



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL

MARIA TAMIRES ALVES ESPINDOLA

**Potencial antimicrobiano de *Byrsonima sericea* DC. sobre patógenos
causadores de mastite caprina**

Recife-PE

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL

MARIA TAMIRES ALVES ESPINDOLA

**Potencial antimicrobiano de *Byrsonima sericea* DC. sobre patógenos
causadores de mastite caprina**

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Keila Aparecida Moreira

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Gregório Vieira
Aquino

Recife-PE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

E77p

Espindola, Maria Tamires Alves

Potencial antimicrobiano de *Byrsonima sericea* DC. sobre patógenos causadores de mastite caprina /
Maria Tamires Alves Espindola. - 2021.
67 f. : il.

Orientador: Keila Aparecida Moreira.

Coorientador: Pedro Gregorio Vieira Aquino.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
Bióciência Animal, Recife, 2021.

1. Extratos vegetais. 2. metabólitos secundários. 3. potencial antimicrobiano. 4. murici. I. Moreira, Keila
Aparecida, orient. II. Aquino, Pedro Gregorio Vieira, coorient. III. Título

CDD 636.089

MARIA TAMIRES ALVES ESPINDOLA

Potencial antimicrobiano de *Byrsonima sericea* DC. sobre patógenos causadores de mastite caprina

Defesa apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Keila Aparecida Moreira – (UFAPE)

Prof. Dr. Marcelo Mendonça – UFAPE
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Rosângela Estevão Alves Falcão UPE/Garanhuns
Universidade de Pernambuco – Campus Garanhuns

Prof. Dr. José Erick Galindo Gomes (Suplente) – UNORP
Centro Universitário do Norte Paulista

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha família, por todo o apoio nessa jornada, e a minha avó Josefa Espindola (*in memorian*) e tia Carmem Espindola (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar em todos os momentos, por conceder força perante as dificuldades e pelas pessoas que colocou em meu caminho, que foram imprescindíveis durante este percurso, pois nenhum ser humano cresce sozinho.

Agradeço aos meus orientadores, Keila Moreira e Pedro Aquino pelas orientações e suportes, pelo empenho em buscar alternativas que melhorassem o trabalho.

Agradeço ao Grupo de Pesquisa em Substâncias Bioativas, em especial a Larice Bruna, Edson Flávio e Wellington, pela ajuda durante o período que estiveram no laboratório. Também não poderia deixar de citar Michelle Almeida, Maria Luíza e Lucas que conheci no início dos ensaios, que também estiveram a disposição para o que precisasse. Emília Brito, no período de adaptação, quando cheguei no laboratório.

Agradeço a UPE, Instituição que auxiliou nesse período de pandemia, em que os imprevistos se tornaram mais desafiadores de conciliar.

Agradeço a Nabuêr Silva, Sammara Correia e Gisele Nayara pela torcida e pelas palavras de encorajamento.

Agradeço a banca Marcelo Mendonça, Rosângela Falcão e José Erick Gomes por contribuírem com este trabalho por meio de suas considerações e sugestões.

Agradeço a UFAPE, por possibilitar o acesso aos laboratórios e equipamentos, e ao Programa de Pós - Graduação em Biociência Animal da UFRPE por todas as experiências adquiridas no decorrer do mestrado.

Agradeço a FACEPE e CAPES, pelo auxílio financeiro para que fosse possível desenvolver este trabalho.

Em um período de pandemia, tudo se tornou mais dificultoso, muitos desafios apareceram, e ter o apoio direto e indireto de quem acompanhou de perto ou de longe ajudou para que estivesse concluindo esse ciclo, então, obrigada a todos.

EPÍGRAFE

“Os benefícios da ciência não são para os cientistas, e sim para a humanidade!”

Louis Pasteur

RESUMO

A mastite é uma doença de origem infecciosa, caracterizada pela inflamação da glândula mamária, ocasionada principalmente por infecções decorrentes em sua maioria por bactérias, principalmente *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Esses microrganismos vêm adquirindo cada vez mais resistência as drogas antimicrobianas atuais, tornando-se necessário o desenvolvimento de novos compostos capazes de inibi-los. As plantas são fontes naturais que apresentam potencial antimicrobiano pertinente a investigação, como é o caso das espécies de *Byrsonima*, conhecidas popularmente por muricis, com aplicações na medicina popular. O objetivo deste trabalho foi analisar o potencial antimicrobiano de extratos e frações das folhas e galhos de *Byrsonima sericea* DC frente *Streptococcus agalactiae* e espécies de *Staphylococcus* causadores de mastite. Foram produzidos extratos etanólicos das folhas e galhos, e destes as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e aquosa. Os extratos brutos e as frações foram submetidos a testes antimicrobianos pelo método de difusão em ágar e os que apresentaram atividade foram submetidos ao teste antimicrobiano por microdiluição. Os resultados demonstraram que os extratos brutos e as frações aquosa e acetato de etila foram ativos frente todas as espécies microbianas testadas, pelo teste de difusão em ágar, com halos de 11 a 23 mm para os extratos etanólicos das folhas e galhos, nas concentrações de 25, 50 e 100mg/mL e de 7,6 a 13,6 mm para as frações nas concentrações de 5 a 25mg/mL. No ensaio por microdiluição não foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM), mas ainda assim foi evidenciado atividade antimicrobiana frente a maioria das bactérias testadas pelos extratos e frações, com exceção apenas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A maior atividade foi evidenciada das frações acetato de etila, com 95% e aquosa, com 100% de inibição na concentração de 0,195mg/mL das folhas sobre *Staphylococcus chromogenes*. Diante da necessidade de encontrar novos compostos que atuem sobre patógenos que demonstram resistência aos fármacos convencionais, e a espécie de planta ter demonstrado ação antimicrobiana torna-a de interesse para pesquisas progressivas.

Palavras chaves: Extratos vegetais; metabólitos secundários; potencial antimicrobiano, murici.

ABSTRACT

Mastitis is an infectious disease characterized by an inflammation of the mammary gland, caused mainly by infections resulting mostly from the bacteria *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. These microorganisms are becoming increasingly resistant to current antimicrobial drugs, making it necessary to develop new compounds capable of inhibiting them. Plants are natural sources that have antimicrobial potential relevant to research, as is the case of *Byrsonima* species, popularly known as muricis, with applications in folk medicine. The objective of this work is to analyze the antimicrobial potential of extracts and fractions of leaves and branches of *Byrsonima sericea* DC against *Streptococcus agalactiae* and species of *Staphylococcus* that cause mastitis. Ethanol extracts were produced from leaves and branches, and from these extracts the hexane, chloroform, ethyl acetate and aqueous fractions were produced. The crude extracts and fractions were subjected to antimicrobial tests by the agar diffusion method and those that showed activity were subjected to the antimicrobial test by microdilution. The results showed that the crude extracts and the aqueous and ethyl acetate fractions were active against all the microbial species tested, by the agar diffusion test, with halos from 11 to 23 mm for the ethanolic extracts of the leaves and branches, in the concentrations of 25, 50 and 100mg / mL and from 7.6 to 13.6 mm for fractions in concentrations of 5 to 25mg / mL. In the microdilution test, it was not possible to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), but it was still found antimicrobial activity against most of the bacteria tested by the extracts and fractions, with the exception of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 only. ethyl acetate, with 95% and aqueous, with 100% inhibition in the concentration of 0.195mg / mL of the leaves on *Staphylococcus chromogenes*. Given the need to find new compounds that act on pathogens that demonstrate resistance to conventional drugs, and the plant species having demonstrated antimicrobial action makes it of interest for progressive researches.

Key words: Plant extracts; secondary metabolites; antimicrobial potential, murici.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Árvore do Bioma Cerrado <i>Byrsonima sericea</i> (A), componentes florais de <i>Byrsonima sericea</i> (B) e frutos de <i>Byrsonima sericea</i> (C).....	30
Fluxograma 1A. Rendimentos do extrato etanólico e frações das folhas de <i>Byrsonima sericea</i>	47
Fluxograma 1B. Rendimento do extrato etanólico e frações dos galhos de <i>Byrsonima sericea</i>	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Teste de difusão em ágar por poço dos extratos etanólicos das folhas e galhos de *Byrsonima sericea* DC frente bactérias causadoras de mastite.....49
- Tabela 2. Resultados dos testes de difusão em ágar por poço das frações hexânicas, clorofórmicas, acetato de etila e aquosa, originadas dos extratos etanólicos das folhas e dos galhos.51
- Tabela 3. Porcentagem de inibição microbiana, pelo método de microdiluição com leitura por D.O. de extratos etanólicos e frações acetato de etila e aquosa das folhas e galhos de *Byrsonima sericea*.54
- Tabela 4. Avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição dos extratos etanólicos e frações acetato de etila e aquosa, oriundas das folhas e galhos de *Byrsonima sericea* com resazurina.56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais atividades biológicas analisadas em espécies de *Byrsonima*. .30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 MASTITE CAPRINA	17
2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>Byrsonima</i> spp. (MALPIGHIACEAE)	20
2.3 Características de <i>Byrsonima sericea</i> DC.	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos	31
4. REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 1	39
Potencial antimicrobiano de <i>Byrsonima sericea</i> DC. frente <i>Staphylococcus</i> spp e <i>Streptococcus agalactiae</i> causadoras de mastite	39
RESUMO.....	40
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAL E MÉTODOS	43
Preparação dos extratos vegetais	43
Teste antimicrobiano por difusão em ágar	44
Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	45
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO	57
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura remete a criação de animais ruminantes de pequeno porte, dos quais se explora a carne, a pele e o leite, que fazem parte da obtenção de renda de uma parcela dos produtores rurais (COSTA; LACERDA; FREITAS, 2010). A criação de caprinos, cuja maior incidência se dá em regiões áridas e semiáridas, tem relevância econômica principalmente na região Nordeste do Brasil, uma vez que a criação desses animais não se restringe a subsistência do agricultor de pequeno porte, como também os seus produtos têm auferido espaço nos grandes centros urbanos (SILVA *et al.*, 2015).

Uma problemática que interfere na rentabilidade leiteira desses animais é a mastite, doença caracterizada pela inflamação da glândula mamária, que causa queda de produção e qualidade do leite, o que se reflete em perdas econômicas. A depender do quadro clínico a mastite pode ser classificada em clínica, onde a sintomatologia é evidente, e subclínica, a qual os sinais clínicos muitas vezes não são evidenciados (ZHAO *et al.*, 2015).

Na mastite clínica o animal pode apresentar febre, o úbere pode demonstrar aumento de temperatura ou dor, além de alterações visíveis no leite. Na mastite subclínica, não há demonstração clara da doença no animal, apenas no leite que sofre redução de quantidade e qualidade (RUIZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2016). A mastite pode ter várias causas como traumas, agentes tóxicos e processos alérgicos, mas a principal é por infecções (GARCIA; CAMARGO - JUNIOR; SILVA, 2019), sendo *Staphylococcus* spp. os de maior prevalência principalmente *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes* e *S. simulans*, *S. caprae* e *Streptococcus agalactiae* (CONTRERAS *et al.*, 2003; NEVES *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2014).

No que se refere aos agentes causadores de mastite em caprinos, os *Staphylococcus* coagulase negativa são responsáveis por cerca de 71% dos casos subclínicos e *S. aureus* cerca de 8%. Enquanto que, na mastite clínica *S. aureus* é a espécie mais frequente (BERGONIER *et al.* 2003). Essa espécie inclusive, produz toxinas que podem se tornar presentes no leite e seus derivados promovendo intoxicação alimentar em humanos. Além disso, *Staphylococcus* spp. apresentam a capacidade de formar biofilme o que torna ainda mais difícil sua eliminação do tecido

mamário (KREWER *et al.*, 2014). Isso porque o biofilme, que são uma comunidade microbiana séssil envolta por uma matriz de polímeros extracelulares, confere maior resistência a ação de antimicrobianos, atrelado a uma barreira física que a camada de exopolissacarídeos fornece, e impossibilita a penetração dos fármacos. A formação de biofilme confere uma resistência microbiana de 10 a 1000 vezes maior a estes que na forma planctônica (SHAH *et al.*, 2019).

Para o tratamento da mastite são utilizados antibióticos, como cefalexina, cefapirina, amoxicilina, cloroxicilina e eritromicina (LANGONI, *et al.*, 2017), todavia, o surgimento de cepas multirresistentes tem sido um problema ao limitar as opções de tratamento e trazer impactos financeiros, bem como para a saúde pública. Diante dos quadros de resistência busca-se novas alternativas que possibilitem o desenvolvimento de novas drogas de ação antimicrobiana, e produtos naturais como plantas, tem estado entre os alvos de investigação (ABDALHAMED; ZEEDAN; ZEINA, 2018). Estudos tem demonstrado que os principais compostos de interesse farmacológico em plantas fazem parte dos metabólitos secundários, que lhes conferem defesa contra herbívoros, patógenos e luz UV. Esses metabólitos demonstraram, dentre as atividades biológicas, ação antimicrobiana e anticancerígena (SHITAN, 2016), como os flavonóides como antocianinas, isoflavonóides e glicosídeos de flavonóis, e alcalóides como vincristina e vimblastina (FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012).

A análise de plantas utilizadas dentro do conhecimento popular é de grande valor, pois direciona a um estudo mais propício a descoberta de inúmeros compostos. Neste contexto a etnofarmacologia atua como uma ferramenta de informação que é trabalhada em paralelo com testes laboratoriais (ABO-EL-SOUD, 2018; COSTA *et al.*, 2018). Dentre as plantas de interesse farmacológico, estão as espécies de *Byrsonima*, as quais Santos *et al.* (2012), baseados no conhecimento da medicina popular de comunidades que habitam o Cerrado, apontaram suas aplicações no combate a febres, infecções na pele, dor de estômago, diarreia e disenteria, usado também como diurético e antiasmático.

As espécies de planta do gênero *Byrsonima*, fazem parte da família Malpighiaceae e são conhecidas popularmente por murici, comportam aproximadamente 150 espécies, sendo 50% delas encontradas no Brasil, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, em áreas de Cerrado

(GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). Michelin *et al.* (2008), retrataram o Cerrado brasileiro como diversificado em sua flora, e que esta compõe a medicina natural no tratamento de diversas enfermidades como: esquistossomoses, leishmanioses, malárias e infecções microbianas.

Sobre estudos de espécies que pertencem ao gênero *Byrsonima*, a espécie *Byrsonima sericea* DC está entre as que apresenta atividades biológicas promissoras, a qual demonstrou elevada ação antioxidante, gastroprotetora e antidiarreica no trabalho de Rodrigues *et al.* (2019), o que está associado principalmente a presença de compostos fenólicos encontrados nos extratos do mesmo.

Fraige *et al.* (2018), identificaram a composição química de diferentes espécies de *Byrsonima*, dentre as quais estão as proantocianidinas, que podem atuar como antioxidante através da eliminação de radicais livres, quelação de determinados metais e inibição de algumas enzimas. No trabalho de Andrade *et al.* (2018), foi relatada ação antimicrobiana sobre *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* e antioxidante pelo extrato etanólico da casca de *B. crassifolia*, o efeito antifúngico e antioxidante estão atrelados aos metabólitos secundários da planta como flavonoides, compostos fenólicos, taninos, antraquinonas e triterpenos.

Efeito antimicrobiano também foi analisado no trabalho de Santos *et al.* (2019), de *Byrsonima intermedia* sobre *Helicobacter pylori* com extratos acetato de etila e aquoso das folhas. Rodrigues *et al.* (2012), analisaram o efeito gastroprotetor de folhas de *Byrsonima sericea* e identificaram a presença de rutina, isoquercitrina, 3-O-rutinosideo-canferol e quercetina, que são flavonoides com propriedades antioxidantes e gastroprotetora.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MASTITE CAPRINA

A região Nordeste alberga em torno de 92,81% da criação de rebanhos caprinos no Brasil (FILHO *et al.*, 2019), e embora a criação de caprinos seja maior nesta região, outras regiões estão envolvidas no que diz respeito a produção de leite desses animais, sendo estas Sul e Sudeste. A caprinocultura leiteira proporciona renda a pequenos agricultores e compõe uma importante fonte alimentar para idosos e crianças (LUCENA *et al.*, 2018).

No mundo todo houve aumento na produção de cabras leiteiras nas duas últimas décadas, o valor nutricional do leite foi o atrativo que culminou no aumento da criação desses animais (NABIH *et al.*, 2018). O leite de cabra é nutricionalmente similar ao leite humano e menos alergênico que o leite bovino (ZHAO *et al.*, 2015; NABIH *et al.*, 2018), além de possuir alta digestibilidade, devido ao tamanho dos glóbulos de gordura, os ácidos graxos serem de cadeia curta e apresentar proteínas de importância biológica (LUCENA *et al.*, 2018), contém vitamina A, um teor maior de minerais e menor teor de lactose (LIMA *et al.*, 2018).

Os produtores de caprinos, todavia, se deparam com interferentes negativos tais como a mastite, que promove danos econômicos devido a necessidade de descarte do leite, depreciação da quantidade e qualidade do leite e seus derivados, custos com medicação e assistência veterinária, além de trazer riscos à saúde pública. A redução do leite pode variar de 55 a 132 kg/ano (MACHADO *et al.*, 2018), sendo que, o agravamento da mastite pode levar a perda total da capacidade secretora da glândula mamária o que acarreta o descarte precoce dos animais acometidos (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

A mastite é caracterizada como uma inflamação da glândula mamária, sendo decorrente, geralmente, de infecções bacterianas ou fúngicas (menos comum), e a depender do quadro pode ser clínica ou subclínica. A forma clínica demonstra sinais clínicos visíveis, como edema, elevação de temperatura, endurecimento da glândula mamária, e presença de grumos ou pus no leite. A manifestação subclínica é mais sutil, sendo detectada por alterações no leite como, elevação da contagem de células

somáticas, de íons cloreto e sódio, redução de caseína, lactose e gordura (SOUZA *et al.*, 2019).

Dentre as formas de analisar se o animal apresenta mastite estão os métodos indiretos, que analisam a evolução e a intensidade da reação inflamatória, e os métodos diretos, que consistem na identificação do agente etiológico. As principais metodologias são a contagem indireta de células somáticas (CCS) no leite, por meio da utilização do teste *California Mastitis Test* (CMT), contagem direta de células somáticas por via de equipamentos eletrônicos, geralmente associadas a técnicas microbiológicas como lactocultura, isso porque em caprinos a CCS é alta mesmo quando não há infecção, a associação das técnicas promove, portanto, uma confiabilidade maior dos dados (COSTA *et al.*, 2013; ACOSTA *et al.*, 2016).

Os agentes causadores da mastite são agrupados em contagiosos e ambientais. O primeiro se refere a microrganismos que se estabelecem sobre ou no interior da glândula mamária, onde a transmissão pode ocorrer de um animal para outro, assim como também de um teto a outro através da ordenha. Os agentes ambientais estão presentes no mesmo meio que os animais e a infecção ocorrem através de ordenhas, sendo o animal acometido quando a imunidade está baixa ou quando as condições higiênicas sanitárias não são adequadas (ACOSTA *et al.*, 2016).

Os principais patógenos envolvidos na mastite de ruminantes de pequeno porte e em bovinos são *Staphylococcus* spp., e *Streptococcus* spp., (CENITI *et al.*, 2017). O tratamento se dá pelo uso de antibióticos, todavia, o uso frequente destes no tratamento e prevenção tem como impacto negativo o aumento da resistência tanto para bactérias comensais quanto patógenos oportunistas (ARMAS; CAMPERIO; MARIANELLI, 2017).

Lima *et al.* (2018), analisaram amostras de cabras leiteiras acometidas de mastite clínica e subclínica, e identificaram como as cepas mais prevalentes *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *S. saprophyticus* e *S. caprae* respectivamente, onde as espécies de *Staphylococcus* revelaram resistência a tetraciclina e antimicrobianos da classe de beta-lactâmicos como penicilina, ampicilina, oxacilina. Ainda de acordo com os autores ocorreram isolados que revelaram resistência múltipla a antibióticos principalmente pelas espécies *E. coli* e *S. aureus*.

As espécies *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) estão relacionadas a mastite subclínica persistente, sendo estas menos patogênicas que *Staphylococcus aureus*, no entanto, as estirpes de SCN podem apresentar maior resistência em relação a esta espécie, inclusive a antimicrobianos aplicados em medicina veterinária, relacionadas a mastite bovina. Em ensaio realizado com isolados de SCN e SCP (*Staphylococcus* coagulase positiva) oriundos de leite de caprinos mastíticos, foi analisado que mais de 50% destes demonstraram resistência a penicilina (81,8%), oxacilina (60,0%) e ampicilina (55,5%), sendo que não houve diferença significativa de sensibilidade e resistência entre SCN e SCP, exceto com tetraciclina, em que SCP foram mais resistentes que SCN (SALABERRY *et al.*, 2016).

Os antimicrobianos beta-lactâmicos estão entre os mais utilizados no combate a infecção em quadros de mastite, principalmente causadas por *Staphylococcus* spp. O uso frequente de antibióticos, no entanto, promoveu a seleção de cepas resistentes, e a resistência desses microrganismos está relacionada a estes produzirem enzimas beta-lactamases que promovem hidrólise do anel beta-lactâmico tornando a penicilina ineficaz. Outro mecanismo de resistência de *Staphylococcus* spp., a antibióticos como meticilina e oxacilina, está atrelada com alterações no sítio da ação da droga através da produção de uma proteína de ligação à penicilina de baixa afinidade (PBP2a). Outro mecanismo e que confere resistência a diferentes classes de antibióticos é quando há bombas de efluxo na membrana plasmática da bactéria que permite a expulsão de compostos nocivos a esta (KREWER *et al.*, 2014).

Outro mecanismo de resistência é a capacidade que determinados microrganismos tem em formar biofilme. A formação do biofilme ocorre com a adesão das formas planctônicas a uma superfície, posteriormente ocorre proliferação até a formação de camadas celulares que compõem uma comunidade microbiana que são submergidas por uma matriz de exopolissacarídeo, produzidas por estas mesmas. O biofilme pode ser composto por uma ou múltiplas espécies. Quando a formação é heterogênea os produtos metabolizados por uma espécie atuam como suporte para as demais (COSTA *et al.*, 2016).

O desenvolvimento de biofilme microbiano pode se dar em superfícies inertes ou de seres vivos. Em quadros de mastite, o antibiótico só consegue atuar em células planctônicas e alguns antimicrobianos, como gentamicina e enrofloxacina, podem até estimular a produção de biofilme em concentrações subinibitórias (SILVA *et al.*, 2014),

pois influenciam a expressão de fatores de virulência como adesinas ou toxinas (RACHID *et al.*, 2000).

A formação de biofilme é um fator de virulência que contribui para a invasão e persistência microbiana (DOMENICO *et al.*, 2017), promove uma proteção contra agentes antimicrobianos e o sistema imunológico do hospedeiro (SINGH *et al.*, 2013) através, principalmente, da camada de exopolissacarídeo que age como barreira, impossibilitando contato de agentes nocivos externos com os microrganismos (SHAH *et al.*, 2019). O biofilme, portanto, eleva a resistência aos produtos comumente utilizados no tratamento de mastite, o que torna necessário o desenvolvimento de novos fármacos (SANTOS H. *et al.*, 2019).

Um dos alvos de estudo no combate a infecções está voltada aos produtos naturais como as plantas, que de modo empírico, já é utilizada na prevenção de doenças e infecções em humanos, e animais domésticos por longa data. Neste contexto, a etnofarmacologia atua como ferramenta de dados e de direcionamento às pesquisas laboratoriais em busca por substâncias bioativas (ABO-EL-SOUD, 2018), inclusive, a literatura revela que extratos vegetais têm demonstrado ação antimicrobiana em testes *in vitro*, o que torna pertinentes pesquisas nessa área (SHARMA *et al.*, 2017).

2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Byrsonima* spp. (MALPIGHIACEAE)

O uso popular de plantas medicinais no tratamento de enfermidades já era praticado desde antes de Cristo, entretanto, a busca por constituintes ativos só teve início no século XIX, como a morfina, alcaloide isolado da papoula em 1806 por Friedrich Serturmer, o que instigou desde então a procura por outros constituintes químicos de valor medicinal em plantas (DUTRA *et al.*, 2016). Dentre as plantas de uso no tratamento de enfermidades, das quais se estuda suas propriedades estão as espécies de *Byrsonima*, como *B. verbascifolia*. Através de infusões das folhas são utilizadas para tratar diarreias e infecções intestinais, e como protetor da mucosa intestinal. Também é feita infusão das raízes direcionadas a outros acometimentos, por exemplo, em feridas crônicas e doença de Chagas, afecções da cavidade oral e garganta (MENDANHA *et al.*, 2010).

A família Malpighiaceae distribui-se em áreas de clima tropical e subtropical, e abriga em torno de 1300 espécies e 75 gêneros, do qual *Byrsonima* faz parte, sendo um dos maiores gêneros com 150 espécies, e o Brasil abriga 50% dessa totalidade, distribuído principalmente nas regiões, Norte, Nordeste e Centro-Oeste em áreas de Cerrado (ANDERSON, 2013).

As espécies possuem como características comuns serem geralmente arbóreas, com galhos retorcidos e porte médio, podendo apresentar até cinco metros de altura (PEREIRA, 2011). Espécies de *Byrsonima* tem uma diversificação de aplicações, como na construção civil, do qual se utiliza sua madeira para obtenção de caibros e vigas; foram utilizadas em curtumes para tingir tecidos devido a rica presença de taninos, e os frutos são utilizados como fonte de alimento *in natura* e na forma de doces e bebidas (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). No país essas espécies são conhecidas popularmente como murici e são empregadas na medicina popular (SALDANHA; SOARES, 2015).

Diversas espécies de *Byrsonima* tem aplicações empíricas, tais como *Byrsonima sericea* DC, usada para febre, diarreia, doenças renais e sífilis, com a decocção da casca do caule (SILVA *et al.*, 2016), a folha é usada como antidiarreico e contra diabetes (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). A casca do caule de *Byrsonima intermedia* A. Juss. é utilizada na forma de decocção como adstringente e béquico, por decocção as folhas de *Byrsonima variabilis* A. Juss. são administradas como adstringente e febrífugo (MESSIAS *et al.*, 2015).

As cascas de *Byrsonima crassifolia* e *B. coccolobifolia* são atribuídas na medicina popular no tratamento de distúrbios digestivos e anti-inflamatório, inclusive inflamações uterina e renal, o uso se dá na forma de chá (OLIVEIRA; SCUDELLER; BARBOSA, 2017). As propriedades medicinais dessas espécies estão atreladas a metabólitos secundários presentes em suas estruturas vegetais como folhas, cascas e frutos, tais como taninos, proantocianidinas, saponinas, triterpenos, entre outros (AMÂNCIO *et al.*, 2020).

No que remete a estudos voltados as atividades biológicas das espécies de *Byrsonima*, estão atividade antimicrobiana, como no estudo de Michelin *et al.* (2008), com as espécies *B. basiloba*, *B. intermedia* e *B. fagifolia* que apresentaram ação frente a todas as cepas testadas, sendo estas *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella* spp, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella* spp

e *Candida albicans*, por meio dos extratos metanólicos das folhas. Além destes, o extrato clorofórmio foi testado, mas não demonstrou atividade.

As mesmas espécies foram estudadas por Higushi (2007), acrescido *Byrsonima crassa*, com os extratos clorofórmicos e as frações: hexânica, diclorometânica e metanólica das folhas com as quais analisou-se o índice de citotoxicidade em macrófagos murinos J774 e o potencial antimicrobiano frente *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294). Os melhores resultados foram demonstrados pelas frações diclorometano de *B. fagifolia* e *B. basiloba*, em contraste a fração diclorometânica de *B. crassa*, hexânica e extrato bruto clorofórmico de *B. intermedia* apresentaram-se mais tóxicos que ativos, ou seja, maior citotoxicidade e menor atividade antimicrobiana.

Das espécies citadas acima, *B. intermedia* também foi analisada quanto ao seu potencial antimicrobiano, frente *Helicobacter pylori* ATCC 43504, e seu efeito gastroprotetor através do uso das folhas por Santos *et al.* (2019). Os autores realizaram testes utilizando partições aquosas e de acetato de etila, providas do extrato metanólico, dos quais analisou que houve ação antimicrobiana e efeito gastroprotetor, este último foi verificado em ratos Wistar, onde as partições foram utilizadas nestes e, posteriormente foram submetidos a compostos que induzem a lesões gástricas e duodenais. Foi observado redução significativa de lesões gástricas por ambas as partições, mas somente a fração aquosa foi capaz de diminuir lesões duodenais.

Quando analisado o extrato metanólico da folha por Santos *et al.* (2012), o efeito gastroprotetor também foi significativo, chegou a reduzir em 50% lesões promovidas por HCl/etanol, 54% por AINE (anti-inflamatórios não esteroide) e em 97% derivadas de etanol absoluto. Atividades antimicrobianas também foram detectadas para *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Outra espécie analisada quanto a seu efeito gastroprotetor foi *B. sericea* por Rodrigues *et al.* (2012). Na medicina popular as folhas dessa espécie são usadas para desordens gastrointestinais, então os autores as utilizaram por meio de extrato metanólico para realizarem ensaios *in vivo* em camundongos. O extrato, em diferentes dosagens, foi administrado por via oral, e após um intervalo de tempo, utilizou-se etanol para promover danos gástricos. Os resultados foram promissores no sentido que as lesões foram atenuadas acentuadamente. Rodrigues *et al.* (2019), analisaram

novamente o potencial gastroprotetor das folhas dessa espécie, através de extratos etanólicos e houve redução significativa de lesões gástricas. Além disso, demonstrou elevada ação antioxidante, semelhante ao controle positivo.

Com esta e com outras espécies, *B. intermedia*, *B. coccolobifolia* e *B. verbascifolia*, Fraige *et al.* (2018), analisaram, por meio dos extratos metanólico e acetato de etila de suas folhas, atuação antioxidante com os radicais DPPH, ABTS e ROO (radical peróxido), todos os extratos foram capazes de eliminar os radicais livres, sendo os melhores resultados obtidos pelos extratos metanólico, dos quais *B. sericea* obteve o melhor desempenho frente a DPPH e ABTS.

Guilhon-Simplicio *et al.* (2012) trabalharam com o extrato aquoso da casca do caule de *B. japurensis*, a qual demonstrou efetiva em testes antioxidantes frente a radicais superóxido. A ação antioxidante pode estar envolvida no efeito anti-inflamatório, com atuação antiedematogênico e anti-hiperalgésico, também demonstrado em ensaios. Além destes, outros testes foram realizados, os quais mostraram que houve atividade antiplaquetária e antiulcerativa. Os autores também buscaram analisar a toxicidade do extrato, em ratos Wistar, que revelou efeitos como redução da atividade motora, aumento da frequência cardíaca e respiratória, diminuição da defecação, micção e apetite, todavia, não houve morte de nenhum animal.

Outras espécies foram analisadas por Guilhon-Simplicio *et al.* (2017), *Byrsonima crispera*, *Byrsonima duckeana*, *Byrsonima garcibarrigae* e *Byrsonima incarnata*, este estudo avaliou atividades antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva através dos extratos aquosos das cascas dos caules. Os testes antioxidantes foram realizados com DPPH, ABTS e superóxido. Com exceção de *B. crispera* em ensaios com DPPH e superóxido e *B. garcibarrigae* com DPPH, os demais extratos obtiveram êxito similar aos controles positivos ácido gálico e quercetina. A atividade anti-inflamatória *in vitro*, por ensaio de macrófagos induzido por lipopolissacarídeo (LPS) e *in vivo*, com aplicação de injeção com formalina em camundongos, demonstrou que todos os extratos apresentaram forte atuação em reduzir a liberação de óxido nítrico pelos macrófagos. E que as espécies *B. duckeana*, *B. garcibarrigae*, e *B. incarnata*, apresentaram atividade antinociceptiva, mas que somente *B. duckeana* e *B. garcibarrigae* reduziram o edema, e apenas *B. garcibarrigae* foi efetiva na fase tardia.

Testes antioxidantes, antinociceptivos e anti-inflamatórios também foram submetidos a espécie *B. crassifolia* por Pompeu *et al.* (2012), o qual utilizaram extrato hidroalcólico de suas folhas. A ação antioxidante apresentou-se elevada pelo método da capacidade de absorbância do radical de oxigênio (ORAC), já a ação antinociceptiva foi pouco efetiva, obtendo resultado apenas na dosagem mais elevada, em ensaios *in vivo*. Quanto a atividade anti-inflamatória, esta demonstrou-se ineficaz. Em outros ensaios realizados como atividade antiulcerogênica, houve resultados efetivos em todas as dosagens. No entanto, a eficiência do extrato foi baixa quanto a atividade antiproliferativa de linhagens celulares cancerígenas como de mama, rim, e pulmão, cuja citotoxicidade não foi significativa, apresentando efeito apenas na concentração mais elevada. Gellen e Silva (2016), utilizaram extratos aquosos das raízes dessa espécie vegetal para averiguar seu efeito antimicrobiano pelo método de difusão em disco sobre as cepas *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, com exceção desta última, as demais cepas se mostraram sensíveis aos extratos.

As espécies *B. verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. coccolobifolia*, *B. ligustrifolia*, *B. fagifolia* e *B. intermedia* foram analisadas quanto a atividades mutagênicas e antimutagênicas por Espanha *et al.* (2014), através de extratos hidroalcólicos de suas folhas em linhagens de *Salmonella typhimurium*. Das espécies testadas, apenas *B. coccolobifolia* e *B. ligustrifolia*, indicaram atividade mutagênica. No ensaio antimutagênico *B. verbascifolia*, *B. correifolia*, *B. fagifolia* e *B. intermedia* de modo geral apresentaram ação antimutagênica sendo considerados fortemente antimutagênicos *B. verbascifolia* e *B. correifolia* contra a maioria dos mutágenos, *B. fagifolia* e *B. intermedia* apresentaram ação moderada. Os resultados demonstraram que a maioria dos extratos foram promissores como agentes quimiopreventivos.

Extratos clorofórmico e metanólico das folhas de *B. basiloba* também foram submetidas a ensaios referentes a atividade de mutagenicidade e antimutagenicidade por Lira *et al.* (2008). Para o teste de mutagenicidade, foram utilizadas as mesmas linhagens de *Salmonella typhimurium* estudadas por Espanha *et al.* (2014), as quais *B. basiloba* não revelou mutagenicidade positiva em nenhum dos extratos e apresentou ação antimutagênica frente a mutágenos que costumam estar presentes na dieta humana e meio ambiente, em ambos os extratos.

As mesmas espécies que apresentaram atividade antimutagênica no trabalho de Espanha *et al.* (2014), foram testadas por Specian *et al.* (2016) quanto a seu potencial citotóxico, utilizaram do mesmo método para preparação de extratos das folhas dessas espécies. Os extratos foram submetidos as duas linhagens celulares humanas: epitélio gástrico normal e carcinoma hepatocelular (HepG2). *B. correifolia*, e *B. verbascifolia* apresentaram maior efeito citotóxico, *B. fagifolia* e *B. intermedia* demonstraram citotoxicidade mais branda, para ambas as linhagens celulares.

Verdam *et al.* (2017) também submeteram o extrato etanólico e as frações clorofórmica, hexânica e acetato de etila das folhas de *B. duckeana* a análise de atividades biológicas. O extrato etanólico foi analisado quanto a toxicidade em camundongos, e nenhum dos animais testados veio a óbito, assim como também não foi detectado efeitos nocivos a nível macroscópico. Além de não mostrar efeitos tóxicos evidente, este extrato apresentou atividade anti-inflamatória. Outras atividades identificadas foram efeito analgésico, que foi efetivo por parte do extrato etanólico e as frações clorofórmica e acetato de etila, e ação antioxidante, tendo maior atividade as frações clorofórmica e acetato de etila, em teste com DPPH, para o teste com fosfomolibdênio e avaliação da peroxidação lipídica (TBARBS) a fração acetato de etila obteve resultados superiores as demais amostras.

Outra espécie estudada quanto ao potencial citotóxico foi *B. sericea* DC., com diferentes extratos e partições das folhas, caule e frutos da planta frente as linhagens tumorais: HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL60 (leucemia promielocítica humana) (SILVA *et al.*, 2016). A maioria dos extratos e partições obtiveram resultados relevantes, sendo os de maior êxito o extrato hidrometanólico, as partições acetato de etila e hexânica do extrato etanólico das folhas sobre a linhagem HepG2 e HL60. Posteriormente, essas amostras foram submetidas a teste de viabilidade celular com outras linhagens de modo que, os testes foram realizados com decréscimo das concentrações iniciais, e foi observado que os efeitos citotóxicos se mantiveram nas linhagens HepG2 e HL60, além de B16-F10 (melanoma de camundongos) mesmo diminuindo as concentrações, demonstrado assim resultados promissores.

Fraige *et al.* (2018), também analisaram a citotoxicidade de *B. sericea*, assim como realizaram ensaios anti-inflamatório e antioxidantes com esta, e as espécies *B. intermedia*, *B. coccolobifolia*, e *B. verbascifolia*, os ensaios se deram com os extratos metanólico e acetato de etila das folhas das plantas. O teste de citotoxicidade foi

realizado com a linhagem de monócito/macrófagos leucêmicos de camundongos (RAW 264-7) com LPS, a análise de viabilidade celular se deu com MTT. Apenas os extratos metanólicos de *B. intermedia* e *B. sericea* mostraram citotoxicidade na concentração mais alta, mas foram eficientes anti-inflamatórios, nas concentrações menores. A análise da ação anti-inflamatória se deu pela quantificação de NO_2^- e $\text{TNF-}\alpha$. Além destas, os extratos metanólico das demais espécies, assim como os extratos de acetato de etila, desempenharam ação anti-inflamatória, onde os melhores resultados foram das espécies *B. sericea*, seguida de *B. intermedia* e *B. verbascifolia*.

Outra atividade biológica analisada em *Byrsonima sericea* foi ação antimicrobiana, no trabalho de Capinan e Silva (2017), através do óleo floral frente as cepas de *Aspergillus flavus* e *Penicillium* sp, que demonstrou atividade em intervalos de tempo de 24 a 96 horas, neste último a atividade antimicrobiana esteve em 70% para *Aspergillus flavus* e 80% de inibição para *Penicillium* sp, e nos intervalos de 24 e 48 não foi verificado crescimento microbiano. Apesar de demonstrar um resultado promissor, não foram encontradas na literatura outros ensaios antimicrobianos com esta espécie de *Byrsonima*. Estas e outras atividades biológicas com espécies de *Byrsonima* são demonstrados no quadro 1, que segue abaixo.

Quadro 1. Principais atividades biológicas analisadas em espécies de *Byrsonima*.

Espécies de <i>Byrsonima</i>	Atividades Biológicas							Referência
	Ant.micro	Ant.oxi	Gast.p	Cit.	Ant.inf	Mut.	Ant.mut	
<i>B. basiloba</i>	P	---	---	---	---	A	P	Higushi 2007; Michelin <i>et al.</i> , 2008; Lira <i>et al.</i> , 2008
<i>B. intermedia</i>	P	P	P	P	P	A	P	Higushi 2007; Michelin <i>et al.</i> , 2008; Santos <i>et al.</i> 2012; Espanha <i>et al.</i> 2014; Specian <i>et al.</i> 2016; Fraige <i>et al.</i> 2018 e Santos <i>et al.</i> 2019
<i>B. fagifolia</i>	P	---	---	P	---	A	P	Higushi 2007; Michelin <i>et al.</i> 2008; Espanha <i>et al.</i> 2014; Specian <i>et al.</i> 2016
<i>B. crassa</i>	P	---	---	---	---	---	---	Higushi 2007
<i>B. sericea</i>	P	P	P	P	P	---	---	Rodrigues <i>et al.</i> 2012; Silva <i>et al.</i> 2016; Capinan e Silva 2017; Fraige <i>et al.</i> 2018
<i>B. coccolobifolia</i>	---	P	---	---	P	P	---	Espanha <i>et al.</i> 2014; Fraige <i>et al.</i> 2018
<i>B. verbascifolia</i>	---	P	---	P	P	A	P	Espanha <i>et al.</i> 2014; Specian <i>et al.</i> 2016; Fraige <i>et al.</i> 2018
<i>B. japurensis</i>	---	P	P	---	P	---	---	Guilhon-Simplicio <i>et al.</i> 2012
<i>B. crispa</i>	---	P	---	---	P	---	---	Guilhon-Simplicio <i>et al.</i> 2017
<i>B. duckeana</i>	---	P	---	---	P	---	---	Guilhon-Simplicio <i>et al.</i> 2017; Verdam <i>et al.</i> 2017
<i>B. garcibarrigae</i>	---	P	---	---	P	---	---	Guilhon-Simplicio <i>et al.</i> 2017
<i>B. incarnata</i>	---	P	---	---	P	---	---	Guilhon-Simplicio <i>et al.</i> 2017
<i>B. crassifolia</i>	P	P	P	B	A	---	---	Ponpeu <i>et al.</i> 2012; Gellen e Silva 2016
<i>B. correifolia</i>	---	---	---	P	---	A	P	Espanha <i>et al.</i> 2014; Specian <i>et al.</i> 2016
<i>B. ligustrifolia</i>	---	---	---	---	---	P	---	Espanha <i>et al.</i> 2014

P= presente; **A**= ausente; **B**= baixa; ---= não se encontra nas referências citadas; Ant.micro= Antimicrobiana; Ant.oxi= Antioxidante; Gast.p.= Gastroprotetora; Cit.= Citotóxica; Ant.inf. = Anti-inflamatória; Mut.= Mutagênica; Ant.mut= Anti-mutagênica.

Estudos direcionados aos componentes químicos de plantas revelaram suas atuações biológicas, como atividade antioxidante por compostos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonóides e taninos, sendo estes últimos já encontrados em extratos de espécies de *Byrsonima*. Os compostos fenólicos são associados ao potencial antioxidante de extratos vegetais por agirem como agentes redutores, doadores de hidrogênio e quelantes de metais (PEREIRA; BOREL; SILVA, 2015).

Esses compostos também atuam como antimicrobianos, por agirem, por exemplo, alterando a permeabilidade da membrana celular e por se ligar ao DNA de microrganismos e assim inibir atividades celulares (ALVES *et al.*, 2013). Dentre outras atividades, ainda apresentam ação anti-inflamatória e antitumoral, para este último já foi observado inibição da proliferação e indução a apoptose para diferentes tipos de câncer, por estilbenos (AKINWUMI; BORDUN; ANDERSON, 2018).

Outra classe de metabólitos secundários são os alcaloides, estudos como os de Nugraha *et al.* (2019), mostraram que estes desempenham ação antiprotozoária, antitumoral e antimicrobiana, sendo esta, através da intercalação entre a parede celular e o DNA dos microrganismos (DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 2003). Outras atividades relatadas por alcaloides foram anticolinérgico, diurético, simpatomimético, anti-hipertensivo, hipnoanalgésico, antidepressivo, miorelaxante, antiemético e anti-inflamatório (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Dentre os componentes químicos pertinentes estão os terpenos, os quais apresentam ação antiproliferativa chegando a induzir a apoptose em linhagens celulares tumorais (LI *et al.*, 2020). Outras atividades foram relatadas na literatura como anti-inflamatórios, antioxidantes, anticoagulantes, sedativos e analgésicas para os mais variados terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, di-, tri- e tetraterpenos). Os terpenos atuam nas plantas como atrativo a polinizadores, repelente para herbívoros, agentes antimicrobianos e alelopático, sendo que, além fazerem parte dos metabólitos secundários fazem do primário, relacionados a funções esteróis, pigmentos fitossintéticos, dentre outros (TETALI, 2019).

Pereira (2011) demonstrou os metabólitos secundários mais encontrados nas espécies de *Byrsonima*, através do agrupamento de vários achados da literatura. Ácidos fenólicos como ácido gálico foi encontrado em *B. basiloba*, *B. crassifolia*, *B. fagifolia* e *B. intermedia*, galato de metila em *B. crassa*, *B. crassifolia*, *B. fagifolia*, *B. intermedia*, dentre outras, flavonoides e derivados como quercetina em *B. crassa*, *B.*

crassifolia, *B. intermedia* e *B. verbascifolia*, substâncias terpênicas e esteróis como ácido oleanólico e lupeol encontrado em *B. crassifolia*, *B. microphylla*, *B. verbascifolia*.

B. intermedia, *B. coccolobifolia*, *B. verbascifolia* e *B. sericea* DC, mostraram como substâncias químicas em comum: ácido quínico e seus derivados, dímeros de proantocianidinas, catequinas, epicatequina, dentre outras, na identificação dos constituintes químicos por Fraige *et al.* (2018), sendo este o primeiro trabalho que reportou a composição química de *B. sericea* DC.

Diante dos desempenhos promissores em distintos trabalhos com espécies de *Byrsonima*, torna-se relevante mais estudos sobre as mesmas afim de desenvolver futuros fármacos, ao passo que se analisa suas atividades biológicas e seus constituintes químicos.

2.3 Características de *Byrsonima sericea* DC.

O murici, *Byrsonima sericea* é uma espécie vegetal de porte arbóreo (MEDINA; LOUCHARD; GONÇALVES, 2015), taxonomicamente, esta espécie juntamente com as demais do mesmo gênero, pertencem a família Malpighiaceae (ITIS, 2020). Embora não seja endêmica do Brasil, no país é encontrada nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste. A espécie tem como características serem árvores com folhas cartáceas, inflorescência com coloração amarelada para as pétalas e os frutos são drupas que se apresentam verdes quando imaturos (SANTOS; AMORIM; CONCEIÇÃO, 2018). Esta espécie é disseminada principalmente em Goiás, Pernambuco, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, encontrada em áreas de cerrado, restinga, campus rupestres e matas ciliares (MAIA, 2010).

A espécie de *Byrsonima sericea* é demonstrada na figura 1 página seguinte, onde pode ser observado a árvore como um todo e componentes da planta, no caso as flores e frutos.

Figura 1. Árvore do Bioma Cerrado *Byrsonima sericea* (A), componentes florais de *Byrsonima sericea* (B) e frutos de *Byrsonima sericea* (C)



Fonte: (A) www.arvoresdobiomacerrado.com.br; (B) appverde.wordpress.com; (C) <http://www.frutosatrativosdocerrado.bio.br>

A espécie *Byrsonima sericea*, assim como muitas espécies de plantas, tem sido utilizada no combate a enfermidades por populações locais, o uso popular é direcionado ao tratamento de diarreia e diabetes, através do uso da raiz (BOSCOLO; VALLE, 2008), as folhas também são usadas para a mesma finalidade (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). Enquanto que a casca do caule é atribuída ao combate da febre, diarreia, doenças renais e sífilis (SILVA *et al.*, 2016), a folha e a casca também são destinadas a febre, asma e infecções da pele e os frutos, na forma de tônico, são usados para tratar fraquezas (SILVA, *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos e frações das folhas e galhos de *Byrsonima sericea* DC frente a espécies bacterianas relacionadas a mastite caprina.

3.2 Específicos

- Analisar se os extratos etanólico, e as frações hexânica, clorofórmio, acetato de etila e aquosa das folhas e dos galhos têm potencial de inibição, através do método de difusão em ágar, frente as bactérias causadoras de mastite caprina *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus chromogenes*, isoladas de quadros de mastite.
- Avaliar a menor concentração em que os extratos e frações inibem os microrganismos, através do método de microdiluição.

4. REFERÊNCIAS

- ABDALHAMED, A.M.; ZEEDAN, G.S.G.; ZEINA, H.A.A.A. Isolation and identification of bacteria causing mastitis in small ruminants and their susceptibility to antibiotics, honey, essential oils, and plant extracts. **Veterinary World**, v.11, p.355-362, 2018.
- ABO-EL-SOUD, K. Ethnoveterinary perspectives and promising future. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v.6, p.1-7, 2018.
- ACOSTA, A. C.; SILVA, L.B.G.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JÚNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.7, p.565-573, 2016.
- AKINWUMI, B.C.; BORDUN, K.M.; ANDERSON, H.D. Biological activities of stilbenoids. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.792, p.1-25, 2018.
- ALVES, M.J.; FERREIRA, I.C.F.R.; FROUFE, H.J.C.; ABREU, R.M.V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**, v.115, p.346-357, 2013.
- AMÂNCIO, B.C.S.; GOVÊA, K.P.; TRINDADE, L.O.R.; NETO, A.R.C.; SOUZA, T.C.; BARBOSA, S. Sandwich method applied to the screening of allelopathic action in *Byrsonima* spp. (Malpighiaceae). **Biologia**, v.75, p.175-182, 2020.
- ANDERSON, W.R. Origins of mexican Malpighiaceae. **Acta Botanica Mexicana**, v.104, p.107-156, 2013.
- ANDRADE, B.S.; MATIAS, R; CORRÊA, B.O.; OLIVEIRA, A.K.M.; GUIDOLIN, D.G.F. ROEL, A.R. Phytochemistry, antioxidant potential and antifungal of *Byrsonima crassifolia* on soil phytopathogen control. **Brazilian Journal Biology**, v.78, n.1, p.140-146, 2018.
- ARMAS, F.; CAMPERIO, C.; MARIANELLI, C. *In vitro* assessment of the probiotic potential of *Lactococcus lactis* LMG 7930 against ruminant mastitis-causing pathogens. **PLOS ONE**, v.12, n.1, p.1-13, 2017.
- Árvores do Bioma Cerrado. Disponível em: <http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2018/07/11/byrsonima-sp-indet-1/>
Acesso em 18 de novembro de 2020.
- BERGONIER, D.; CRÉMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFOUL, G.; BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v.34, p.689-716, 2003
- BOSCOLO, O.H.; VALLE, L.S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v.63, n.2, p.263-277, 2008.
- CAPINAN, W.; SILVA, M. Avaliação preliminar da ação do óleo floral de *Byrsonima sericea* sobre o crescimento de fungos isolados de ninhos de abelhas Centris. **Revista de Inovação, Tecnologia e Ciências**, v.3, n.3, p.247-251, 2017.
- CENITI, C.; BRITTI, D.; SANTORO, A.M.L.; MUSARELLA, R.; CIAMBRONE, L.; CASALINUOVO, F.; COSTANZO, N. Phenotypic antimicrobial resistance profile of isolates causing clinical mastitis in dairy animals. **Italian Journal of Food Safety**, v.6, n.6612, p.84-87, 2017.

CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SANCHEZ, A.; CORRALES, J.C. The role of intramammary pathogens in dairy goats. **Livestock Production Science**, v.79, p.273-283, 2003.

COSTA, A.R.; LACERDA C.; FREITAS, F.R.D. A criação de ovinos e caprinos em Campos Sales – CE. **Cadernos de Cultura Científica**, v.2, n.2. p. 55-63. 2010.

COSTA, C.R.M; FEITOSA, M.L.T.; PESSOA, G.T.; BEZERRA, D.O.; FERRAZ, M.S.; CARVALHO, M.A.M. Mastite caprina: etiologia e epidemiologia: revisão de literatura. **PUBVET**, v.7, n.8, 2013.

COSTA, G.F.C.; NISHIJO, H.; CAIXETA, L.F.; AVERSI-FERREIRA, T.A. The confrontation between ethnopharmacology and pharmacological tests of medicinal plants associated with mental and neurological disorders. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2018, p.1-27, 2018.

COSTA, K.A.D. FERENZ, M.; SILVEIRA, S.M.; MILLEZI, A.F. Formação de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústrias de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.71, n.2, p.75-82, 2016.

DOMENICO, E.G.D.; FARULLA, I.; PRIGNANO, G.; GALLO, M.T.; VESPAZIANI, M.; CAVALLO, I.; SPERDUTI, I.; PONTONE, M.; BORDIGNON, V.; CILLI, L.; SANTIS, A.; SALVO, F.D.; PIMPINELLI, F.; PAROLA, I.L.L.; TOMA, L.; ENSOLI, F. Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18 n.1077, p.1-19, 2017.

DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. **Revista Española de Quimioterapia**, v.16, n.4, p.385-393, 2003.

DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v.112, p.4–29, 2016.

ESPANHA, L.G.; RESENDE, F.A.; NETO, J.S.L.; BOLDRIN, P.K.; NOGUEIRA, C.H.; CAMARGO, M.S.; GRANDIS, R.A.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Mutagenicity and antimutagenicity of six Brazilian *Byrsonima* species assessed by the Ames test. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, n. 182, p. 1-10, 2014.

FERREYRA, M.F.; RIUS, S.P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v.3, p.1-15, 2012.

FILHO, Z.F.H.; OLIVEIRA, E.L.; MARTINS, E.C.; MONTEIRO, A.W.U. MAGALHÃES, K.A.; LIMA, L.D.; ALBUQUERQUE, F.H.M.A.R. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 08: Avaliação de impactos socioambientais do uso de boas práticas na produção de ovinos e caprinos**. 1ª ed. Sobral, CE, Embrapa Caprinos e Ovinos, 2019. 42p.

FRAIGE, K.; DAMETTO, A.C.; ZERAIK, M.L.; FREITAS, L.; SARAIVA, A.C.; MEDEIROS, A. I.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D.H.S.; LOPESD, N. P.; BOLZANIA, V.S. Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and screening for biological activities of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Phytochemical Analysis**, v.29, p.196–204, 2018.

Frutos atrativos do Cerrado. Disponível em: <http://www.frutosatrativosdocerrado.bio.br/76-especies/30-frutos-pequenos/345-murici-miudo>. Acesso em 18 de novembro de 2020.

GARCIA, D.B.; JUNIOR, R.N.C.C.; SILVA, W.C. Ocorrência de mastite em rebanhos leiteiros do município de Santarém – Pará. **PUBVET**. v.13, n.1, p.1-4, 2019.

GELLEN, L.F.A.; SILVA, E.H.C. Atividade antimicrobiana de extratos de raízes de *Byrsonima crassifolia*. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v.3, n.2, p.63-71, 2016.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; MACHADO, T.M.; NASCIMENTO, L.F.; SOUZA, R.S.; KOOLEN, H.H.F.; SILVA, F.M.A.; ACHO, L.D.R.; SANTOS, A.R.S.; COS, P.; PEREIRA, M.M.; LIMA, E.S. Chemical composition and antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of four Amazonian *Byrsonima* species. **Phytotherapy Research**, v.31, p.1686-1693, 2017.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M.M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Química Nova**, v.34, n.6, p.1032-1041, 2011.

Guilhon-Simplicio, F.; PINHEIRO, C.C.S.; CONRADO, G.G.; BARBOSA, G.S.; SANTOS, P.A.; PEREIRA, M.M.; LIMA, E.S. Anti-inflammatory, anti-hyperalgesic, antiplatelet and antiulcer activities of *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.140, p.282-286, 2012.

HIGUCHI, C.T. ***Byrsonima* spp: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados**. 2007, 86f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara-SP.

ITIS: Integrated Taxonomic Information System. Disponível em <https://www.itis.gov/> Acesso em 21 de julho de 2020.

KREWER, C.C.; AMANSO, E.S.; GOUVEIA, G.V.; SOUZA, R.L.; COSTA, M.M.; MOTA, R.A. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastites in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.47, n.3, p.511-518, 2014.

LANGONI, H.; SALINA, A.; OLIVEIRA, G.C.; JUNQUEIRA, N.B.; MENOZZI, B.D.; JOAQUIM, S.F. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.11, p.1261-1269, 2017.

LI, H.; WANG, Z.; WANG, Y.; XU, J.; HE, X. Triterpenoids with anti-proliferative effects from the seeds of *Peganum harmala* L. **Phytochemistry**, v.174, p.1-8, 2020.

LIMA, M.C.; SOUZA, M.C.C.; ESPESCHIT, I.F.; MACIEL, P.A.C.C.; SOUSA, J.E.; MORAES, G.F.; FILHO, J.D.R.; MOREIRA, M.A.S. Mastitis in dairy goats from the state of Minas Gerais, Brazil: profiles of farms, risk factors and characterization of bacteria. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, n.9, p.1742-1751, 2018.

LIRA, W. M.; SANTOS, F.V.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-Acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. **Journal of Medicinal Food**, v.11, n.1, p.111-119, 2008.

LUCENA, C.C.; BENEVIDES, S.D.; GUIMARÃES, V.P.; MARTINS, E.C. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 03: Análise da aceitação mercadológica de queijo**

de leite caprino em função do perfil socioeconômico dos consumidores. 1ª ed. Sobral, CE, Embrapa Caprinos e Ovinos, 2018. 17p.

MACHADO, G.P.; GUIMARÃES, F.F.; MENOZZI, B.D.; SALINA, A.; POSSEBON, F.S.; LANGONI, H. Ocorrência, patógenos e fatores de risco para mastite subclínica em cabras leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.5, p.1665-1670, 2018.

MAIA, V.C. A new species of *Dasineura* Rondani, 1840 (Diptera, Cecidomyiidae) associated with *Byrsonima sericea* (Malpighiaceae). **Brazilian Journal of Biosciences**, v.8, n.4, p.377-380, 2010.

MEDINA, C.O.; LOUCHARD, B.O.; GONÇALVES, T. Análise espectrofotométrica da atividade fotoprotetora *in vitro* de extratos das folhas de *Byrsonima sericea*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, n.3, p.391-398, 2015.

MENDANHA, D.M.; FERREIRA, H.D.; FELÍCIO, L.P.; SILVA, E.M.; PEREIRA, D.G.; NUNES, W.B.; CARVALHO, S. Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.1, p. 69-77, 2010.

MESSIAS, M.C.T.B.; MENEGATTO, M.F.; PRADO, A.C.C.; SANTOS B.R.; GUIMARÃES, M.F.M. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.76-104, 2015.

MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; FIGUEIREDO, M.E.; RINALDO, D.; SANTOS, L.C.; SOUZA-BRITO, A.R.M.; VILEGAS, W.; SALGADO, H.R.N. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p. 690-695, 2008.

NABIH, A.M.; HUSSEIN, H.A.; EL-WAKEEL, S.A.; EL-RAZIK, K.A.A.; GOMAA, A.M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* mastitis in Egyptian dairy goats. **Veterinary World**, v.11, p.1574-1580, 2018.

NASCIMENTO, R.F.; SALES, I.R.P.; FORMIGA, R.O.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SOBRAL, M.V.; TAVARES, J.F.; DINIZ, M.F.F.M.; BATISTA, L.M. Activity of alkaloids on peptic ulcer: What's new? **Molecules**, v.20, n.1, p.929-950, 2015.

NASCIMENTO, T.P.; PORTO, C.S.; TEIXEIRA, M.F.S.; PORTO, T.S.; PORTO, A.L.F. Produção de biocompostos com atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. ante isolados de mastite caprina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.66, n.1, p.101-108, 2014.

NEVES, P.B.; MEDEIROS, E.S.; SÁ, V.V.; CAMBOIM, E.K.A.; GARINO JR, F.; MOTA, R.A.; AZEVEDO, S.S. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.5, p.379-384, 2010.

NUGRAHA, A.S.; DAMAYANTI, Y.D.; WANGCHUK, P.; KELLER, P.A. Anti-infective and anti-cancer properties of the *Annona* species: Their ethnomedicinal uses, alkaloid diversity, and pharmacological activities. **Molecules**, v.24, n.23, p.1-31, 2019.

OLIVEIRA, R.L.C.; SCUDELLER, V.V.; BARBOSA, R.I. Use and traditional knowledge of *Byrsonima crassifolia* and *B. coccolobifolia* (Malpighiaceae) in a Makuxi community of the Roraima savanna, northern Brazil. **ACTA Amazonica**. v.47, n.2, p.133 – 140, 2017.

PEREIRA, V.V. **Estudo fitoquímico de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth (Malpighiaceae) e de atividade biológica de espécies do gênero *Byrsonima***. 2011, 127f. Dissertação (mestrado em Química) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina – MG.

PEREIRA, V.V.; BOREL, C.R.; SILVA, R.R. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of *Byrsonima* species. **Natural Product Research**, v.29, 1461-1465, 2015.

POMPEU, D.R.; ROGEZ, H.; MONTEIRO, K.M.; TINTI, S.V.; CARVALHO, J.E. Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e de *Inga edulis*. **Acta Amazonica**, v.42, n.1, p.165-172, 2012.

Projeto Verde. Disponível em: <https://appverde.wordpress.com/2015/11/05/murici-byrsonima-sericea/>. Acesso em 18 de novembro de 2020.

RACHID S.; OHLSEN, K.; WITTE, W.; HACKER, J; ZIEBUHR, W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.12, p. 3357-3363, 2000.

RODRIGUES, P.A.; MORAIS, S.M.; AGUIAR, L.A.; VILA-NOVA, N.S.; BENJAMIN, S.R. Effect of *Byrsonima sericea* DC. leaf extracts on mice gastrointestinal tract. **Toxicology Reports**, v.6, p.1182-1187, 2019.

RODRIGUES, P.A.; MORAIS, S.M.; SOUZA, C.M.; MAGALHÃES, D.V.; VIEIRA, Í.G.P.; ANDRADE, G.M.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC leaf extract against ethanol-induced gastric injury and its possible mechanisms of action. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.84, n.1, p.113-122, 2012.

RUIZ-RODRIGUEZ, C.T.; BRANDT, J.R.; OLIVERIO, R.; ISHIDA, Y.; GUEDJ, N.; GARRETT, E.F.; BAR-GAL, G.K.; NIKOLAIDIS, N.; CARDOSO, F.C.; ROCA, A.L. Polymorphisms of the Toll-Like receptor 2 of goats (*Capra hircus*) may be associated with somatic cell count in milk. **Animal Biotechnology**, v.28, 112-119, 2016.

SALABERRY, S.R.S.; SAIDENBERG, A.B.S; ZUNIGA, E.; GONSALES, F.F.; MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R. Análise microbiológica e perfil de sensibilidade do *Staphylococcus* spp. em mastite subclínica de caprinos leiteiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.2, p.336-344, 2016.

SALDANHA, A.A.; SOARES, A.C. Compostos químicos e aspectos botânicos, etnobotânicos e farmacológicos da *Byrsonima verbascifolia* Rich ex. A. Juss. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, v.17, n.4, p.1000-1006, 2015.

SANTOS H.C.; VIEIRA, D.S.; YAMAMOTO, S.M.; COSTA, M.M.; SÁ, M.C.A.; SILVA, E.M.S.; SILVA, T.M.S.; Antimicrobial activity of propolis extract fractions against *Staphylococcus* spp. isolated from goat mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.39, n.12, p.954-960, 2019.

SANTOS, R. C.; KUSHIMA, H.; RODRIGUES, C.M.; SANNOMIYA, M.; ROCHA, L.R.M.; BAUAB, T.M.; TAMASHIRO, J.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: Gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Jornal Ethnopharmacology**, v.140. p. 203-212, 2012.

- SANTOS, R.C.; BONAMIN, F.; PÉRICO, L.L.; RODRIGUES, V.P.; ZANATTA, A.C.; RODRIGUES, C.M.; SANNOMIYA, M.; Santos RAMOS, M.A.S.; BONIFÁCIO, B.V.; BAUAB, T.M.; TAMASHIRO, J.; ROCHA, L.R.M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Byrsonima intermedia* A. Juss partitions promote gastroprotection against peptic ulcers and improve healing through antioxidant and antiinflammatory activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.111, p.1112-1123, 2019.
- SANTOS, J.V.; AMORIM, A.M.; CONCEIÇÃO, A.S. Malpighiaceae in the Raso da Catarina Ecoregion, Bahia, Brazil. **Biota Neotropica**, v.18, n.3, p.1-27, 2018.
- SHAH, M.S.; QURESHI, S.; KASHOO, Z.; FAROOQ, S.; WANI, S.A.; HUSSAIN, M.I.; BANDAY, M.S.; KHAN, A.A.; GULL, B.; HABIB, A.; KHAN, S.M.; DAR, B.A. Methicillin resistance genes and *in vitro* biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in India. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.64, p.117-124, 2019.
- SHARMA, A.; FLORES-VALLEJO, R.C.; CARDOSO-TAKETA, A.; VILLARREAL, M.L. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.208, p.264-329, 2017.
- SHITAN, N. Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.80, p.1283-1293, 2016.
- SILVA, A.L.; TERCEIRO, L.E.L.; LIMA, M.F.; COSTA-SILVA, R.; SANTOS, E.A.V.; AGRA, M.F. Leaf and stem micromorphology of *Byrsonima sericea* DC. by light and scanning electron microscopy. **Microscopy Research Technique**, v.83, p.287-296, 2020.
- SILVA, D.C.; GUIM, A.; SANTOS, G.R.A.; MACIEL, M.I.S.; SOARES, L.F.P. Levels of feed supplementation on the qualitative aspects of meat from crossbred goats finished on caatinga. **Revista Ciência Agronômica**, v.46, n.4, p.855-864, 2015.
- SILVA, T.B.C.; COSTA, C.O.S.; GALVÃO, A.F.C.; BOMFIM, L.M.; RODRIGUES, A.C.B.C.; MOTA, M.C.S.; DANTAS, A.A.; SANTOS, T.R.; SOARES, M.B.P.; BEZERRA, D.P. Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.16, n.199, p. 1-9, 2016.
- SILVA, V.O. SOARES, L.O.; JÚNIOR, A.S.; MANTOVANI, H.C.; CHANG, Y-F.; MOREIRA, M.A.S. Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* Isolates from cases of bovine mastitis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.19, p.6136–6145., 2014.
- SINGH, A.; WALKER, M.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J.S. Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. **BMC Veterinary Research**, v.9, n.93, 2013.
- SOUZA, V.; LIMA, A.R.; MOURA, J.W.F.; ANGELO, F.F.; ALCINDO, J.F.; MESQUITA, F.L.T. Uso da condutividade elétrica do leite para detecção de mastite subclínica caprina. **Embrapa**. 2019.
- SPECIAN, A.F.; SERPELONI, J.M.; TUTTIS, K.; RIBEIRO, D.L.; CILIÃO, H.L.; VARANDA, E.A.; SANNOMIYA, M.; MARTINEZ-LOPEZ, W.; VILEGAS, W.; CÓLUS, I.M.S. LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds. **Cytotechnology**, v.68, p.2729–2744, 2016.

TETALI, S.D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, v.249, p.1-8, 2019.

VERDAM, M.C.S.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; ANDRADE, K.C.; FERNANDES, K.L.M.; MACHADO, T.M.; SILVA, F.M.A.; SOUZA, M.P.; KOOLEN, H.H.F.; PAULA, C.S.; HIROTA, B.C.K.; OLIVEIRA, V.B.; MIYAZAKI, C.M.S.; KALEGARI, M.; MIGUEL, M.D.; STUELP-CAMPELO, P.M.; MIGUEL, O.G. Analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant activities of *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson (Malpighiaceae). **The Scientific World Journal**, v.2017, p.1-8, 2017.

ZHAO, Y.; LIU, H.; ZHAO, X.; GAO, Y.; ZHANG, M.; CHEN, D. Prevalence and pathogens of subclinical mastitis in dairy goats in China. **Tropical Animal Health and Production**, v.47, p.429-435, 2015.

CAPÍTULO 1

Potencial antimicrobiano de *Byrsonima sericea* DC. frente *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae* causadoras de mastite

RESUMO

A caprinocultura faz parte da fonte de renda de agricultores de pequeno porte e seus produtos têm adquirido espaço nos centros urbanos, sua maior incidência está na região Nordeste. Um dos maiores interferentes na produtividade leiteira é a mastite cuja principal causa está vinculada a infecções microbianas, os patógenos mais frequentes são bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. O tratamento se dá com a utilização de antibióticos, no entanto, o surgimento de cepas resistentes a estes fármacos tem reduzido a eficácia do tratamento. As plantas têm sido um dos alvos de investigação na busca por novos compostos que propicie ação antimicrobiana. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano de extratos e frações de *Byrsonima sericea* DC, planta conhecida popularmente como murici, frente *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e isolados de mastite caprina *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus chromogenes* e mastite bovina *Staphylococcus aureus*. Foram feitos extratos etanólicos das folhas e galhos da planta e frações com solventes de polaridade crescente: hexânico, clorofórmico, acetato de etila e aquosa. Os extratos brutos e as frações foram submetidos a testes antimicrobianos pelo método de difusão em ágar e os que apresentaram atividade foram submetidos ao teste antimicrobiano por microdiluição. Os resultados demonstraram que os extratos brutos e as frações aquosa e acetato de etila foram ativos frente todas as espécies microbianas testadas, pelo teste de difusão em ágar, com halos de 11 a 23 mm para os extratos etanólicos das folhas e galhos, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL e de 7,6 a 13,6 mm para as frações nas concentrações de 5 a 25 mg/mL. No ensaio por microdiluição não foi possível determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), mas ainda assim foi evidenciado atividade antimicrobiana frente a maioria das bactérias testadas pelos extratos e frações, com exceção apenas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A maior atividade foi evidenciada com frações de acetato de etila, com 95% e aquosa, com 100% de inibição na concentração de 0,195 mg/mL das folhas sobre *Staphylococcus chromogenes* (isolado de mastite caprina). Diante da necessidade de encontrar novos compostos que atuem sobre patógenos que vem demonstrando resistência aos fármacos convencionais, o fato desta espécie de planta ter demonstrado ação antimicrobiana torna-a de interesse para pesquisas subsequentes.

Palavras chaves: Extratos vegetais, microrganismos patogênicos, mastite caprina.

ABSTRACT

Goat farming is part of the income source for small farmers and their products have acquired space in urban centers, their greatest incidence is in the Northeast region. One of the biggest interferers in milk productivity is mastitis which main cause is linked to microbial infections, the most frequent pathogens are bacteria of the genera *Staphylococcus* and *Streptococcus*. The treatment takes place with the use of antibiotics, however, the emergence of strains resistant to these drugs has reduced the effectiveness of the treatment. Plants have been one of the targets of research in the search for new compounds that provide antimicrobial action. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial potential of extracts and fractions of *Byrsonima sericea* DC, a plant popularly known as murici, in front of *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and isolates of goat mastitis *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylocococcus chromogenes* and bovine mastitis *Staphylococcus aureus*. Ethanol extracts were made from the leaves and branches of the plant and fractions with solvents of increasing polarity: hexane, chloroform, ethyl acetate and aqueous. The crude extracts and fractions were subjected to antimicrobial tests by the agar diffusion method and those that showed activity were subjected to the antimicrobial test by microdilution. The results showed that the crude extracts and the aqueous and ethyl acetate fractions were active against all microbial species tested, by the agar diffusion test, with halos from 11 to 23 mm for the ethanolic extracts of the leaves and branches, in the concentrations of 25, 50 and 100 mg / mL and from 7.6 to 13.6 mm for fractions at concentrations of 5 to 25 mg / mL. In the microdilution assay it was not possible to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), but it was still found antimicrobial activity against most of the bacteria tested by the extracts and fractions, with the exception only of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The greatest activity was evidenced with fractions of ethyl acetate, with 95% and aqueous, with 100% inhibition in the concentration of 0.195 mg / mL of the leaves on *Staphylococcus chromogenes* (isolated from goat mastitis). In view of the need to find new compounds that act on pathogens that have been showing resistance to conventional drugs, the fact that this plant species has demonstrated antimicrobial action makes it of interest for subsequent research.

Key words: Plant extracts, pathogenic microorganisms, goat mastitis.

INTRODUÇÃO

A criação de caprinos, cuja maior incidência se dá em regiões áridas e semiáridas, tem relevância econômica na região Nordeste do Brasil, uma vez que a criação desses animais faz parte da renda do agricultor de pequeno porte, assim como também os seus produtos têm ganhado espaço nos grandes centros urbanos (SILVA *et al.*, 2015).

Uma das principais enfermidades que interfere na rentabilidade leiteira desses animais é a mastite, doença caracterizada pela inflamação da glândula mamária, que remete em queda de produção e qualidade do leite, o que se reflete em perdas econômicas. A depender do quadro clínico a mastite pode ser classificada em clínica, onde a sintomatologia é evidente, e subclínica, a qual os sintomas muitas vezes não são evidenciados (ZHAO *et al.*, 2015), em ambas a principal causa é por infecções microbianas (GARCIA; CAMARGO - JUNIOR; SILVA, 2019), as bactérias são as causas mais frequentes, especialmente *Staphylococcus* spp. (NASCIMENTO *et al.*, 2014), como *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. chromogenes* (SILVA *et al.*, 2004; 2012), e *Streptococcus* spp. como *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* (COSTA *et al.*, 2013).

Para o tratamento de mastite são utilizados agentes antimicrobianos, todavia, o surgimento de cepas multirresistentes tem sido um problema ao limitar as opções de tratamento e trazer impactos financeiros, bem como para a saúde pública. Diante dos quadros de resistência, busca-se novas alternativas que possibilitem o desenvolvimento de novas drogas de ação antimicrobiana, e produtos naturais como plantas, tem estado entre os alvos de investigação (ABDALHAMED; ZEEDAN; ZEINA, 2018).

As plantas do gênero *Byrsonima*, são conhecidas popularmente por murici, e comportam aproximadamente 150 espécies, estas fazem parte da família Malpighiaceae, sendo 50% delas encontradas no Brasil, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, em áreas de Cerrado (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011), e estão entre as espécies de plantas inseridas na etnofarmacologia, dentre suas aplicações e atividades biológicas analisadas estão no uso para afecções gastrointestinais, infecções na pele, tosse, para combater febre, diarreia e disenteria, dentre outras. Já foi evidenciado que espécies testadas demonstraram ação gastroprotetora, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (SILVA *et al.*, 2019).

Todas essas atividades biológicas estão ligadas ao arsenal químico metabólico vegetal, principalmente, os metabólitos secundários, e inclusive, as plantas representam uma fonte promissora de compostos químicos no que diz respeito a ação antimicrobiana (PORRAS *et al.*, 2021).

Diante do aumento de resistência microbiana aos fármacos existentes, este trabalho objetivou avaliar o potencial antimicrobiano das folhas e galhos de *Byrsonima sericea* frente agentes bacterianos causadores de mastite clínica e subclínica caprina. Este trabalho tem sido o primeiro a testar extratos de *Byrsonima sericea*, frente espécies bacterianas.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo dos extratos vegetais

As folhas e galhos de *Byrsonima sericea* DC foram obtidos no sítio Mochila, Distrito Miracica, Município Garanhuns-PE. As estruturas vegetais foram separadas e secas em estufa de ar circulante 40 °C. Após os componentes vegetais estarem desidratados foram triturados em moinho e obtiveram rendimento de 253 g as folhas e 161 g os galhos. A estrutura reprodutiva da planta foi usada para produção de exsicata (material vegetal prensado e seco) (FÉLIX-SILVA, *et al.*, 2012), a qual foi levada ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) em Recife-PE, onde foi identificada e tombada como *Byrsonima sericea* DC 93553.

O material vegetal após ter sido seco e triturado passou por processo de maceração, que consistiu na adição de álcool etílico e deixado em repouso em temperatura ambiente, com retirada e adição novamente do solvente em intervalos de 48 horas por três vezes, para extração dos componentes secundários. A proporção de material vegetal e solvente, no processo de maceração foi de 1 Kg para 5 L (BONA *et al.*, 2014). Posteriormente, o solvente foi removido sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C para promover a separação do solvente. Os concentrados dos extratos vegetais foram alocados em capela com exaustor para eliminar resíduos do solvente, o extrato etanólico obtido foi o extrato bruto.

Foram utilizados 2/3 do extrato bruto para realizar o fracionamento, onde se fez o uso de solventes de polaridade crescente hexano, clorofórmio e acetato de etila

em um funil de separação (dois solventes por vez). O extrato bruto foi suspenso em metanol : água (3:2) e adicionado à um funil de separação, onde foram adicionados 200 mL de hexano, o processo foi repetido três vezes. Posteriormente, a porção metanol : água, passou por pressão reduzida a 40 °C, para remoção do metanol, e o volume foi completado com água destilada para se chegar a 200 mL. A porção aquosa foi inserida novamente no funil e acrescido 200 mL de clorofórmio, houve três repetições. Após a última repetição, a porção clorofórmio foi retirada e foi acrescido acetato de etila (200 mL) ao funil, novamente o processo foi reproduzido três vezes. Os solventes das frações foram removidos sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C, e em seguida levados ao exaustor para eliminar resquícios dos solventes. Quando não havia mais presença de solventes, os materiais vegetais foram liofilizados para se obter a forma final dos extratos e frações. Ao final foram obtidos para cada extrato bruto quatro frações: hexânica, clorofórmica, acetato de etila e aquosa de acordo com a metodologia de Filho e Yunes (1998).

Teste antimicrobiano por difusão em ágar

Os extratos etanólicos das folhas e dos galhos, e as frações de ambos foram diluídos em DMSO e água destilada 1:1 (v/v), 500 µL de água e 500 µL de DMSO, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL, para os extratos etanólicos, e 25 e 5 mg/mL, para as frações, baseadas em Ostrosky *et al.* (2008) e Tenório *et al.* (2016). Para os ensaios antimicrobianos foram utilizadas as cepas bacterianas *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e os isolados de mastite caprina *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus chromogenes* e de mastite bovina *Staphylococcus aureus*. Os isolados de mastite caprina foram obtidos de leite de caprinos mastíticos da Agência Brasileira de Pesquisa Agrícola – Pesquisa Nacional de cabras centro (EMBRAPA Caprinos), no distrito de Sobral, Ceará (SILVA *et al.*, 2004), e *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina, foi obtido de rebanhos leiteiros comerciais do município de Garanhuns-PE (SILVA *et al.*, 2012). As espécies isoladas e as cepas padrões se encontraram armazenadas do banco de amostras do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, onde foram isolados e identificados por Silva *et al.* (2004; 2012) e Moraes (2017). *Staphylococcus aureus* é uma espécie em comum em quadros de mastite caprina (COSTA *et al.*, 2013) e bovina (SILVA; ALCÂNTARA; MOTA, 2018),

por isso, mesmo o isolado desta espécie não ter sido proveniente de caprinos foi testado.

Os microrganismos foram inoculados em tubos de ensaio com 5 mL de caldo TSB (Trypticase Soy Broth), para promover o crescimento microbiano, e levadas a estufa microbiológica a 37 °C por 16 horas. Posteriormente, as bactérias foram padronizadas a concentração de 0,1 de D.O. (Densidade ótica) em forma de absorbância, através do comprimento de onda de 600 nm, e inseridos 1 mL de amostra microbiana padronizada em placas de Petri com Ágar Mueller Hinton, que foram distribuídas homoganeamente na placa com o auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram levadas a estufa microbiológica e permaneceram por 20 minutos para diminuir a umidade da placa. Posteriormente, o meio de cultura sólido foi perfurado e foram formados orifícios com 6mm de diâmetro, nestes 50 µL dos extratos foram inseridos. Os ensaios foram realizados em triplicata, e além dos extratos foram testados os antibióticos cloranfenicol, gentamicina e eritromicina, a 100 mg/mL como controles positivos e DMSO, como controle negativo. Após a inserção das amostras nos poços das placas que foram semeadas os inóculos, foram levadas a estufa microbiológica onde permaneceram por 24 horas a 37 °C. Transcorrido o intervalo de tempo, foi analisado se houve formação de halo e estes quando formados foram mensurados em mm de acordo com Takamune e Vieira (2013), Bona *et al.* (2014) e CLSI (2016) com adaptações). Os microrganismos foram considerados sensíveis aos extratos quando o valor dos halos foram ≥ 10 mm (VASCONCELOS *et al.*, 2020).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os extratos e frações que demonstraram melhores atividades de inibição de crescimento microbiano, foram testados pelo método de microdiluição para se saber a CIM. As concentrações mães foram de 12,5 mg/mL, com 5% de DMSO, submetidas sonicação, foram posteriormente filtradas em membrana de 0,45 µm, e diluídas para as concentrações testes de 6,25 a 0,195 mg/mL, contendo 2,5% de DMSO. Para a realização dos ensaios, as cepas microbianas foram cultivadas em 5 mL de meio TSB onde permaneceram em incubação por aproximadamente 16 horas, a 37 °C. Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços de fundo chato e foram compostos por 100 µL de amostra filtrada, em membranas de 0,22 µm, do extrato para cada concentração teste, 90 µL de meio de cultura caldo Mueller Hinton e 10 µL do inóculo padronizado, que previamente havia sido submetido a leitura de absorbância

de 600nm em espectrofotômetro para que fosse realizada a padronização do inóculo em 0,1 de D.O. O controle negativo, consistiu em 100 µL do antibiótico na concentração de 34 mg/mL, de acordo com Oliveira *et al.* (2009) no lugar do extrato e o mesmo princípio se aplicou para o controle positivo, onde os 100 µL foram substituídos por água ultra pura, também foi realizado o controle do solvente utilizado na diluição dos extratos juntamente com a água, o DMSO, cuja concentração ficou a 2,5%. Uma microplaca conteve os controles dos extratos e frações, ou seja, sem a presença de inóculos, enquanto as demais microplacas foram feitos os ensaios dos extratos brutos e frações para cada microrganismo.

Após inserção dos conteúdos testes, as microplacas foram levadas a estufa microbiológica, onde permaneceu por 24 horas a temperatura de 37 °C. Ao término do intervalo de tempo os dados foram obtidos através de um leitor de microplaca a 600nm. Os cálculos para interpretação dos dados se deram pela fórmula:

$$\text{CIM (\%)} = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

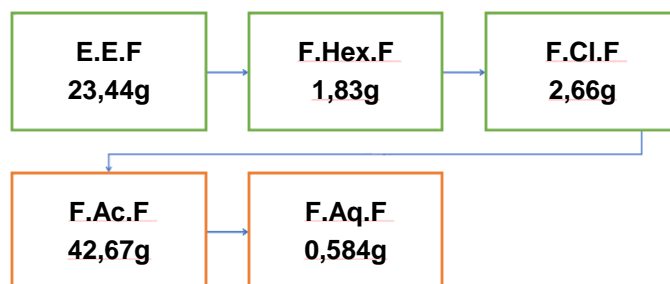
Onde, *Acontrole* remete a densidade ótica (D.O.) do controle positivo e *Aamostra* corresponde a D.O. da cepa bacteriana submetida a amostra teste (Wu *et al.*, 2013; CLSI, 2016).

Além de analisar o potencial antimicrobiano, pelo método de microdiluição, de modo quantitativo, também foi analisado as atividades dos extratos de modo qualitativo, através da aplicação de 100uL de resazurina a 0,015% (ELSHIKH *et al.*, 2016). A adição nos poços se deu após as 24horas de incubação das microplacas a 37°C. Após inserir o agente revelador, as microplacas foram levadas a estufa microbiológica novamente, sobre as mesmas condições, onde permaneceram por aproximadamente 24 horas, e transcorrido o tempo as microplacas foram analisadas quanto a alteração de cor. A resazurina é um indicador redox, que revela a viabilidade celular, quando não houve células viáveis a coloração se mantém azul e quando houve desenvolvimento microbiano, a coloração mudou para rosa, isso porque as células bacterianas viáveis reduzem a resazurina para resorufina (ELSHIKH *et al.*, 2016). A CIM é considerada forte até 0,5 mg/mL, moderada de 0,6 a 1,5 mg/mL e fraca quando acima de 1,6 mg/mL (PUTON *et al.*, 2018).

RESULTADOS

Os ensaios antimicrobianos, realizados com os extratos, cujos rendimentos se encontram nos fluxogramas 1A e 1B, demonstrado pelo método de difusão em ágar que os extratos etanólicos das folhas e dos galhos apresentaram ação frente todas as bactérias nas três concentrações testadas. O solvente utilizado para diluir os extratos, dimetilsulfóxido (DMSO), foi testado e não promoveu inibição em nenhuma das espécies microbianas. O antibiótico cloranfenicol foi utilizado como principal controle positivo, por ser de amplo espectro, os antibióticos gentamicina e eritromicina também foram testados por serem utilizados em tratamentos de mastite, de modo geral, ambos demonstraram resultados inferiores ao cloranfenicol. A eritromicina, inclusive foi dos três antibióticos o que menos demonstrou ação antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e *Staphylococcus aureus* isolada de quadros de mastite foi resistente. Com *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus chromogenes* frente gentamicina, foi observado um comportamento diferente, pois houve formação de dois tipos de halos, um menor, isento de crescimento microbiano e outro halo maior que permitiu o desenvolvimento de um suave tapete microbiano. Os resultados desse ensaio antimicrobiano estão presentes na tabela 1.

Fluxograma 1A. Rendimentos do extrato etanólico e frações das folhas de *Byrsonima sericea*.



E.E.F = Extrato etanólico das folhas; F.Hex.F = Fração hexânica das folhas; F.Cl.F = Fração clorofórmio das folhas; F.Ac.F = Fração acetato de etila das folhas; F.Aq.F = Fração aquosa das folhas.

Fluxograma 1B. Rendimento do extrato etanólico e frações dos galhos de *Byrsonima sericea*.



E.E.G = Extrato etanólico dos galhos; F.Hex.G.= Fração hexânica dos galhos; F.Cl.G = Fração clorofórmio dos galhos; F.Ac.G = Fração acetato de etila dos galhos; F.Aq.G = Fração aquosa dos galhos.

Tabela 1. Teste de difusão em ágar por poço dos extratos etanólicos das folhas e galhos de *Byrsonima sericea* DC frente bactérias causadoras de mastite.

Microrganismos (bactérias)	Concentrações dos extratos etanólicos das folhas e galhos (mg/ml)	Médias dos halos de inibição do extrato das folhas (mm)	Médias dos halos de inibição do extrato dos galhos (mm)	Antibióticos comerciais (100 mg/mL)	Médias dos halos de inibição dos antibióticos (mm)
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	25	12,6 ± 0,57	12 ± 1	Cloranfenicol	35 ± 0
	50	13,3 ± 1,15	14,6 ± 0,57	Gentamicina	30 ± 0
	100	23 ± 1,73	16,6 ± 1,15	Eritromicina	27 ± 0
				DMSO (100%)*	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25	14,5 ± 0,70	13,3 ± 0,57	Cloranfenicol	33,3 ± 1,52
	50	17,6 ± 2,08	14,6 ± 0,57	Gentamicina	25,3 ± 0,57
	100	19,3 ± 0,57	17,6 ± 1,15	Eritromicina	20 ± 0
				DMSO (100%)*	0
<i>Staphylococcus aureus</i> Isolado mastite	25	12,3 ± 0,57	11 ± 1	Cloranfenicol	31 ± 1
	50	15 ± 1,73	15 ± 0	Gentamicina	28 ± 0
	100	16,6 ± 0,57	16 ± 1	Eritromicina	0
				DMSO (100%)*	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Isolado mastite	25	12 ± 0	12,6 ± 0,57	Cloranfenicol	35,6 ± 1,15
	50	14 ± 1	15,6 ± 0,57	Gentamicina	29 ± 1
	100	17,6 ± 0,57	20,6 ± 0,57	Eritromicina	25,5 ± 2,12
				DMSO (100%)*	0
<i>Staphylococcus chromogenes</i> Isolado mastite	25	12,3 ± 0,57	13,6 ± 1,15	Cloranfenicol	38 ± 1
	50	14,6 ± 0,57	14,6 ± 0,57	Gentamicina	31,6 ± 0,57
	100	19 ± 1	17,3 ± 0,57	Eritromicina	27 ± 0
				DMSO (100%)*	0

DV = Desvio Padrão; DMSO (100%)* = solvente

Como foi revelada ação antimicrobiana dos dois extratos brutos sobre todas as bactérias testadas, as frações originadas de cada extrato também foram testadas. Foi observado que, as frações com melhor atuação de inibição microbiana foram as frações acetato de etila e aquosa, tanto as de origem do extrato etanólico das folhas quanto o dos galhos (Tabela 2). As frações clorofórmicas e hexânicas, não formaram halos para a maioria dos microrganismos testados, e quando formavam os halos eram inferiores aos das frações acetato de etila e aquosa. Os microrganismos que mais foram sensíveis as frações acetato e etila foram *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus chromogenes*. Para as frações aquosas, houve formação de halos de inibição em todas as espécies microbianas testadas, onde *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 foi mais sensível a fração aquosa dos galhos e *Staphylococcus aureus* (isolado de mastite) a fração aquosa das folhas.

Juntamente com as frações, os antibióticos foram testados em uma concentração menor, de 25 mg/mL, exceto eritromicina para *Staphylococcus aureus* isolado de mastite, que não inibiu na concentração de 100 mg/mL. Esse antibiótico, inclusive, não inibiu a outra espécie de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, na concentração de 25 mg/mL. Os resultados das frações e dos antibióticos estão expressos na tabela 2, que segue abaixo.

Tabela 2. Resultados dos testes de difusão em ágar por poço das frações hexânicas, clorofórmicas, acetato de etila e aquosa, originadas dos extratos etanólicos das folhas e dos galhos.

Microrganismo (bactérias)	Frações do extrato etanólico das folhas			Frações do extrato etanólico dos galhos			Antibióticos comerciais (25 mg/mL)	Médias dos halos (mm)
		mg/mL	Média dos halos (mm)		mg/mL	Média dos halos (mm)		
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	F. Hex	25	8 ± 0	F. Hex	25	0	Cloranfenicol	29,3 ± 1,15
		5	0		5	0		
	F. Cl	25	0	F. Cl	25	0	Gentamicina	27 ± 0
		5	0		5	0		
	F. AcEt	25	13 ± 0	F. AcEt	25	11 ± 0	Eritromicina	19 ± 0
		5	9,6 ± 0,57		5	10,3 ± 0,57		
	F. Aq.	25	9,6 ± 0,57	F. Aq.	25	13 ± 0	DMSO (100%)*	0
		5	0		5	10,6 ± 0,57		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	F. Hex	25	0	F. Hex.	25	0	Cloranfenicol	29,6 ± 1,52
		5	0		5	0		
	F. Cl	25	9,3 ± 0,57	F. Cl.	25	0	Gentamicina	26,3 ± 1,52
		5	8,6 ± 0,57		5	0		
	F. AcEt	25	12,3 ± 0,57	F. AcEt	25	12 ± 1	Eritromicina	0
		5	10 ± 0		5	8,6 ± 0,57		
	F. Aq.	25	12,3 ± 0,57	F. Aq.	25	12,3 ± 0,57	DMSO (100%)*	0
		5	7,6 ± 0,57		5	10 ± 0		
<i>Staphylococcus aureus</i> Isolado mastite	F. Hex.	25	0	F. Hex.	25	0	Cloranfenicol	31 ± 1
		5	0		5	0		
	F. Cl	25	0	F. Cl	25	8 ± 0	Gentamicina	28,3 ± 1,52
		5	0		5	0		
	F. AcEt	25	9 ± 0	F. AcEt	25	9 ± 0	Eritromicina	NT
		5	0		5	0		
	F. Aq.	25	12,3 ± 0,57	F. Aq.	25	8,3 ± 0,57	DMSO (100%)*	0
		5	7,6 ± 0,57		5	0		

<i>Staphylococcus epidermidis</i> Isolado mastite	F. Hex.	25	0	F. Hex.	25	0	Cloranfenicol	31,6 ± 1,52
		5	0		5	0		
	F. Cl	25	7 ± 0	F. Cl	25	0	Gentamicina	19,6 ± 0,57
		5	0		5	0		
	F. AcEt	25	12,6 ± 0,57	F. AcEt	25	12,3 ± 0,57	Eritromicina	19,3 ± 1,15
		5	8 ± 0		5	10,3 ± 0,57		
	F. Aq.	25	11,6 ± 0,57	F. Aq.	25	12,6 ± 0,57	DMSO (100%)*	0
		5	9 ± 1		5	10 ± 0		
<i>Staphylococcus chromogenes</i> Isolado mastite	F. Hex.	25	0	F. Hex.	25	0	Cloranfenicol	30,3 ± 1,52
		5	0		5	0		
	F. Cl	25	8,6 ± 0,57	F. Cl	25	0	Gentamicina	25 ± 0
		5	0		5	0		
	F. AcEt	25	13,6 ± 0,57	F. AcEt	25	13 ± 0	Eritromicina	21 ± 1
		5	11,3 ± 0,57		5	11 ± 0		
	F. Aq.	25	11 ± 1	F. Aq.	25	12 ± 0	DMSO (100%)*	0
		5	9,6 ± 0,57		5	9 ± 0		

DV = Desvio Padrão; F. Hex = Fração hexânica; F. Cl = Fração clorofórmio; F. AcEt = Fração acetato de etila; F. Aq.= Fração aquosa; DMSO (100%)* = solvente; NT= não testado.

Como as frações acetato de etila e aquosas apresentaram os melhores resultados antimicrobianos, pelo método de difusão em ágar, foram posteriormente também testadas, assim como os extratos brutos, pelo método de microdiluição, para se conhecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Os resultados de inibição dos antimicrobianos pelo método de microdiluição foram atípicos (Tabela 3). Na maior concentração testada, 6,25 mg/mL, não houve inibição microbiana, ao contrário, os microrganismos se desenvolveram. Em outras concentrações, que estavam mais próximas à concentração maior, também não houve inibição, na maior parte dos resultados, porém em concentrações menores, como de 0,78 a 0,195 mg/mL houve ação antimicrobiana pelos extratos e frações. A fração aquosa da folha, por exemplo, chegou a atingir 100% de inibição na menor concentração testada, 0,195 mg/mL, mas na concentração de 6,25 mg/mL não houve inibição frente *Staphylococcus chromogenes* (isolado de mastite). Nas concentrações de 6,25 e 3,12 mg/mL, do extrato etanólico das folhas, não houve ação antimicrobiana sobre *Staphylococcus epidermidis* (isolado de mastite), mas na concentração de 0,195 mg/mL houve 87% de inibição. Com a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 o percentual de inibição foi baixo, o melhor resultado foi da fração acetato de etila dos galhos, com 36% de inibição na concentração de 0,78 mg/mL. O antibiótico eritromicina também possuiu baixa atividade, com 36% de inibição na concentração de 34 mg/mL. Inclusive, com os resultados com resazurina, foi evidenciado que o crescimento microbiano foi mais intenso nas maiores concentrações (coloração avermelhada), que nas concentrações menores (cor rosa). Os extratos, então, já não tinham atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 assim como também eritromicina (Tabela 4). Quanto a comparação das frações e seus extratos brutos de origem, geralmente uma das frações apresentou resultados mais expressivos sobre os extratos brutos.

Tabela 3. Porcentagem de inibição microbiana, pelo método de microdiluição com leitura por D.O. de extratos etanólicos e frações acetato de etila e aquosa das folhas e galhos de *Byrsonima sericea*.

Extratos e antibióticos		Microrganismo									
		S.ag.	DP	S.a.	DP	S.a.l.	DP	S.ep.l.	DP	S.chro.l	DP
E. E.F.	C. s/a.	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25 mg/mL 0%	0
	C. > a.	0,78 mg/mL 44%	9,3	0,39 mg/mL 28%	2,3	0,195 mg/mL 82%	4,5	0,195 mg/mL 87%	3,3	0,195 mg/mL 81%	8,5
F.AcEt.F.	C. s/a.	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL 0%	0	6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL 0%	0	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25 mg/mL 0%	0
	C. > a.	0,39 mg/mL 64%	2,5	0,39 mg/mL 22%	6,4	0,195 mg/mL 66%	23	0,195 mg/mL 79%	3,8	0,195 mg/mL 95%	2,9
F.Aq.F.	C. s/a.	6,25 mg/mL 0%	0	6,25 e 3,12 mg/mL	0	6,25 mg/mL 0%	0	6,25 mg/mL 0%	0	6,25 mg/mL 0%	0
	C. > a.	0,195 mg/mL 40%	4,3	0,78 mg/mL 27%	5,4	0,39 mg/mL 87%	31	0,39 mg/mL 99%	2,5	0,78 mg/mL 100,00%	0
								0,195 mg/mL 95%	3,7	0,195 mg/mL 100,00%	0,2
E.E.G.	C. s/a.	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL 0%	0	6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL 0%	0	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25 mg/mL 0%	0

	C. > a.	0,39 mg/mL 68%	5,1	0,39 mg/mL 29%	0	0,195 mg/mL 70%	3,8	0,195 mg/mL 64%	3,1	0,195 mg/mL 73%	4,4
F.AcEt.G	C. s/a.	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL 0%	0	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0
	C. > a	0,78 mg/mL 71%	11	0,78 mg/mL 36%	3,5	0,195 mg/mL 83%	17,	0,195 mg/mL 80%	3,5	0,195 mg/mL 89%	3,9
F.Aq.G.	C. s/a.	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 mg/mL 0%	0	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25 e 3,12 mg/mL 0%	0	6,25 mg/mL 0%	0
	C. > a	0,39 mg/mL 62%	3,2	0,39 mg/mL 21%	6,4	0,195 mg/mL 63%	2,9	0,195 mg/mL 63%	5,6	0,39 mg/mL 93%	19
Antibióticos/ solvente	Clo. 34mg/mL	82%	11	94%	6,6	93%	0,6	95%	0,3	92%	0,5
	Gen. 34mg/mL	64%	2,4	83%	2,6	61%	6,5	62%	2,3	76%	0
	Eri. 34mg/mL	49%	48	36%	5,1	NT		93%	1,5	91%	0,8
	DMSO a 2,5%	25%	2,1	0	0	27%	11	44%	1,9	21%	15

S.ag. = *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813; S.a. = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; S.a.I. = *Staphylococcus aureus* Isolado mastite; S.ep.I. = *Staphylococcus epidermidis* Isolado mastite; S.chro.I = *Staphylococcus chromogenes* Isolado mastite; DV = Desvio Padrão; C. s/a. = Concentrações sem atividade; C. > a = Concentração com maior atividade; E. E.F. = Extrato etanólico das folhas; F.AcEt.F = Fração acetato de etila das folhas; F.Aq.F. = Fração aquosa das folhas; E.E.G. = Extrato etanólico dos galhos; F.AcEt.G = Fração acetato de etila dos galhos; F.Aq.G. = Fração aquosa dos galhos; Clo.= Cloranfenicol; Gen. = Gentamicina; Eri. = Eritromicina; NT = Não testado.

Tabela 4. Avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição dos extratos etanólicos e frações acetato de etila e aquosa, oriundas das folhas e galhos de *Byrsonima sericea* com Resazurina.

Extratos e Antibióticos		S.ag.	S.a.	S.a.I.	S.ep.I.	S.chro.I
E. E.F.	C. > a	0,78 mg/mL	SI	3,12 mg/mL	0,39 mg/mL	0,39 mg/mL
F.AcEt.F	C. > a	0,39 mg/mL	SI	1,56 mg/mL	0,39 mg/mL	0,39 mg/mL
F.Aq.F.	C. > a	3,12 mg/mL	SI	0,78 mg/mL	1,56 mg/mL	0,195 mg/mL
E.E.G.	C. > a	0,39 mg/mL	SI	0,39 mg/mL	0,39 mg/mL	0,39 mg/mL
F.AcEt.G	C. > a	0,39 mg/mL	SI	0,39 mg/mL	0,39 mg/mL	0,39 mg/mL
F.Aq.G.	C. > a	0,39 mg/mL	SI	0,39 mg/mL	0,39 mg/mL	0,39 mg/mL
	Cloranfenicol 34mg/mL	I	I	I	I	I
	Gentamicina 34mg/mL	IP	IP	IP	IP	IP
Antibióticos/Solvente	Eritromicina 34mg/mL	IP	SI	NT	SI	IP
	DMSO a 2,5%	SI	SI	SI	SI	SI

S.ag. = *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813; S.a. = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; S.a.I. = *Staphylococcus aureus* Isolado mastite; S.ep.I. = *Staphylococcus epidermidis* Isolado mastite; S.chro.I = *Staphylococcus chromogenes* Isolado mastite; C. > a = Concentração com maior atividade; E. E.F. = Extrato etanólico das folhas; F.AcEt.F = Fração acetato de etila das folhas; F.Aq.F. = Fração aquosa das folhas; E.E.G. = Extrato etanólico dos galhos; F.AcEt.G = Fração acetato de etila dos galhos; F.Aq.G. = Fração aquosa dos galhos; SI= Sem inibição; I= Inibição; IP= Inibiu parcialmente; NT = Não testado.

DISCUSSÃO

Os métodos de avaliação antimicrobianas por difusão em ágar e em caldo são necessários para analisar a presença de atividade de extratos de plantas, sendo dentre os métodos de difusão em ágar por perfuração do meio, onde se formam poços, mais fidedigno que por difusão em disco, ainda assim se faz necessário a padronização de metodologias aplicadas com extratos de plantas (BONA *et al.*, 2014).

A espécie *Byrsonima sericea* tem sido uma das espécies de plantas analisada na literatura quanto suas atividades biológicas, das quais as mais encontradas foram atividade antioxidante (RODRIGUES *et al.*, 2019; FRAIGE *et al.*, 2018), atividade gastroprotetora (RODRIGUES *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2019) e ação anti-inflamatória (FRAIGE *et al.*, 2018).

No entanto, trabalhos que analisem a atividade antimicrobiana são escassos, foi encontrado apenas o trabalho de Capinan e Silva (2017), onde o óleo floral desta espécie demonstrou ação frente os microrganismos testados *Aspergillus flavus* e *Penicillium* sp., mas testes com espécies bacterianas ainda não foram encontradas com essa espécie. Outras espécies de *Byrsonima*, por outro lado, foram analisadas quanto seu potencial antimicrobiano, como *Byrsonima crassifolia* que apresentou ação antimicrobiana frente as cepas *Bacillus subtilis* NRS 744, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 6071, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhi, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 8043, *Streptococcus pneumoniae* e *Micrococcus luteus*, através do método de difusão em ágar (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 1999). *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, também foram testadas com essa planta pelo método de difusão em ágar por Gellen e Silva (2016), neste apenas *E. coli* não foi inibida.

Martínez-Vázquez *et al.* (1999) realizaram os ensaios antimicrobianos com os extratos acetato de etila das raízes e cascas, e metanólico das raízes de *Byrsonima crassifolia*. Foi observado que, a maioria das espécies microbianas foram mais sensíveis ao extrato acetato de etila das raízes em relação aos demais, inclusive, a espécie *E. coli*, que não havia sido inibida no trabalho de Gellen e Silva (2016) com os extratos aquosos das raízes da mesma espécie de planta, demonstrando assim que

o solvente utilizado na extração dos componentes do material vegetal influencia o potencial de inibição.

Ainda no trabalho de Martínez-Vázquez *et al.* (1999), a espécie *Staphylococcus epidermidis* também foi sensível ao extrato acetato de etila das raízes de *Byrsonima crassifolia*, mas foi resistente aos extratos metanólicos das raízes e acetato de etila da casca do caule. Nos ensaios com *Byrsonima sericea*, neste trabalho, essa espécie bacteriana, foi sensível aos extratos etanólicos das folhas e galhos, assim como as frações aquosas e acetato de etila pelo método de difusão em ágar, sendo que pelo método de microdiluição, em concentrações menores, a fração aquosa das folhas, com 95% de inibição na concentração de 0,195 mg/mL, e acetato de etila dos galhos, com 80% de inibição na mesma concentração, foram melhores que os extratos etanólicos (folha 87% e galhos 64%).

Michelin *et al.* (2008), realizaram ensaio antimicrobiano com três espécies de *Byrsonima* (*B. basiloba*, *B. intermedia* e *B. fagifolia*), cujos extratos metanólicos das folhas demonstraram ação antimicrobiana frente as espécies microbianas *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella* e *Candida albicans* através do método de difusão em ágar e microdiluição. Dentre estas espécies de *Byrsonima*, *B. intermedia* também demonstrou atividade antimicrobiana nos ensaios de Santos *et al.* (2012), pelos métodos de difusão em ágar e microdiluição, frente *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* através do extrato metanólico das folhas, e sobre *Helicobacter pylori* por meio das frações aquosa e acetato de etila das folhas (SANTOS *et al.*, 2019).

Quando comparados os resultados de diferentes espécies de *Byrsonima* em ensaios antimicrobianos é possível analisar que, embora tenham atividade frente a maioria das cepas microbianas as quais são submetidas, a depender da espécie e da estrutura vegetal trabalhada a atividade pode ser maior ou menor. A cepa *Staphylococcus epidermidis* foi sensível a todos os extratos de todas as espécies de *Byrsonima* avaliadas por Michelin *et al.* (2008), e todas apresentaram a mesma concentração inibitória mínima (CIM) de 6 mg/ml, porém quando submetidas a concentrações mais altas, de 50, 75, e 100 mg/ml a espécie que demonstrou mais atividade foi *B. basiloba*, com halos de 12, 13 e 14mm, respectivamente.

No presente trabalho realizado com as folhas e galhos de *Byrsonima sericea* foi possível observar que nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL esta espécie bacteriana foi mais sensível, pois o extrato etanólico das folhas obteve halos de 12, 14 e 17,6mm, e os resultados com o extrato etanólico dos galhos foram ainda maiores, com halos de 12,6, 15,6 e 20,6 mm. *Staphylococcus epidermidis* está entre as espécies causadoras de mastite caprina subclínica, e assim como outras espécies de *Staphylococcus* tem apresentado resistência a antibióticos como penicilina, ampicilina, oxacilina e tetraciclina (LIMA *et al.*, 2018). O aumento de resistência microbiana também pode ser observado neste trabalho, onde esta espécie bacteriana demonstrou redução de sensibilidade frente a gentamicina, que faz parte da classe dos aminoglicosídeos (JADHAV *et al.*, 2019). Este antibiótico também demonstrou redução de atividade frente a cepa *Staphylococcus chromogenes* neste estudo e eritromicina demonstrou atividade ainda menor. Nos ensaios realizados por Frey *et al.* (2013), através do método de microdiluição, estes fármacos e outros se mostraram menos ativos a esta espécie bacteriana, como oxacilina, penicilina, tetraciclina e estreptomicina.

Além da gentamicina, a eritromicina tem demonstrado redução de ação antimicrobiana, neste caso sobre *Staphylococcus aureus*, onde demonstrou a menor atividade quando comparado com os outros antibióticos, cloranfenicol e gentamicina, com a cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e não foi capaz de inibir *Staphylococcus aureus* isolado de mastite. No trabalho de Diana, Ciuffo e Musto (2019), 24% das cepas de *Staphylococcus* spp mostraram resistência a eritromicina, 42,8% de espécies isoladas de quadros de mastite, inclusive *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp. também revelaram resistência a este antibiótico em ensaios realizados por Santiago-Neto *et al.* (2014).

Sannomiya *et al.* (2005), analisaram o potencial antimicrobiano de diferentes extratos e frações (extratos clorofórmicos, metanólico, metanólico a 80% e frações acetato de etila e aquosa) das folhas de *Byrsonima crassa* pelo método de difusão em ágar, e observaram que o extrato metanólico e metanólico a 80% e as frações acetato de etila e aquosa foram mais efetivos frente os microrganismos testados. Dentre os quais *Staphylococcus epidermidis* foi sensível de modo similar ao extrato metanólico e metanólico a 80% e a frações acetato de etila. Diferenças significativas no potencial antimicrobiano foram evidenciados com a diminuição das concentrações no teste de

microdiluição, em que foram observados que o extrato metanólico apresentou a menor CIM, que foi de 1,5 mg/mL, enquanto que o extrato metanólico a 80% e a fração acetato de etila obtiveram CIM de 9 mg/mL e 6 mg/mL respectivamente. Nos ensaios pelo método de difusão em ágar com as frações das folhas e dos galhos de *Byrsonima sericea*, no presente estudo, as frações acetato de etila e aquosa foram também as mais ativas, e a expressão de sensibilidade de *Staphylococcus epidermidis* sobre estas foi similar, mas pelo método de microdiluição a fração aquosa da folha foi a mais efetiva.

Extratos vegetais de espécies de *Byrsonima* que tenham sido testados quanto seu potencial antimicrobiano sobre *Streptococcus agalactiae* não foram encontrados na literatura. Mas, Kinde *et al.* (2015), analisaram o potencial antimicrobiano de duas outras espécies de plantas, *Combretum molle*, através do extrato etanólico das cascas e *Xanthium strumarium* por via do extrato etanólico das folhas, frente *Streptococcus agalactiae*, além de *Staphylococcus aureus*, pelo método de difusão em ágar. Os extratos foram testados em concentrações de 10 a 0,625%. Os extratos das cascas de *Combretum molle* foram mais efetivos sobre *Streptococcus agalactiae*, já o extrato etanólico das folhas de *Xanthium strumarium* se sobressaíram, com alta atividade, sobre ambas as espécies bacterianas. Pelo método de difusão em ágar, os extratos e frações de *Byrsonima sericea*, do presente estudo, foram mais ativos sobre *Streptococcus agalactiae* que *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus chromogenes é outra espécie microbiana, que não foi encontrada na literatura testes referentes a ação antimicrobiana de extratos de *Byrsonima* spp. Paşca *et al.* (2015) analisaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos das partes aéreas de *Salvia officinalis*, *Hops Perle*, *Hops Brewers Gol* e óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* e *Rosmarinus officinalis*. *Staphylococcus chromogenes* foi pouco sensível frente aos extratos de *Salvia officinalis* e *Hops Perle*, já com *Hops Brewers Gol*, e os óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* e *Rosmarinus officinalis* a sensibilidade foi maior, principalmente estas duas últimas. Os extratos e frações de *Byrsonima sericea*, neste trabalho, foram ativos sobre *Staphylococcus chromogenes*, principalmente as frações acetato de etila e aquosas, tanto das folhas, quanto dos galhos, em difusão em ágar, mas houve um destaque maior para a fração aquosa da folha, com inibição de 100% nas concentrações de

0,78 e 0,195 mg/mL, e acetato de etila, com inibição de 95%, na concentração de 0,195 mg/mL, no teste de microdiluição.

Santos *et al.* (2012), obtiveram resultados positivos com os extratos da folha de *Byrsonima intermedia*, frente *Staphylococcus aureus*, a qual foi inibida até a concentração de 0,250 mg/mL. Os extratos etanólicos e as frações aquosa e acetato de etila das folhas e galhos de *Byrsonima sericea*, deste estudo, foram ativos no método de difusão em ágar, especialmente a fração acetato de etila, na concentração de 5 mg/mL, no entanto, no ensaio por microdiluição as atividades inibitórias foram inferiores a 40%, sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Mas, foi observado também que o comportamento das espécies de *Staphylococcus aureus* neste trabalho, foram diferentes das demais espécies testadas quando testadas as frações dos extratos. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi mais sensível no método de difusão em ágar, mas foi resistente nos ensaios por microdiluição, já *Staphylococcus aureus* (isolado de mastite), foi menos sensível no método de difusão em ágar, mas ao teste por microdiluição, em concentrações menores, foi mais sensível, sendo o melhor resultado da fração aquosa da folha, com 87% de inibição na concentração de 0,39 mg/mL.

Mas levando em conta que espécies como *Staphylococcus aureus* tem apresentado aumento de resistência aos antimicrobianos convencionais e os extratos etanólicos e frações das folhas e galhos de *Byrsonima sericea*, tem demonstrado atividade frente a esta espécie, que foi resistente a eritromicina antibiótico da classe dos macrolídeos (FENG; GUO; SHAO, 2019), evidencia ser coerente a continuidade de mais estudos com esta planta.

Assim como neste estudo, as frações acetato de etila e aquosa foram as que se sobressaíram nos ensaios antimicrobianos em relação as frações clorofórmio e hexano, nos testes de Sannomiya *et al.* (2005) e Michelin *et al.* (2008), os extratos clorofórmicos foram considerados inativos, e as frações acetato de etila e aquosas em Sannomiya *et al.* (2005), foram ativas e com resultados similares aos extratos metanólicos. Esses autores analisaram a presença de flavonóides na fração acetato de etila e de taninos na fração aquosa.

Rodrigues *et al.* (2019), identificaram a presença de flavonóides e proantocianidinas, além de elevada quantidade de compostos fenólicos gerais nos extratos etanólicos e acetato de etila das folhas de *Byrsonima sericea*. Anteriormente,

esses autores haviam revelado a presença de flavonas, flavonóis, flavanonas, xantonas e taninos hidrolisáveis nos extratos etanólicos das folhas desta planta (RODRIGUES *et al.*, 2012). Dentre outras atividades, esses compostos têm ação antimicrobiana. A citotoxicidade dos flavonoides, por exemplo, é decorrente da capacidade de interagirem com enzimas através da complexação de proteínas (FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012), portanto, estes componentes químicos, podem estar atrelados as atividades antimicrobianas dos extratos etanólicos e frações acetato de etila e aquosa de *Byrsonima sericea*.

Bouarab-Chibane *et al.* (2019), observaram que embora polifenóis estejam entre os metabólitos vegetais com atividade antimicrobiana, eles podem promover o crescimento microbiano ao invés de agir contra estes, apesar de não ser relatado em ensaios da CIM. Polifenóis inseridos em caldo Mueller Hinton podem promover o crescimento microbiano devido a ação de enzimas bacterianas. A ação dessas enzimas sobre polifenóis O-glicosilados (diosmina, rhapontin) e ácido clorogênico, por exemplo, promove a liberação de glicose ou ácido quínico. Entretanto, alguns polifenóis não esterificados ou glicosilados também podem favorecer o crescimento bacteriano, imagina-se que isso ocorra pela clivagem de ligações CC de enzimas bacterianas.

Ainda segundo Bouarab-Chibane *et al.* (2019), a presença de grupos conjugados de amina ou glicosil a polifenóis pode estimular o crescimento microbiano, por se converter em fonte de nutriente, nitrogênio ou açúcares fermentáveis, no entanto, esse efeito promotor do crescimento pelos compostos fenólicos, não se aplica a todas as espécies bacterianas. Esses autores ainda sugerem que a glicosilação pode reduzir a ação antimicrobiana por reduzir o número de hidroxilas livres ou aumentando o impedimento estérico de compostos fenólicos.

Os resultados infrequentes apresentado no presente estudo nos ensaios de microdiluição para as maiores concentrações, observados por espectrofotometria e por resazurina, podem estar relacionados ao que foi relatado no trabalho de Bouarab-Chibane *et al.* (2019), em que nas concentrações mais altas os componentes químicos dos extratos e frações serviram como substrato para o crescimento microbiano. Além disso, a maneira de diluir os extratos e frações podem não ter promovido uma dissociação eficaz dos compostos químicos, tornando a interação entre esses muito maior que com as células bacterianas.

Apesar de ter havido resultados diferentes aos achados na literatura em relação ao método de microdiluição, foi possível observar que *Byrsonima sericea* tem potencial antimicrobiano frente espécies bacterianas causadoras de mastite caprina, pelos ensaios de microdiluição e difusão em ágar.

CONCLUSÃO

As plantas têm sido um dos alvos de investigação no que remete a ação antimicrobiana, e tem se demonstrado promissoras. As espécies de *Byrsonima* tem demonstrado potencial antimicrobiano, inclusive a espécie de estudo *Byrsonima sericea*, cujos extratos etanólicos e frações, principalmente aquosa e acetato de etila, das folhas e galhos, foram ativos frente espécies bacterianas de interesse mastítico, pelos métodos de difusão em ágar e microdiluição, sendo este último com expressão de valores atípicos. O que torna relevante o aprofundamento de estudos a cerca desta planta, e do desenvolvimento de metodologias que possibilitem uma análise mais precisa, quando a amostra testada se trata de extratos vegetais. Além disso, é necessário realizar a caracterização dos extratos assim como o isolamento das substâncias e determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima).

REFERÊNCIAS

- ABDALHAMED, A.M.; ZEEDAN, G.S.G.; ZEINA, H.A.A.A. Isolation and identification of bacteria causing mastitis in small ruminants and their susceptibility to antibiotics, honey, essential oils, and plant extracts. **Veterinary World**. v.11, n.3, p.355-362, 2018.
- BONA, E.A.M.; PINTO, F.G.S.; FRUET, T.K.; JORGE, T.C.M.; MOURA, A.C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n.3, p. 218-225, 2014.
- BOUARAB-CHIBANE, L.; FORQUET, V.; LANTÉRI, P.; CLÉMENT, Y.; LÉONARD-AKKARI, L.; OULAHAL, N.; DEGRAEVE, P.; BORDES, C. Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) Models. **Frontiers in Microbiology**. v.10, p.1-23, 2019.
- CAPINAN, W.; SILVA, M. Avaliação preliminar da ação do óleo floral de *Byrsonima sericea* sobre o crescimento de fungos isolados de ninhos de abelhas Centris. **Revista de Inovação, Tecnologia e Ciências (RITEC)**. v3, n.3, p. 247-251, 2017.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th edition. M100-S. 2016.
- COSTA, C.R.M.; FEITOSA, M.L.T.; PESSOA, G.T.; BEZERRA, D.O.; FERRAZ, M.S.; CARVALHO, M.A.M.; Mastite caprina: etiologia e epidemiologia: revisão de literatura. **PUBVET**. v.7, n.8, 2013.
- DIANA, L.; CIUFFO, C.; MUSTO, H. Identificación y caracterización de *Staphylococcus* resistentes a meticilina aislados de perros. **Veterinaria (Montevideo)**. v.55, n.212, p.45-51, 2019.
- ELSHIKH, M.; AHMED, S.; FUNSTON, S.; DUNLOP, P.; McGAW, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**. v.38, p.1015–1019, 2016.
- FÉLIX-SILVA, J.; TOMAZ, I.M.; SILVA, M.G.; SANTOS, K.S.C.R.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; CARVALHO, M.C.R.D.; SOARES, L.A.L.; FERNANDES-PEDROSA, M.F. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.14, n.3, p.548-555, 2012.
- FENG, Y.; GUO, Q.; SHAO, B. Cytotoxic comparison of macrolide antibiotics and their chlorinated disinfection byproduct mixtures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.182, p.1-8, 2019.
- FERREYRA, M.L.F.; RIUS, S.P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**. v.3, p.1-15, 2012.
- FRAIGE, K.; DAMETTO, A.C.; ZERAIK, M.L.; FREITAS, L.; SARAIVA, A.C.; MEDEIROS, A. I.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D.H.S.; LOPESD, N. P.; BOLZANIA, V.S. Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and screening for biological activities of *Byrsonima* Species (Malpighiaceae). **Phytochemical Analysis**. v.29, p.196–204, 2018.
- FREY, Y.; RODRIGUEZ, J.P.; THOMANN, A.; SCHWENDENER, S.; PERRETEN, V. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative

staphylococci from bovine mastitis milk. **Journal of Dairy Science**. v.96, p. 2247-2257, 2013.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

GARCIA, D.B.; CAMARGO - JUNIOR, R.N.C.; SILVA, W.C. Ocorrência de mastite em rebanhos leiteiros do município de Santarém – Pará. **PUBVET**. v.13, n.1, p.1-4, 2019.

GELLEN, L.F.A; SILVA, E.H.C. Atividade antimicrobiana de extratos de raízes de *Byrsonima crassifolia*. **Journal of Bioenergy and Food Science**. v.03, n.2, p.63-71, 2016.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M.M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Química Nova**. v.34, n.6, p.1032-1041, 2011.

JADHAV, R.W.; KOBASI, M.A.; JONES, L.A.; VINU, A.; BHOSALE, S.V. The supramolecular self-assembly of aminoglycoside antibiotics and their applications. **Chemistry Open**. v.8, n.9, p.1154–1166, 2019.

KINDE, H.; REGASSA, F.; ASAYE, M.; WUBIE, A. The *in-vitro* antibacterial effect of three selected plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. **Journal of Veterinary Science & Technology**. v.6, p.1-7, 2015.

LIMA, M.C.; SOUZA, M.C.C.; ESPESCHIT, I.F.; MACIEL, P.A.C.C.; SOUSA, J.E.; MORAES, G.F.; FILHO, J.D.R.; MOREIRA, M.A.S. Mastitis in dairy goats from the state of Minas Gerais, Brazil: profiles of farms, risk factors and characterization of bacteria. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.38, n.9, p.1742-1751, 2018.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R.; LUNA, L.C.; GUTIÉRREZ, M.N.M.; GARCÍA-ARGÁEZ, A.N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. **Journal of Ethnopharmacology**. v.66, p.79–82, 1999.

MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; FIGUEIREDO, M.E.; RINALDO, D.; SANTOS, L.C.; SOUZA-BRITO, A.R.M.; VILEGAS, W.; SALGADO, H.R.N. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.18, p.690-695, 2008.

MORAES, A.C.A. **Estudo microbiológico e composição físico-química do leite de cabra**. 2017. 74f. Tese (Doutorado Integralizado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal do Ceará. Recife-PE.

NASCIMENTO, T.P.; PORTO, C.S.; TEIXEIRA, M.F.S.; PORTO, T.S.; PORTO, A.L.F. Produção de biocompostos com atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. ante isolados de mastite caprina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**. v.66, n.1, p.101-108, 2014.

OLIVEIRA, T.F.; FERREIRA, J.S.; BOA SORTE, P.M.F.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; SCHWAB, S. Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. **Embrapa Agroecologia**, v.49, p.1-18, 2009.

- OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n2, p.301-307, 2008.
- PAȘCA, C.; MĂRGHITAȘ, L.A.; DEZMIREAN, D.; BOBIȘ, O.; BONTA, V.; MĂRGĂOAN, R.; CHIRILĂ, F.; FIT, N. The assessment of the antibacterial activity of some plant extracts on normal and pathogenic microflora from milk. **Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies**. v.48, n.1, p.166-172, 2015.
- PORRAS, G.; CHASSAGNE, F.; LYLES, J.T.; MARQUEZ, L.; DETTWEILER, M.; SALAM, A.M.; SAMARAKOON, T.; SHABIH, S.; FARROKHI, D.R.; QUAVE, C.L. Ethnobotany and the role of plant natural products in antibiotic drug discovery. **Chemical Review**. v.121, p.3495–3560, 2021.
- PUTON, B.M.S.; BERNARDI, J.L.; ORO, C.E.D.; BOMBANA, V.B.; DARIFF, A.P.; BECKER, J.; PAROUL, N.; CANSIAN, R.L. Concentração Inibitória Mínima e atividade antioxidante do extrato de *Plectranthus ornatus* CODD. (Lamiaceae) extraído por diferentes solventes. **PERSPECTIVA**. v.42, n.159, p.109-118, 2018.
- RODRIGUES, P.A.; MORAIS, S.M.; AGUIAR, L.A.; VILA-NOVA, N.S.; BENJAMIN, S.R. Effect of *Byrsonima sericea* DC. leaf extracts on mice gastrointestinal tract. **Toxicology Reports**. v.6, p.1182–1187, 2019.
- RODRIGUES, P.A.; MORAIS, S.M.; SOUZA, C.M.; MAGALHÃES, D.V.; VIEIRA, Í.G.P.; ANDRADE, G.M.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC leaf extract against ethanol-induced gastric injury and its possible mechanisms of action. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.84, n.1, p.113-122, 2012.
- SANNOMIYA, M.; MICHELIN, D.C.; RODRIGUES, C.M.; SANTOS, L.C.; SALGADO, H.R.N.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, A.R.S.M.; VILEGAS, W. *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial activity and chemical study. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.26, n.1, p.71-75, 2005.
- SANTIAGO-NETO, W.; MACHADO, G.; PAIM, D.S.; CAMPOS, T.; BRITO, M.A.V.P.; CARDOSO, M.R.I.; CORBELLINI, L.G. Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.34, n.7, p.613-620, 2014.
- SANTOS, R.C.; KUSHIMA, H.; RODRIGUES, C.M.; SANNOMIYA, M.; ROCHA, L.R.M.; BAUAB, T.M.; TAMASHIRO, J.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: Gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Jornal Ethnopharmacology**. v.140. p. 203-212, 2012.
- SANTOS, R.C.; BONAMIN, F.; PÉRICO, L.L.; RODRIGUES, V.P.; ZANATTA, A.C.; RODRIGUES, C.M.; SANNOMIYA, M.; Santos RAMOS, M.A.S.; BONIFÁCIO, B.V.; BAUAB, T.M.; TAMASHIRO, J.; ROCHA, L.R.M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Byrsonima intermedia* A. Juss partitions promote gastroprotection against peptic ulcers and improve healing through antioxidant and antiinflammatory activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.111, p.1112–1123, 2019.
- SILVA, E.R.; SIQUEIRA, A.P.; MARTINS, J.C.D.; FERREIRA, W.P.B.; SILVA, N. Identification and *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated

from goat mastites in the Northeast of Brazil. **Small Ruminant Research**. v.55, p.45–49, 2004.

SILVA, E.R.; PEREIRA, A.M.G.; MORAES, W.S.; SANTORO, K.R.; SILVA, T.R.M. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.13, n.3, p.701-711, 2012.

SILVA, D.C.; GUIM, A.; SANTOS, G.R.A.; MACIEL, M.I.S.; SOARES, L.F.P. Levels of feed supplementation on the qualitative aspects of meat from crossbred goats finished on caatinga. **Revista Ciência Agronômica**, v.46, n.4, p.855-864, 2015.

SILVA, I.M.M.; BARROS, D.A.; COELHO JUNIOR, M.G.; OLIVEIRA, A.L.; CARVALHO, R.C.R.; CARVALHO, A.G. Levantamento florístico de plantas medicinais de um fragmento de campos de altitude da mata atlântica. **Acta Biológica Catarinense**. v.6, n.3, p.37-53, 2019.

SILVA, J.G.; ALCÂNTARA, A.M.; MOTA, R.A. Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 38, n.2, p. 223-228, 2018.

TAKAMUNE, L.F.; VIEIRA, D.C.M. Comparação da metodologia para determinação da potência de amoxicilina: método de difusão em ágar e método de espalhamento. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.34, n.4, p.555-558, 2013.

TENÓRIO, R.F.L.; NASCIMENTO, M.S.; FILHO, J.V.M.L.; MAIA, M.B.S.; COELHO, M.C.O.C. Atividade antibacteriana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & J.W. Grimes contra bactérias isoladas de feridas cutâneas de cães. **Ciência Animal Brasileira**. v.17, n.2, p.252-259, 2016.

VASCONCELOS, N.G.; VAZ, M.S.M.; RADAI, J.A.S.; KASSUYA, C.A.L.; FORMAGIO, A.S.N.; GRACIANI, F.S.; LEAL, M.L.; OLIVEIRA, R.J.; SILVA, K.E.; CRODA, J.; SIMIONATTO, S. Antimicrobial activity of plant extracts against carbapenem-producing *Klebsiella pneumoniae* and *in vivo* toxicological assessment. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**. v.83, p. 719-729, 2020.

WU, S.; QI, W.; LI, T.; LU, D.; SU, R.; HE, Z. Simultaneous production of multi-functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. **Food Chemistry**. v.141, p.2944–2951, 2013.

ZHAO, Y.; LIU, H.; ZHAO, X.; GAO, Y.; ZHANG, M.; CHEN, D. Prevalence and pathogens of subclinical mastitis in dairy goats in China. **Tropical Animal Health and Production**. v.47, p.429–435, 2015.