.S.; LEE, K.H.; KANG, Y.; PARK, B.I.; LEE, Y.R.; YOU, Y.O. Kaurenoic Acid from *Aralia continentalis* Inhibits Biofilm Formation of *Streptococcus mutans*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2013. Disponível em <doi.org/10.1155/2013/160592>. Acesso em: 08 agosto 2013.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1565p, 2008.

LANGONI, H. Mastite bovina conceitos e fundamentos. IN: IV ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 2007, Botucatu. **Anais...** FMVZ UNESP, 2007.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v.149, n.2, p.353-362, 2003.

LIU, C.; BAYER, A.; COSGROVE, S.E.; DAUM, R.S.; FRIDKIN, S.K.; GORWITS, R.J.; KAPLAN, S.L.; KARCHMER, A.W.; LEVINE, D.P.; MURRAY, B.E.; RYBAK, M.J.; TALAN, D.A.; CHAMBERS, H.F. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Infections in Adults and Children. **Clinical Infectious Diseases**, v.52, n.3, p.18-55, 2011.

LOGUERCIO, A.P.; GROFF, A.C.M.; PEDROZZO, A.F.; WITT, N.M.; SÁ E SILVA, M.; VARGAS, A.C.. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra gentes bacterianas da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.2, p.347-349, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002, 512p.

MARQUES, C.S.; REZENDE, J.G.O.S.; ALVES, L.A.F.; SILVA, B.C.; ALVES, E.; ABREU, L.R.; PICCOLI, R.H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.548-553, 2007.

MARSTON, A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. **Journal of Chromatography A**, n.1218, n.19, p.2676-2683, 2011.

MARTINS, R.P.; SILVA, J.A.G.; NAKAZATO, L. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá – MT. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n. 1, p.181-187, 2010.

MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **The Veterinary Journal**, v.171, p.398-407, 2006. Disponível em <doi:10.1016/j.tvjl.2005.01.006>.

MELO, P.C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina**. 2008. 122p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2008.

MELLO, P.L.; AGOSTINIS, R.O.; BARZON, E.M.; COLOMBO, R.B.; SILVA, A.V., MARTINS, L.A. Prevalência da mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região Sudoeste do Paraná. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.4, p. 513-521, 2012.

MILO, B.; RISCO, E.; VILA, R.; IGLESIAS, J.; CAÑIGUERAL, S. Characterization of a Fucoarabinogalactan, the main polysaccharide from the gum exsudate of *Croton urucurana*. **Journal of Natural Products**, v.65, n.8, p.1143-1146, 2002.

MITIDIERO, A.M.A. **Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. 132p. 2012.

MOTA, R.A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.2, n.3, p. 57-61, 2008.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, n.403, p.853-858, 2000. Disponível em <doi:10.1038/35002501>.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D., OLIVEIRA, R.P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.1, p.1-4, 2007.

NADER, T.T. **Potencial de atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais do Cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus***. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal-SP, 68p. 2010.

NETO, S.; CORBELLINI, W.; CAMPOS, L.G.; CARDOSO, T.; PAIM, M.R.I.; SANTOS, D. Fatores relacionados à resistência a antimicrobianos e agentes causadores de mastite bovina. IN: 32ª SEMANA CIENTÍFICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE, 2012, Porto Alegre, **Anais...** Disponível em <http://hdl.handle.net/10183/66550>, 2012.

NUNES, M.T.; D'ANGELINO, J.L. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo. **Revista Higiene Alimentar**. v.21, n.149, p.57-61, 2007.

PEETERS, E., NELIS, H.J., COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v.72, p.157-165, 2008. Disponível em <doi:10.1016/j.mimet.2007.11.010>.

PEREIRA, M.S.V.; SIQUEIRA JUNIOR, J.P. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v.20, n.6, p.391-395, 1995.

PEREIRA, M.S.V.; BARRETO, V.P.; SIQUEIRA JUNIOR, J.P. Phage-mediated transfer of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. **Microbios**, v.92, n.372, p.147-155, 1997.

PEREIRA, S.; TALEB-CONTINI, S.; COPPEDE, J.; PEREIRA, P.; BERTONI, B.; FRANÇA, S.; PEREIRA, A.M.S. An ent-Kaurane-Type Diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. **Molecules**, v.7, p.8851-8858, 2012. Disponível em <doi:10.3390/molecules17088851>.

PERES, M.T.L.P.; MONACHE, F.D.; CRUZ, A.B.; PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.56, n.3, p.223-226, 1997.

PERES, M.T.L.P.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES, R.A., MONACHE, F.D. Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. **Phytochemistry**, v.49, n.1, p.171-174, 1998.

PHILPOT, W.N. Programas de qualidade do leite no mundo. IN: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1998, 16p.

PIANTA, C. **Mastite Bovina: Informações ao Produtor**. Porto Alegre: FEPAGRO. Circular Técnica, 15. 1997. 12p.

PITTS, B.; HAMILTON, M.A.; ZELVER, N.; STEWART, P.S. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. **Journal of Microbiological Methods**, v.54, p.269-276, 2003. Disponível em <doi:10.1016/S0167-7012(03)00034-4>.

PIZZOLATTI, M.G.; BORTOLUZZI, A.J.; BRIGHENTE, I.M.C.; ZUCHINALLI, A.; CARVALHO, F.K.; CANDIDO, A.C.S.; PERES, M.T.L.P. Clerodane diterpenes from bark of *Croton urucurana* Baillon. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.24, n.4, p.609-614, 2013.

PRETTO, J.B. **Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí, Vale do Itajaí, 74p. 2005.

REITER, K.C.; SAMBRANO, G.E.; VILLA, B.; PAIM, T.G.S.; OLIVEIRA, C.F.; AZEVEDO, P.A. Rifampicin fails to eradicate mature biofilm formed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.4, p.471-474, 2012.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Eds.). **Cerrado: Ambiente e Flora**. Planaltina: Embrapa Cerrados. p.89-166, 1998.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p. 80-84, 2005. Disponível em <doi:10.1016/j.jep.2005.04.025>.

RODRIGUES, L.A.; CARVALHO, D.A.; GOMES, L.J. **Espécies vegetais nativas usadas pela população local em Luminárias - MG**. Lavras: Boletim Agropecuário UFLA, n.52, 2002. 34p.

ROSE, W.E.; POPPENS, P.T. Impact of biofilm on the in vitro activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, n.3, p.485-8, 2008. Disponível em <doi: 10.1093/jac/dkn513>.

SÁ, N.C.; CAVALCANTE, T.T.A.; ARAÚJO, A.X.; SANTOS, H.S.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; BANDEIRA, P.N.; CUNHA, R.R.S.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. **Arquivos of Oral Biology**, v.57, p.550-555, 2012. Disponível em <doi:10.1016/j.archoralbio.2011.10.016>.

SABOUR, P.M.; GILL, J.J.; LEPP, D.; PACAN, J.C.; AHMED, R.; DINGWELL, R. LESLIE, K. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Journal Clinical Microbiology**, v.42, n.8, p.3449-3455, 2004.

SAEKI, E.K.; PEIXOTO, E.C.T.M; MATSUMOTO, L.S. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinaria Brasília**, v.5, n.3, p.284-290, 2011.

SAISING, J.; ONGSAKUL, M.; VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. ethanol extract and rhodomyrtone: a potential strategy for the treatment of biofilm-forming staphylococci. **Journal of Medical Microbiology**, v.60, p.1793–1800, 2012. Disponível em <doi:10.1099/jmm.0.033092-0>.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 4 ed., 682p. 1992.

SAXENA, G.; FARMER, S.; TOWERS, G.H.N.; HANCOCK, R.E.W. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique. **Phytochemical Analysis**, v.6, n.3, p.125–129, 1995.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.A.; NADER FILHO, A.; ÁVILA, F. Sensibilidade dos *Staphylococcus coagulase positiva*, isolados em casos de mastite subclínica bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **ARS Veterinária**, v.12, n.1, p.57-63, 1996.

SCHUCH, L.F.D. **Plantas medicinais em atenção primária veterinária: atividade antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e a dermatófitos**. Tese (Doutorado). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre. 206p. 2008.

SHENG, X.; TING, Y. P.; PEHKONEN, S. O. Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.310, n.2, p.661-669, 2007.

SILVA, E.P.; BERGAMINI, A.M.M.; OLIVEIRA, M.A. Toxinfecções alimentares na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil – 2005 a 2008. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.7, n.77, p.4-10, 2010.

SILVA JUNIOR, I.E.; CECHINEL FILHO, V.; ZACCHINO, S.A.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O. Triagem antimicrobiana de algumas plantas medicinais do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1, p.242-248, 2009.

SILVA, W.M.O.; SOUZA, G.F.X.T., VIEIRA, P.B.; SANAVRIA, A. Uso popular de plantas medicinais na promoção da saúde animal em assentamentos rurais de Seropédica – RJ. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.20, n.1, p.32-36, 2013.

SIMIONATTO, E.; BONANI, V.F.L.; MOREL, A.F.; POPPI, N.R.; RAPOSO JÚNIOR, J.L.; STUCKER, C.Z.; PERUZZO, G.M.; PERES, M.T.L.P.; HESS, S. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p.879-885, 2007.

SMITH, J.L.; BUCHANAN, R.L.; PALUMBO, S.A. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. **Journal Food Protection**, v.46, p.545-555, 1983.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against very important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, n.2, p.118-122, 1998.

SOUZA, G.N.; BENEDET, H.D. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite de consumo no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínio Candido Tostes**, v.55, n.315, p.156-161, 2000.

SOUZA, N.G. **Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite de consumo no estado de Santa Catarina**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, 1998.

SOUZA, T.M.P.; CONCEIÇÃO, D.M. Atividade antibacteriana de *Rosmarinus officinalis*. **Ensaio e Ciência**, v.5, n.5, p.7-13, 2007.

SPEROTTO, V.R.; MURARI, A.L.; SILVA, D.A.R.; POSSENTI, C.G.R.; WIEST, J.M.; AVANCINI, C.A.M. Atividade do decocto de *Achyrocline satureioides* D.C. (Lam.) – Asteraceae (“macela”) sobre bactérias padrões e isoladas em mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, n.3, p.1052, 2012.

TORTORA, J. G.; BERDELL, R.; FUNKE; CASE, C.L. **Microbiologia: An Introduction**. São Paulo: Artmed, 135p. 2000.

VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H. Principais zoonoses transmitidas pelo leite. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.9, n.1, p. 32-37, 2011.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VEIRA, T.S.W.J; RIBEIRO, M.R.; NUNES, M.P.; MACHINSKI JUNIOR, M.; NETTO, D.P.. Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil. **Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.791-796, 2012.

YOKOO, S.; PIZZOLITTO, A.C.; POZETTI, G.L.; PIZZOLITTO, E.L. Aderência e formação do biofilme por *Staphylococcus aureus* ao polietilenotereftalato (PET) usado como embalagem para acondicionamento de medicamentos e cosméticos. **Revista de Ciência Farmacêutica**, v.25, n.1, p.37-39, 2004.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.577-585, 2007.

ZANIN, I.C.J.; LOBO, M.M.; RODRIGUES, L.K.A.; PIMENTA, L.A.F.; HOFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with light-emitting diode. **European Journal of Oral Science**, v.114, n., p.64-9, 2006. Disponível em <doi10.1111/j.1600-0722.2006.00263>.

ZENI, F. **A importância da qualidade da ordenha no controle da mastite bovina**. 2012. 62p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ZUCHINALLI, A. **Estudo de propriedades químicas, estruturais e biológicas da espécie vegetal *Croton urucurana***. 2009. 91p. Dissertação (Mestrado em Química), Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

ANEXO 1

Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa da fração
hexano/acetato de *Croton antisiphiliticus*.

Sample Information

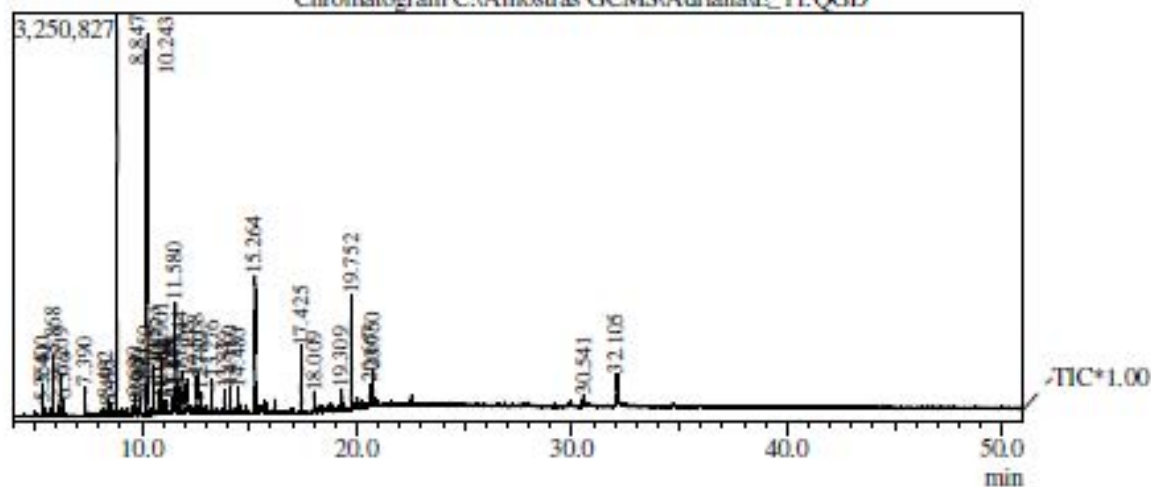
Analyzed by : Admin
 Analyzed : 8/5/2013 15:16:56
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1

IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 1
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\Amostras GCMS\Adriana\E_11.QGD

Method File : C:\Amostras GCMS\Adriana\Ac Caurenóico.qgm
 Org Method File : C:\Amostras GCMS\Adriana\Ac Caurenóico.qgm
 Report File :
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\18-04-2013.qgt
 Comment :

\$EndIf\$Modified by : Admin
 Modified : 8/5/2013 16:41:02

Chromatogram C:\Amostras GCMS\Adriana\E_11.QGD



Peak Report TIC

Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	5.356	179433	0.70	Bicyclo[3.1.1]heptan-2-one, 6,6-dimethy
2	5.400	481828	1.87	TRANS-PINOCARVEOL
3	5.868	747220	2.91	Borneol
4	6.209	554745	2.16	(1R)-(-)-Myrtenal
5	6.376	178514	0.69	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trin
6	7.390	281198	1.09	ACETIC ACID 1,7,7-TRIMETHYL-BIC
7	8.402	173823	0.68	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4

Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
8	8.495	184539	0.72	Bicyclo[2.2.1]heptane-2,5-diol, 1,7,7-trin
9	8.847	3984926	15.50	.alpha.-Gurjunene
10	9.690	150188	0.58	.beta.-Selinene
11	9.865	133137	0.52	Benzene, 1-methyl-4-(1,2,2-trimethylcyc
12	9.900	198691	0.77	7-Tetracyclo[6.2.1.0(3.8)0(3.9)]undecane
13	10.150	292860	1.14	(+) spathulenol
14	10.243	3627513	14.11	DEHYDROAROMADENDRENE
15	10.553	432234	1.68	1a,2,5,5-Tetramethyl-cis-1a,4a,5,6,7,8-he
16	10.817	275240	1.07	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8
17	10.901	603916	2.35	2H-Cyclopropa[a]naphthalen-2-one, 1,1a
18	10.982	126757	0.49	7R,8R-8-Hydroxy-4-isopropylidene-7-m
19	11.194	110552	0.43	2-METHYL-4-(2,6,6-TRIMETHYL-CYCLO
20	11.458	282863	1.10	Acetic acid, 3-hydroxy-6-isopropenyl-4,8
21	11.497	178237	0.69	9-Isopropyl-1-methyl-2-methylene-5-oxa
22	11.580	1141686	4.44	2H-Cyclopropa[a]naphthalen-2-one, 1,1a
23	11.844	426854	1.66	Spiro[2.5]octane, 3,3-dimethyl-2-(1-butyl
24	12.105	629545	2.45	ISO-VELLERAL
25	12.568	410876	1.60	Isolongifolene, 7,8-dehydro-8a-hydroxy-
26	12.789	253895	0.99	Menthol, 1'-(butyn-3-one-1-yl)-, (1R,2S,3
27	13.276	403494	1.57	Acetic acid, 7-isopropenyl-1,4a-dimethyl
28	13.849	283835	1.10	SANDARACOPIMAR-15-ENE-8.BETA.
29	14.110	323550	1.26	(-).beta.-Elemene
30	14.480	350095	1.36	Kaur-16-ene, (8.beta.,13.beta.)-
31	15.264	2057980	8.01	Kaur-16-ene (CAS) A-PODOCARPENE
32	17.425	1357403	5.28	Cycloheptane, 4-methylene-1-methyl-2-(
33	18.009	304203	1.18	D.A-Friedooleanan-28-al, 3-oxo- (CAS)
34	19.309	300378	1.17	Kaur-16-ene (CAS) A-PODOCARPENE
35	19.752	1697521	6.60	4a,7,7,10a-Tetramethyldodecahydrobenz
36	20.667	276616	1.08	1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-ethyl-dodecal
37	20.750	496611	1.93	1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-ethyl-dodecal
38	30.541	446069	1.74	
39	32.105	1367977	5.32	Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.,24S)- (CAS)
		25707002	100.00	

ANEXO 2

Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa da fração acetato de
Croton urucurana.

Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
8	10.772	89480	0.09	p-menth-2-en-1-ol
9	10.947	533678	0.56	6,8-Nonadien-2-one, 8-methyl-5-(1-meth
10	11.080	241536	0.25	(+)-.BETA.-FUNEBRENE
11	11.147	468386	0.49	TRANS-LIMONENE OXIDE
12	11.206	322988	0.34	2H-Pyran-3-ol, tetrahydro-2,2,6-trimethy
13	11.320	168665	0.18	Spirio-10-(2,11-dioxabicyclo[4.4.1]undec
14	11.369	156857	0.16	1-Heptadec-1-ynyl-cyclohexanol
15	11.416	833253	0.87	1,7-Nonadien-4-ol, 4,8-dimethyl-
16	11.502	604084	0.63	Benzoic acid, 2,4-dihydroxy-3,6-dimethy
17	11.608	172745	0.18	NEROLIDOL-EPOXYACETATE
18	11.682	556936	0.58	2-Hexanol, 3,3,5-trimethyl-2-(3-methylpl
19	11.770	482749	0.51	isospathulenol
20	11.868	154715	0.16	9,10-Dimethyltricyclo[4.2.1.1(2,5)]decan
21	11.983	486378	0.51	NEROLIDOL-EPOXYACETATE
22	12.059	1885746	1.97	2H-Pyran-3-ol, tetrahydro-2,2,6-trimethy
23	12.089	2146690	2.25	2H-Pyran-3-ol, tetrahydro-2,2,6-trimethy
24	12.168	5424490	5.68	1-Acetyl-2-(2'-oxo-propyl)-cyclopentane
25	12.206	1022619	1.07	isospathulenol
26	12.257	14290960	14.96	P-MENTH-1-ENE-3,8-DIOL (CIS?)
27	12.340	283519	0.30	Silane, trichlorooctadecyl-
28	12.425	15139450	15.85	Limonene oxide
29	12.485	516786	0.54	3-Buten-2-one, 4-(3-hydroxy-6,6-dimethy
30	12.566	11195158	11.72	.ALPHA.-COPAENE-11-OL
31	12.607	560460	0.59	Cyclohexanemethanol, 4-ethenyl-.alpha.,
32	12.680	456727	0.48	3a(1H)-Azulenol, 2,3,4,5,8,8a-hexahydro
33	12.738	5591110	5.85	(-)-Spathulenol (CAS) 1H-Cycloprop[e]a
34	12.822	1274839	1.33	NEROLIDOL-EPOXYACETATE
35	12.850	722521	0.76	.ALPHA.-BISABOLOLOXIDE-B
36	12.912	2780491	2.91	2H-Pyran-3-ol, tetrahydro-2,2,6-trimethy
37	12.982	341728	0.36	Limonene oxide
38	13.060	183535	0.19	2H-Pyran-3-ol, tetrahydro-2,2,6-trimethy
39	13.148	1611388	1.69	(E)-SOLANONE
40	13.399	1499700	1.57	LIMONENE DIOXIDE 4
41	13.436	776274	0.81	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,;
42	13.547	326512	0.34	AROMADENDRENEPOXIDE-(II)
43	13.640	363288	0.38	Kauran-18-ol, 17-(acetyloxy)-, (4.beta.)-
44	14.023	1167626	1.22	7-Oxabicyclo[4.1.0]heptane, 1-methyl-4-
45	14.237	319993	0.33	1H-2,8a-Methanocyclopenta[a]cycloprop
46	14.346	1470244	1.54	E-15-Heptadecenal
47	14.957	184925	0.19	1-Cycloheptene, 1,4-dimethyl-3-(2-methy
48	15.369	367661	0.38	1-Hexadecanol (CAS) Cetal
49	15.551	276596	0.29	7-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-
50	15.660	283589	0.30	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-
51	16.777	531389	0.56	Trifluoroacetoxy hexadecane
52	18.678	239060	0.25	Methyl (Z)-5,11,14,17-eicosatetraenoate
53	18.955	410890	0.43	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide
54	19.499	403756	0.42	1-Docosanol (CAS) Behenic alcohol
55	19.600	112429	0.12	Epi-.beta.-santalol
56	19.755	1550746	1.62	4a,7,7,10a-Tetramethyldodecahydrobenz

Peak#	R. Time	Area	Area%	Name
57	20.201	112395	0.12	4-Isopropenyl-4,7-dimethyl-1-oxaspiro[2
58	20.424	366813	0.38	1-Docosanol (CAS) Behenic alcohol
59	20.567	327825	0.34	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydrox
60	20.670	138224	0.14	Naphthacene, octadecahydro-2-octyl- (C.
61	20.947	210593	0.22	VERIDIFLOROL
62	21.150	576792	0.60	Andrographolide
63	21.286	207013	0.22	Trifluoroacetoxy hexadecane
64	21.384	990212	1.04	POLYALTHIC ACID
65	22.549	338992	0.35	erythro-9,10-Dibromopentacosane
66	23.129	1102861	1.15	hydroxy-valerenic acid
67	24.849	2282087	2.39	ISO-VELLERDIOL
68	26.527	856650	0.90	Tocopherol-.beta.-tms-derivative (high m
69	27.966	2281930	2.39	Vitamin E
70	32.136	2545722	2.66	.gamma.-Sitosterol
		95535916	100.00	