

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**MARIANA DE BARROS**

**ATIVIDADE DE 7-EPICLUSIANONA E DO COMPLEXO METÁLICO  
7-EPICLUSIANONA-COBRE SOBRE *Streptococcus* spp. ISOLADAS  
DE MASTITE BOVINA**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016**

MARIANA DE BARROS

**ATIVIDADE DE 7-EPICLUSIANONA E DO COMPLEXO METÁLICO  
7-EPICLUSIANONA-COBRE SOBRE *Streptococcus* spp. ISOLADAS  
DE MASTITE BOVINA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2016

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

T

Barros, Mariana de, 1985-

B277a  
2016

Atividade de 7-epidusianona e do complexo metálico  
7-epiclusianon-cobre sobre *Streptococcus* spp. isoladas de  
mastite bovina / Mariana de Barros. – Viçosa, MG, 2016.  
xiv, 40f : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Bovino - Doenças. 2. Mastite bovina. 3. *Streptococcus*.  
4. *Rheedia brasiliensis*. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em  
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 2. ed. 636.20

MARIANA DE BARROS


**ATIVIDADE DE 7-EPICLUSIANONA E DO COMPLEXO METÁLICO  
7-EPICLUSIANONA-COBRE SOBRE *Streptococcus* spp. ISOLADAS  
DE MASTITE BOVINA**

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

APROVADA: 20 DE julho de 2016.

  
\_\_\_\_\_  
Maria Emilene Martino Campos-Galvão

  
\_\_\_\_\_  
Fabrício Luciani Valente

  
\_\_\_\_\_  
Marisa Alves Nogueira Diaz

  
\_\_\_\_\_  
Maria Aparecida Scatamburlo Moreira  
(Orientadora)

*A meu marido e melhor amigo, Magno.*

*A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê (Arthur Schopenhauer).*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me permitido chegar até aqui.

Agradeço a toda minha família por ter me dado apoio durante toda minha trajetória acadêmica. Agradeço especialmente ao meu marido, Magno, por sempre acreditar em mim e sempre me incentivar.

Agradeço aos amigos do LDBAC por toda companhia, todas as risadas, toda ajuda e todos os palpites que foram refinando esse trabalho.

Agradeço à Prof. Cidinha que aceitou me orientar e desde então tem se mostrado uma ótima conselheira. Obrigada por manter a porta sempre aberta, me atender nos momentos de calma e me acalmar naqueles de desespero, sempre com carinho.

Agradeço aos meus co-orientadores, Prof. Leandro Licursi e Prof. Marcelo Henrique, por terem me ajudado durante esse trabalho, tirando minhas dúvidas e dando sugestões preciosas.

Agradeço aos funcionários do setor de preventiva, principalmente ao Sr. Luíz, Marquinho e Marcinho por terem me dado as dicas mais valiosas, sem as quais esse trabalho não seria concluído.

Agradeço à Rosi, que descomplicou toda a burocracia que eu deveria enfrentar.

Agradeço ao meu chefe, Prof. Ricardo Santos, por me encorajar e apoiar minha titulação.

Agradeço aos amigos da Agroecologia, que sempre entenderam minha ausência e torceram pelo meu sucesso.

Agradeço a todos os professores que tive em minha vida. Vocês foram fundamentais para minha formação e moldaram minha paixão pelos estudos!

Agradeço à UFV pela minha formação e por todas as experiências proporcionadas.

Agradeço ao CNPq, à Capes e à Fapemig pelo suporte financeiro.

## BIOGRAFIA

Mariana de Barros, filha de José Vieira de Barros e Aparecida Helena da Silva de Barros, nasceu em Santo André, SP, em 19 de setembro de 1985.

Em março de 2004 iniciou seus estudos em Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa. Em março de 2008 transferiu-se para o curso de Medicina Veterinária na mesma instituição. Em maio de 2011 graduou-se.

Em agosto de 2014 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa sob orientação da Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Em julho de 2016 submeteu-se à defesa de dissertação



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Mastite.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Compostos de origem vegetal .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.1 <i>Rheedia brasiliensis</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Metais como antimicrobianos .....</b>	<b>10</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Objetivo geral .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>12</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
<b>4.1 Isolados, meio de cultura e condições para estocagem .....</b>	<b>13</b>
<b>4.2 Compostos testados.....</b>	<b>13</b>
<b>4.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....</b>	<b>14</b>
<b>4.4 Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....</b>	<b>15</b>
<b>4.5 Curva de tempo de morte .....</b>	<b>15</b>
<b>4.6 Teste de liberação de proteína.....</b>	<b>16</b>
<b>4.7 Avaliação da aderência.....</b>	<b>16</b>
<b>4.8 Efeito citotóxico em MAC-T .....</b>	<b>17</b>
<b>4.9 Análise estatística .....</b>	<b>19</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....</b>	<b>20</b>
<b>5.2 Curva de tempo de morte .....</b>	<b>24</b>

<b>5.3</b>	<b>Teste de liberação de proteína.....</b>	<b>26</b>
<b>5.4</b>	<b>Avaliação da aderência.....</b>	<b>28</b>
<b>5.5</b>	<b>Teste de citotoxicidade.....</b>	<b>30</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>34</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frutos de <i>Rheedia brasiliensis</i> (bacupari). .....	9
Figura 2 - Estrutura química de 7-epiclusianona.....	9
Figura 3 - Estrutura química de 7-epiclusianona-cobre. ....	11
Figura 4 - Multiplicação de <i>Streptococcus agalactiae</i> 3930, <i>S. agalactiae</i> 4038, <i>Streptococcus uberis</i> 959 e <i>S. uberis</i> 3580 isoladas de mastite bovina submetidas a diferentes concentrações de 7-epiclusianona por 24 horas.....	20
Figura 5 - Multiplicação dos isolados <i>Streptococcus agalactiae</i> 3930, <i>S. agalactiae</i> 4038, <i>Streptococcus uberis</i> 959 e <i>S. uberis</i> 3580 isoladas de mastite submetidas a diferentes concentrações de 7-epiclusianona-cobre por 24 horas.	21
Figura 6 - Curva de tempo de morte de <i>Streptococcus agalactiae</i> isolado de mastite após tratamento com os compostos 7-epiclusianona e 7-epiclusianona-Cu nas concentrações inibitória mínima e bactericida mínima .....	24
Figura 7 - Curva de tempo de morte de <i>Streptococcus uberis</i> isolado de mastite após tratamento com os compostos 7-epiclusianona e 7-epiclusianona-Cu nas concentrações inibitória mínima e bactericida mínima.....	25
Figura 8 - Concentração de proteínas no sobrenadante da cultura de <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Streptococcus uberis</i> após tratamento com 7-epiclusianona e 7-epiclusianona-cobre.....	27
Figura 9 - Aderência de <i>Streptococcus agalactiae</i> submetido à 1/2 concentração inibitória mínima de 7-epiclusianona e seu complexo com cobre.	28
Figura 10 - Aderência de <i>Streptococcus uberis</i> submetido à 1/2 concentração inibitória mínima de 7-epiclusianona e seu complexo com cobre.....	29
Figura 11 - Viabilidade de células MAC-T pelos ensaios de MTT e captação de vermelho neutro. ....	31

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Valores de concentração bactericida mínima para os *Streptococcus agalactiae* 4038, *Streptococcus uberis* 959 e *S. uberis* 5880 isolados de mastite bovina em relação aos compostos 7-epiclusianona e 7-epiclusianona-cobre. .22

Tabela 2 - Valores médios de absorvância (550 nm) de células MAC-T submetidas a 7-epiclusianona e 7-epiclusianona-cobre nas concentrações inibitória mínima e 7×CIM, após ensaios do MTT e captação do vermelho neutro.....31

## LISTA DE ABREVIATURAS

aC - Antes de Cristo

BSA - Albumina de soro bovino

BHI - Infusão de cérebro e coração

CBM - Concentração Bactericida Mínima

DEQ - Departamento de Química

DMSO - Dimetilsulfóxido

MAC-T - Célula alveolar mamária bovina

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

NR - Vermelho Neutro

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão fosfato salino

UFC - Unidade formadora de colônia

UFV - Universidade Federal de Viçosa

## RESUMO

BARROS, Mariana de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Atividade de 7-epiclusianona e do complexo metálico 7-epiclusianona-cobre sobre *Streptococcus* spp. isoladas de mastite bovina.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira e Marcelo Henrique dos Santos.

Mastite é uma inflamação da glândula mamária e é apontada como a maior causa de perdas econômicas na cadeia láctea mundial. As espécies de *Streptococcus* estão entre os principais patógenos da mastite. É notável a emergência de patógenos resistentes aos compostos tradicionalmente usados para o controle de doenças. Dessa forma, novas alternativas têm sido buscadas nos produtos naturais, destacando-se as plantas. *Rheedia brasiliensis* é muito utilizada na medicina popular brasileira com diversos fins terapêuticos. Foi isolado de seu fruto a benzofenona 7-epiclusianona. Uma boa estratégia para aumentar a atividade antimicrobiana é complexar moléculas ativas com metais. Assim, foi sintetizado um complexo metálico composto por duas moléculas de 7-epiclusianona com cobre. O objetivo do presente trabalho foi verificar a atividade de 7-epiclusianona (7-epi) e do complexo metálico 7-epiclusianona-cobre (7-epi-Cu) sobre bactérias do gênero *Streptococcus* isoladas de mastite bovina, e avaliar a citotoxicidade dessas moléculas sobre células MAC-T. Foram utilizados para esse estudo quatro isolados de mastite bovina, dois de *Streptococcus agalactiae* (SA3930 e SA4038) e dois de *Streptococcus uberis* (SU959 e SU3580). Eles foram submetidos ao teste de concentração inibitória mínima (CIM) através da microdiluição em caldo, e também foi determinada a concentração bactericida mínima (CBM) em caldo. A curva de tempo de morte foi traçada a partir da contagem de Unidades Formadoras de Colônias em tempos pré-determinados durante 24 horas com os isolados submetidos à CIM e à CBM. O conteúdo de proteína no sobrenadante foi determinado pela centrifugação da suspensão bacteriana tratada com a CIM dos dois compostos, através do método de Bradford. Para avaliar a indução da aderência, foi utilizada uma concentração subinibitória dos compostos. O efeito citotóxico dos compostos foi medido através dos ensaios

do MTT e da captação de vermelho neutro sobre células MAC-T. As médias obtidas nos ensaios de MTT, vermelho neutro, teste de liberação de proteínas e avaliação da aderência foram comparadas pelo ANOVA seguido pelo Tukey. O nível de significância adotado foi 95% ( $p < 0,05$ ). As CIMs encontradas para os compostos 7-epi e 7-epiCu foram de  $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$  para as cepas SA4038, SU959 e SU3580. A cepa SA3930 foi resistente a maior concentração testada ( $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A CBM para SA4038 com 7-epi foi  $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para as demais combinações composto/isolado foi  $31,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A dinâmica da curva de tempo de morte para os compostos mostrou ação bacteriostática de uma maneira tempo/dose-independente. Não foi evidenciada a presença de proteína no sobrenadante das culturas tratadas com os compostos. 7-epi e 7-epi-Cu que, em subdose, não induziram a aderência das bactérias *S. agalactiae* e *S. uberis*. Ambos compostos não apresentaram atividade citotóxica quando na CIM para as células MAC-T, porém foram tóxicos na concentração  $7 \times \text{CIM}$ . Os compostos testados apresentaram excelentes resultados quanto à sua atividade contra essas bactérias Gram-positivas. Uma vez que os resultados dos dois compostos avaliados foram semelhantes, seria mais recomendada a utilização de 7-epi, por ser mais simples e barata sua produção.

## ABSTRACT

BARROS, Mariana de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Activity of 7-epiclusianone and metal complex 7-epiclusianone-copper on *Streptococcus* spp. isolated from bovine mastitis.** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisers: Leandro Licursi de Oliveira and Marcelo Henrique dos Santos.

Mastitis is an inflammation of the mammary gland and is identified as the major cause of economic losses in global dairy chain. *Streptococcus* species are among the main mastitis pathogens. It is remarkable the emergence of resistant pathogens to compounds traditionally used for disease control. Thus, new alternatives have been researched in natural products, especially plants. *Rheedia brasiliensis* is widely used in Brazilian folk medicine with various therapeutic purposes. It was isolated from its fruit the benzophenone 7-epiclusianone. A good strategy to enhance the antimicrobial activity is complex active molecules with metals. Then it was synthesized a metal complex with two molecules of 7-epiclusianone with copper. The aim of this study was to determine the activity of 7-epiclusianone (7-epi) and the metal complex 7-epiclusianone-copper (7-epi-Cu) on bovine mastitis isolated *Streptococcus* spp, and assess the cytotoxicity of these molecules on MAC-T cells. Were used for this study four bovine mastitis isolates, two *Streptococcus agalactiae* (SA3930 and SA4038) and two *Streptococcus uberis* (SU959 and SU3580). They were subjected to a minimum inhibitory concentration test (MIC) by broth microdilution and minimum bactericidal concentration (MBC) test in broth. Time-kill curve was plotted from Forming Units Colony count at predetermined times during 24 hours with the isolates submitted to the CIM and CBM. The protein content in the supernatant was determined by centrifugation of bacterial suspension treated with MIC of both compound by Bradford's method. To evaluate the induction of adhesion one sub-inhibitory concentration of the compounds was used. Cytotoxic effect of the compounds was measured through MTT assay and neutral red uptake on MAC-T cells. The average obtained in the MTT assay, neutral red uptake, protein leakage and adherence evaluation were compared by ANOVA followed by Tukey. The significance level



was 5% ( $p < 0.05$ ). The MICs found for compounds 7-epi and 7-epi-Cu was  $7.8 \mu\text{g mL}^{-1}$  to SA4038, SU959 and SU3580 strains. SA3930 strain was resistant to the highest concentration tested ( $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). CBM for SA4038 with 7-epi was  $15.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , for the other combinations compound/strain was  $31.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Time-kill curve dynamic of compounds showed bacteriostatic action in a manner time/dose independent. There was no evidence of protein in supernatant of cultures treated with the compounds. 7-epi-7-epi-Cu, in sub-doses, no induced *S. agalactiae* and *S. uberis* adhesion. Compounds tested showed no cytotoxic activity when at the MIC for the MAC-T cells, but were toxic in  $7\times\text{CIM}$ . Two compounds tested had excellent results for their activity against these Gram-positive bacteria. Since results of both compounds evaluated were similar, would most recommended use of 7-epi, because its simpler and cheaper production.

## 1 INTRODUÇÃO

Mastite bovina causa significantes perdas econômicas em todo o mundo devido à diminuição da produção leiteira, diminuição da qualidade do leite e aumento dos custos de produção e manejo. A doença representa risco à saúde pública uma vez que os produtos lácteos podem ser carreadores de patógenos causadores de zoonoses e suas toxinas, além da possível seleção de patógenos resistentes a antimicrobianos devido ao tratamento.

As espécies de *Streptococcus* estão entre os principais agentes etiológicos da mastite na indústria láctea mundial. *Streptococcus agalactiae* é um patógeno contagioso e causa mastite subclínica de longa duração. *Streptococcus uberis* é considerado um patógeno ambiental e está entre os principais agentes etiológicos de mastite em todo o mundo.

O controle da mastite é baseado na higiene da ordenha, manutenção dos equipamentos de ordenha, terapia antibiótica em animais em lactação ou secos, abate de animais cronicamente infectados e vacinação.

Para superar a resistência dos micro-organismos aos compostos tradicionais, novas alternativas têm sido buscadas nos produtos naturais para o tratamento de doenças. Dentre eles, destacam-se as plantas devido à sua ampla quimiodiversidade.

*Rheedia brasiliensis* é uma planta muito utilizada na medicina popular brasileira com diversos fins terapêuticos. Foi isolado de seu fruto o biocomposto 7-epiclusianona e existem vários relatos de suas diversificadas atividades biológicas.

Os compostos obtidos a partir de fontes naturais podem ser ligeiramente modificados de modo a torná-los mais eficazes. Uma boa estratégia para aumentar a atividade antimicrobiana é complexar moléculas ativas com metais. Há interesse crescente na literatura da investigação de complexos do  $\text{Cu}^{+2}$  por ser um metal barato e facilmente disponível. Foi sintetizado, então, um complexo metálico de duas moléculas de 7-epiclusianona com cobre.

O objetivo do presente trabalho foi verificar a atividade de 7-epiclusianona e do complexo metálico 7-epiclusianona-cobre sobre bactérias do gênero *Streptococcus* isoladas de mastite bovina, e avaliar a citotoxicidade dessas moléculas sobre células MAC-T.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mastite

Mastite é uma inflamação do parênquima da glândula mamária que atinge a saúde de bovinos e afeta a produção láctea em todo o mundo (RICHARDS et al., 2015). É uma doença complexa que envolve muitos fatores (PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006). A doença é responsável por grandes prejuízos à cadeia produtiva devido às lesões causadas nas células epiteliais secretoras da glândula mamária, diminuindo a produção e secreção da glândula como um todo (OLIVEIRA et al., 2012). Perdas anuais na indústria láctea devido à mastite são estimadas em aproximadamente 2 bilhões de dólares nos Estados Unidos (HAMADANI et al., 2013; NICKERSON; OLIVER, 2014).

A enfermidade resulta em alterações na composição do leite, principalmente no teor de lactose, gordura e proteína (HAMADANI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2012; PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006). Ocorre também aumento nas concentrações de componentes do soro sanguíneo no leite devido à reação inflamatória (soroalbumina, imunoglobulinas, cloreto e sódio), essas mudanças têm efeito direto e indireto nas propriedades tecnológicas de fabricação do leite, podendo diminuir a qualidade e tempo de prateleira do produto lácteo final (PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006).

As perdas econômicas são também atribuídas ao abate precoce de animais infectados (NANI et al., 2015), ao uso de drogas para tratamento e prevenção (WANG et al., 2015), ao leite descartado e ao tempo extra de trabalho do ordenhador gasto na separação dos animais e aplicação dos tratamentos (PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006). A presença de pequenas quantidades de antimicrobianos no leite devido ao tratamento da mastite é associado com as principais perdas da indústria láctea quando as culturas *starters* são destruídas ou têm sua atividade reduzida (PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006).

As penalidades severas impostas quando há presença de antimicrobianos no leite são o maior incentivo para assegurar que medidas efetivas são tomadas na origem para prevenir a contaminação (PETROVSKI; TRAJCEV;

BUNESKI, 2006). No Brasil, o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) instituído pela Portaria Ministerial n.º 51/1986, adequado pela Portaria Ministerial n.º 527/1995 e alterado pela Instrução Normativa 42/1999, objetiva promover a garantia de qualidade do sistema de produção de alimentos de origem animal ao longo das cadeias produtivas. Para isso, é composto por programas setoriais, para o monitoramento em carnes e demais produtos de origem animal. O programa para leite prevê os limites máximos de resíduos permitidos para diversas drogas, entre elas antimicrobianos (BRASIL, 1999).

Leite e produtos lácteos são fontes essenciais de comida para a maioria da população mundial (VLIEGHER et al., 2012). Preocupações relacionadas à saúde pública são uma realidade, uma vez que mastite, qualidade do leite e segurança alimentar dos produtos lácteos estão inter-relacionadas (ALTALHI; HASSAN, 2009). A presença de patógenos em leite cru não pasteurizado aumenta o risco da ingestão e transmissão desses, além da ingestão de toxinas potencialmente perigosas (ALTALHI; HASSAN, 2009; PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006). A potencial propagação de organismos zoonóticos através do leite, embora raro na era de pasteurização, continua a ser um risco especialmente nos nichos de mercado de produtos lácteos não pasteurizados e durante falhas na pasteurização (PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006). Além disso, existem relatos literários de micro-organismos que sobreviveram às temperaturas de pasteurização previstas na legislação (CARVALHO et al., 2012). O extenso uso de antimicrobianos no tratamento e controle de mastites tem também possíveis implicações para a saúde humana através do aumento de estirpes resistentes aos antimicrobianos que podem entrar na cadeia de alimentos ou através do aumento de reações alérgicas a essas drogas (PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006).

A contagem de células somáticas (CSS) no leite é uma ferramenta para inferir se existe infecção intramamária (HOQUE et al., 2014), uma vez que leucócitos mononucleares, monócitos, linfócitos e neutrófilos serão transportados ao úbere se houver infecção (DUARTE; FREITAS; BEXIGA, 2015). Pontos de corte para o diagnóstico a partir da CSS variam entre as publicações devido a diferenças entre os países, porém, o valor mais frequente para definir mastite subclínica é  $CSS \geq 200$  mil células  $mL^{-1}$  (DUARTE; FREITAS; BEXIGA, 2015). No Brasil, a Instrução Normativa 62 prevê limites

máximos de 400 mil células mL<sup>-1</sup> em leite cru refrigerado para as regiões sul, sudeste e centro-oeste e 500 mil células mL<sup>-1</sup> para as regiões norte e nordeste (BRASIL, 2011).

Quanto à etiologia da doença, a mastite pode ser causada por infecção microbiana (mais frequente), mas pode haver causas não-infecciosas quando provocada por fatores químicos, físicos ou traumáticos (BARLOW, 2011).

Quanto ao curso de duração, a doença pode ser classificada em aguda e crônica. A forma aguda e clínica da doença é facilmente reconhecida, a forma crônica e subclínica somente pode ser detectada através de testes de campo ou de laboratório (CHANDRASHEKHAR et al., 2015), uma vez que não são visíveis alterações no leite ou na glândula mamária (GÜRLER et al., 2015).

Quanto à intensidade dos sintomas e sinais, pode ser classificada em clínica e subclínica. A mastite clínica é caracterizada por início súbito, inchaço, vermelhidão e dor no úbere, além de secreção de leite reduzida nos quartos afetados. O leite pode ter coágulos, flocos ou exibir consistência aguada. O animal pode apresentar febre, depressão e anorexia. A mastite subclínica, por sua vez, é caracterizada por não ter sinais visíveis tanto no úbere quanto no leite, mas há redução na produção láctea e aumento da contagem de células somáticas, tendo menor impacto em novilhas (HAMADANI et al., 2013; KULKARNI; KALIWAL, 2013; ROYSTER; WAGNER, 2015). As perdas econômicas relacionadas à mastite subclínica podem não ser percebidas pelos produtores (PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006).

Epidemiologicamente, a mastite é dividida em ambiental e contagiosa. Na mastite contagiosa, os patógenos são transmitidos de um animal doente a um saudável através de fômites no momento da ordenha (ROYSTER; WAGNER, 2015). Os patógenos ambientais têm seu reservatório no ambiente onde a vaca vive (ROYSTER; WAGNER, 2015), encontram-se na serragem, cama, fezes e solo (KULKARNI; KALIWAL, 2013).

Quanto à via de infecção, a principal porta de entrada de patógenos é o orifício do teto, chamada de via ascendente (COSTA, 1998). A via descendente (hematógena) é menos prevalente, mas é a via de disseminação nos casos de mastite intersticial crônica observada na brucelose, listeriose e na tuberculose (COSTA, 1998).

Já foram identificados pelo menos 138 patógenos como causa de mastite (HAMADANI et al., 2013). Os organismos patogênicos são comumente

separados naqueles que causam a mastite contagiosa daqueles que causam mastite ambiental (HAMADANI et al., 2013). As espécies de *Streptococcus*, incluindo *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*, estão entre os principais patógenos da mastite na indústria láctea mundial (HAMADANI et al., 2013). *Streptococcus* são cocos Gram positivos, imóveis, não formadores de esporos, são homofermentadores, tendo ácido láctico como produto final da fermentação, arranjam-se em cadeia, são anaeróbios facultativos, catalase e oxidase negativos, podendo ou não produzir hemolisinas (QUINN et al., 2005). *S. agalactiae* é um patógeno obrigatório altamente contagioso e causa mastite subclínica de longa duração. *S. uberis* é considerado um patógeno ambiental (LEELAHAPONGSATHON et al., 2016), e está entre os principais agentes etiológicos de mastite em todo o mundo (SHOME et al., 2012).

Após invadir o canal do teto, os patógenos podem invadir e colonizar o alvéolo, onde produzem toxinas que causam injúria ao tecido secretório (que também pode ser promovido por trauma físico ou agentes químicos irritantes) culminando na inflamação do tecido com a passagem de leucócitos da corrente sanguínea para o lúmen do alvéolo (RESHI et al., 2015).

Os fatores de risco animal são: idade (prevalência de infecção aumenta com a idade, atingindo o máximo aos 7 anos); estágio da lactação (taxa de infecção maior na fase inicial e final da lactação); produção de leite (grandes produtoras são mais comumente afetadas do que baixas); raça (incidência menor em vacas zebuínas); taxa de ordenha e morfologia do úbere (taxa de ordenha alta e grande diâmetro do canal do teto têm sido associados com aumento da incidência de infecção intramamária); tamanho do rebanho (incidência é maior em grande rebanho); nutrição (alimentação proteica pode ser fator predisponente) e higiene (HAMADANI et al., 2013).

O controle da doença é baseado em diminuir a exposição do teto aos potenciais patógenos e aumentar a resistência dos animais à infecção (KULKARNI; KALIWAL, 2013). Assim, fundamenta-se na higiene da ordenha, manutenção periódica dos equipamentos de ordenha, terapia antibiótica em animais em lactação ou secos, abate de animais cronicamente infectados (NANI et al., 2015), nutrição (HAMADANI et al., 2013) e vacinação (VLIEGHER et al., 2012).

Apesar de intensas pesquisas e implementação de várias estratégias de controle por décadas, a mastite bovina ainda está presente nos rebanhos

leiteiros. A redução na prevalência de mastite subclínica foi mínima. Por outro lado, a incidência dos casos de mastite clínica foi reduzida em todo o mundo como resultado das medidas de controle (PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006).

O tratamento medicamentoso da mastite na lactação continua a ser comum, assim como o tratamento de vacas no período seco (ROYSTER; WAGNER, 2015), sendo que essa enfermidade é a causa primária do uso de drogas antimicrobianas em vacas leiteiras adultas (POL; RUEGG, 2007). Falhas na terapia antimicrobiana são atribuídas, entre outros, ao uso incorreto dos antimicrobianos, presença de biofilmes na superfície do tecido da glândula mamária e sistema de efluxo multidroga das bactérias (OSPINA, 2012), que são complexos proteicos capazes de transportar moléculas de vários tamanhos e propriedades do interior bacteriano para o espaço extracelular (BLAIR; PIDDOCK, 2016). Além disso, o uso indiscriminado de antimicrobianos pode promover a emergência de isolados resistentes (NANI et al., 2015). Os tratamentos malsucedidos têm motivado a busca por abordagens alternativas visando minimizar o uso de antimicrobianos (NANI et al., 2015).

## **2.2 Compostos de origem vegetal**

A utilização de plantas para controlar e debelar doenças é tão antiga quanto a espécie humana (MACIEL; PINTO; VEIGA JR., 2002). A evidência escrita mais antiga do uso das plantas medicinais para a preparação de drogas foi encontrada em uma laje de argila em Nagpur, Índia, com cerca de 5.000 anos de idade (PETROVSKA, 2012).

O conhecimento empírico das pessoas sobre a utilização e a eficácia de plantas medicinais contribui para a disseminação dos atributos terapêuticos dos vegetais, recomendados por seus efeitos medicinais, apesar de não terem seus princípios ativos determinados (MACIEL; PINTO; VEIGA JR., 2002). A busca por componentes ativos presentes em plantas medicinais só começou no século XIX, levando à concepção do primeiro medicamento com as características que conhecemos hoje (DUTRA et al., 2016). Em 1806, Friedrich Serturmer, foi um pioneiro isolando o alcaloide morfina da papoula, evento que

incentivou uma busca contínua por outros derivados de plantas medicinais (DUTRA et al., 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 70-80% da população mundial depende exclusivamente de ervas para os seus cuidados primários de saúde (SPONCHIADO et al., 2016). Ervas medicinais tradicionais desempenham um papel proeminente nos sistemas de saúde de muitos países (CHANDER et al., 2016). Na América do Sul, o uso de plantas medicinais contribui significativamente para os cuidados básicos com a saúde (PESSINI et al., 2003). No Brasil, a partir da década de 1980 diversos instrumentos normativos foram criados, baseados em instruções da OMS, incentivando a pesquisa e a utilização de fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2006).

O Brasil detém a maior biodiversidade no mundo, compreendendo mais de 45.000 espécies de plantas superiores, o que corresponde 20-22% do total de plantas existentes no planeta (DUTRA et al., 2016). Para o tratamento de infecções comuns, muitas plantas são utilizadas no Brasil na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos, sem nenhuma evidência científica de sua eficácia (PESSINI et al., 2003). Apesar da biodiversidade brasileira abundante e o grande interesse da população no uso da medicina tradicional, atualmente o mercado de fitoterapia brasileiro é muito modesto, representado por cerca de 261 milhões de dólares, o que representa menos de 5% do mercado da medicina brasileira, estimado em cerca de 28 bilhões de dólares em 2014 (DUTRA et al., 2016).

Os compostos derivados de plantas são atualmente empregados na terapia moderna, além de desempenharem um papel importante para a síntese de algumas moléculas mais complexas (DUTRA et al., 2016). Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos terapêuticos disponíveis são derivados de fontes naturais, principalmente plantas e micro-organismos (DUTRA et al., 2016).

Apesar dos progressos significativos feitos na pesquisa microbiológica e no controle de doenças infecciosas, epidemias recorrentes causadas por bactérias resistentes a drogas e o aparecimento de novas estirpes bacterianas patogênicas exigem a descoberta de novos antimicrobianos. (SHARMA et al., 2016). A resistência leva ao aumento de falhas terapêuticas e aumento dos custos do tratamento (AHMAD; VILJOEN, 2015). Dado que o tratamento e a prevenção da mastite representam o maior uso de antimicrobianos na pecuária



leiteira, constituindo-se em um custo substancial para a indústria (WANG et al., 2015), a busca por novos tratamentos para essa enfermidade apresenta-se como uma necessidade.

Nesse contexto, produtos naturais tornam-se uma importante fonte para a descoberta de novos agentes terapêuticos. Plantas são especialmente ricas nesses compostos devido a sua ampla quimiodiversidade (IONTA et al., 2015). Apesar do grande desenvolvimento de métodos para a síntese de produtos farmacêuticos, as plantas medicinais ainda representam importantes fontes de novas identidades moleculares, principalmente devido ao fato de que as plantas podem sintetizar e produzir constituintes que são difíceis de obter, através de síntese química (SPONCHIADO et al., 2016).

A população brasileira tem longa tradição no uso de plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças agudas e crônicas. Isso tem chamado a atenção dos pesquisadores brasileiros e algumas companhias farmacêuticas brasileiras para o estudo de plantas medicinais nativas e seus princípios ativos (DUTRA et al., 2016).

### 2.2.1 *Rheedia brasiliensis*

Plantas do gênero *Rheedia* são muito utilizadas na medicina popular para tratar inúmeras desordens, como constipação, reumatismo, inflamação e dor. Elas são ricas em flavonoides, benzofenonas, xantonas, terpenos e esteroides (CARVALHO-SILVA et al., 2012).

A espécie *Rheedia brasiliensis* é nativa da região Amazônica e cultivada em todo o território brasileiro, sendo conhecida popularmente como bacupari, bacoparé e bacuparí miúdo (SANTOS et al., 1999). Em 1999, Santos e colaboradores isolaram dos frutos de *R. brasiliensis* (Figura 1) um derivado tetraprenilado de benzofenona, a 7-epiclusianona (Figura 2).



Figura 1 - Frutos de *Rheedia brasiliensis* (bacupari). Disponível em: <<http://herbamedicinalis.blogspot.com.br/2015/09/bacupari-o-bacupari-garcinia.html>>

A molécula 7-epiclusianona mostra amplo espectro de atividades biológicas (IONTA et al., 2015). Foram relatados atividade contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (ALVES et al., 1999) e efeitos vasodilatador (CRUZ et al., 2006), anti-anafilático (NEVES et al., 2007), anti-HIV (PICCINELLI et al., 2005), antinoceceptivo e anti-inflamatório (SANTA-CECÍLIA et al., 2011), entre outros.

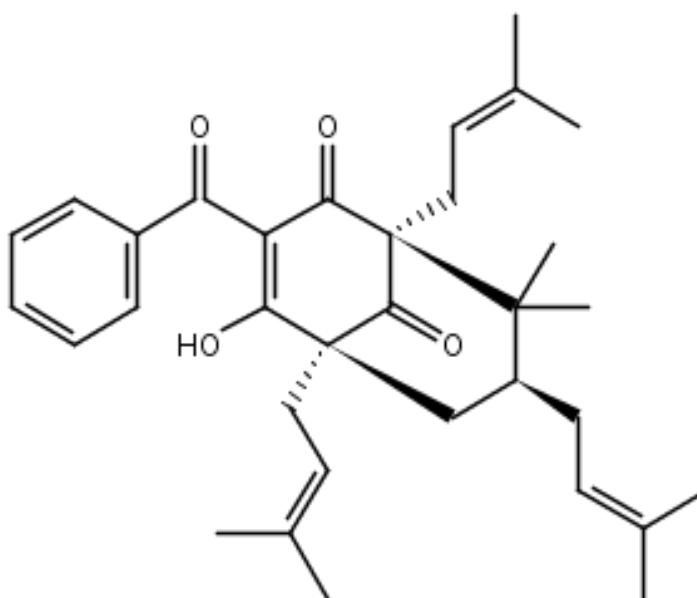


Figura 2 - Estrutura química de 7-epiclusianona.

Os compostos obtidos a partir de fontes naturais também podem servir como protótipos para a síntese de novos medicamentos com atividades

biológicas e terapêuticas semelhantes, ou ser ligeiramente modificado de modo a torná-los mais eficazes ou menos tóxicos (SPONCHIADO et al., 2016).

### 2.3 Metais como antimicrobianos

A atividade antimicrobiana de metais tais como prata (Ag), cobre (Cu), ouro (Au), titânio (Ti), e zinco (Zn), tendo cada um propriedades, potências e espectros de atividade diferentes, é conhecida e aplicada há séculos (DIZAJ et al., 2014). Prata e cobre têm sido utilizados desde tempos pré-históricos em forma de moedas, joias e utensílios de cozinha, etc. A principal razão para a utilização destes metais na vida diária é a sua inerente natureza antimicrobiana (INGLE; DURAN; RAI, 2014).

A utilização de íons metálicos e os seus compostos no tratamento de doença humana é conhecida há séculos. Historicamente, chineses e árabes utilizavam zinco para promover a cicatrização de feridas, enquanto os egípcios utilizavam cobre para esterilizar a água (NUNES et al., 2016). Anciões gregos no tempo de Hipócrates (400 aC) prescreviam cobre para doenças pulmonares e também para a purificação de água potável (INGLE; DURAN; RAI, 2014).

Hoje em dia, devido ao crescimento de bactérias multirresistentes a antimicrobianos, o uso de metais em medicina ressurgiu como uma área importante e promissora da pesquisa em farmacologia (NUNES et al., 2016). Destacam-se também os íons metálicos, devido a seu amplo espectro de atividade (AHMAD; VILJOEN, 2015). Por exemplo,  $\text{Cu}^{+1}$  pode causar disfunção proteica por destruição dos grupamentos Fe-S;  $\text{Cu}^{+2}$  pode danificar a parede celular bacteriana ou ser internalizado e interagir com o DNA bacteriano (NUNES et al., 2016).

Uma boa estratégia para aumentar a atividade antimicrobiana é complexar moléculas ativas com metais (SANTI et al., 2016). Há interesse crescente na literatura da investigação de complexos do  $\text{Cu}^{+2}$  (SILVA et al., 2015). Dentre os íons metálicos, cobre e seus compostos têm sido usados como agentes efetivos contra bactérias, fungos, vírus e moluscos. Além disso, cobre é um metal barato e está facilmente disponível, o que o torna atrativo para a síntese de novas moléculas (INGLE; DURAN; RAI, 2014).

Devido a isso, o grupo de pesquisa do Prof. Marcelo Henrique dos Santos (DEQ/UFV) sintetizou um complexo metálico de duas moléculas de 7-epiclusianona com cobre, denominado 7-epi-Cu (Figura 3).

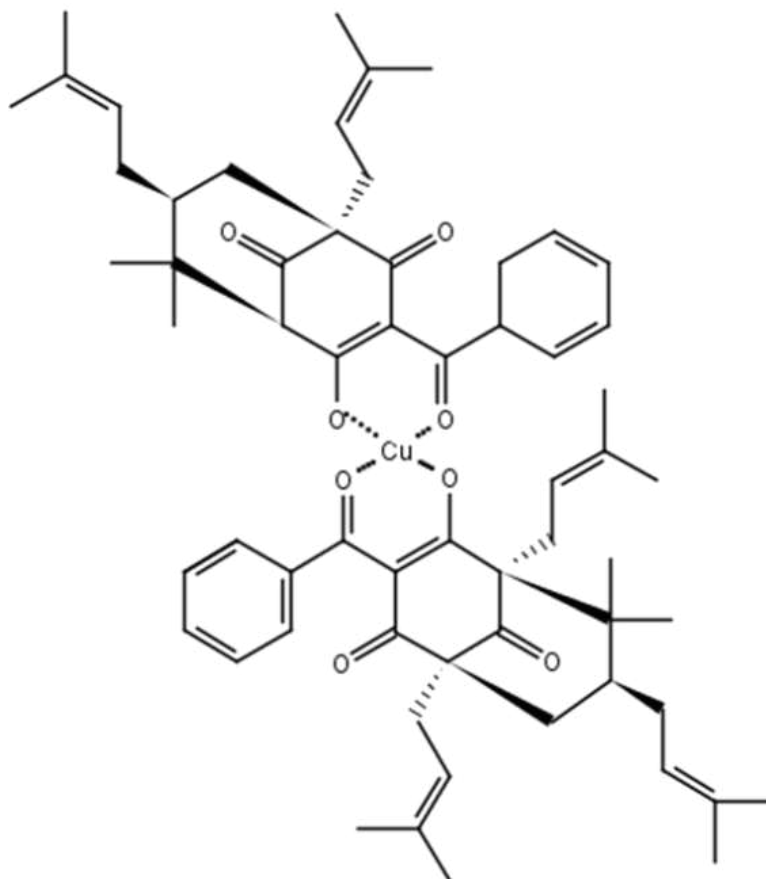


Figura 3 - Estrutura química de 7-epiclusianona-cobre.

No presente trabalho, o objetivo foi verificar a atividade antimicrobiana de 7-epiclusianona e do complexo metálico 7-epiclusianona-cobre sobre *Streptococcus* spp. isoladas de mastite bovina e avaliar a citotoxicidade desses compostos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Verificar a atividade antimicrobiana de 7-epiclusianona e do complexo metálico 7-epiclusianona-cobre sobre *Streptococcus* spp. isoladas de mastite bovina e a citotoxicidade desses compostos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar as concentrações inibitória e bactericida mínimas de 7-epiclusianona (7-epi) e de 7-epiclusianona-cobre (7-epi-Cu) sobre *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis* isoladas de mastite bovina.
- Verificar a dinâmica de ação de 7-epi e 7-epi-Cu contra os isolados em teste.
- Verificar a ação de 7-epi e 7-epi-Cu sobre a parede celular dos isolados de *Streptococcus* spp.
- Avaliar a influência de subdosagens de 7-epi e 7-epi-Cu na capacidade aderente de *Streptococcus* spp .
- Determinar a citotoxicidade de 7-epi e 7-epi-Cu em cultivo de células alveolares mamária bovina (MAC-T).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Isolados, meio de cultura e condições para estocagem

Isolados de *Streptococcus* spp obtidos de leite de bovinos com mastite, cedidos pela Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora – MG), foram estocados a – 80 °C em *Trypticase soy broth* (TSB, Himedia, Mumbai, India). Para utilização, os isolados foram reativados em TSB à 37 °C por 24 h.

Foram utilizados dois isolados de *Streptococcus agalactiae* SA3930, SA4038 e dois isolados de *S. uberis*, SU959 e SU3580. Após a reativação, cada isolado foi plaqueado em *Trypticase soy agar* (TSA, Himedia, Mumbai, India). No momento da utilização, foram retiradas três a cinco unidades formadoras de colônia (UFC), inoculadas em caldo TSB, a 37°C até atingir a densidade ótica (D.O.) 0,1 a 595 nm aferida em aparelho espectrofotômetro (Biomate 3, Thermo Spectronic, Madison, EUA). Esta concentração corresponde a aproximadamente  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, aferida previamente por contagem padrão em placa.

### 4.2 Compostos testados

Os compostos químicos testados foram gentilmente cedidos pelo Professor D.Sc. Marcelo Henrique dos Santos do Departamento de Química (DEQ, UFV). Foi utilizada uma benzofenona tetraprenilada denominada 7-epiclusianona (7-epi), isolada do fruto de bacupari (*Rheedia brasiliensis*), e um composto sintético derivado de 7-epi; formado por duas moléculas de 7-epiclusianona complexadas com cobre (7-epi-Cu). Os compostos encontravam-se liofilizados e foram armazenados a 4°C, protegidos da luz.

No momento da utilização, 1,0 mg de 7-epi foi solubilizado em 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e 500 µL de tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,6. A solubilização ocorreu com aquecimento em banho-maria (Modelo 102, Fanem, São Paulo, Brasil) a 60 °C, temperatura que

não deteriora os compostos. Para o composto 7-epi-Cu, 1,0 mg foi solubilizado em 1000 µL de DMSO e 1000 µL de PBS (pH 7,6), como feito para 7-epi. A diferença de massa utilizada entre os dois composto se deu devido à maior dificuldade em se solubilizar a 7-epi-Cu.

### 4.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os quatro isolados foram submetidos ao teste de Concentração Inibitória Mínima de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Resumidamente, após a solubilização dos compostos, foi realizada diluição seriada na base 2 em PBS (pH 7,6). Após os isolados atingirem a concentração  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, foram transferidos 100 µL da cultura para 10 mL de meio novo (TSB). Essa foi a concentração bacteriana utilizada para a realização do teste. Cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços (Nest Biotech Co., Wuxi, China) recebeu 100 µL de composto solubilizado e 100 µL de solução antibacteriana nas concentrações obtidas com a diluição seriada (1 a 125 µg mL<sup>-1</sup> para 7-epi e 0,5 a 62,5 µg mL<sup>-1</sup> para 7-epi-Cu). O controle de crescimento foi constituído de 100 µL de cultura bacteriana com 100 µL de TSB, e o controle de esterilidade 200 µL de TSB. O experimento foi realizado em triplicata e repetido três vezes. O controle do diluente DMSO foi realizado previamente e não interferiu na multiplicação microbiana até a concentração 125 µg mL<sup>-1</sup>. O controle para definir o efeito da coloração dos compostos na absorvância também foi realizado.

Após inoculação, a placa de microtitulação foi incubada em estufa bacteriológica (Mod. Luca 81/336, Lucadema, São José de Rio Preto, Brasil) a 37 °C por 24h. Em seguida, foi realizada leitura em aparelho espectrofotômetro leitor de placa (Titertek multiskan® Plus-MKII, Flow Laboratories, Inc., McLean, E.U.A) a 550 nm. Os resultados foram plotados em gráficos com auxílio do *software* Microsoft Excel® 2010. A CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir a multiplicação bacteriana, verificada por meio da turbidez da cultura comparada a dos controles.

#### 4.4 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CBM foi determinada segundo Dzutam (2016). Após a determinação da CIM foram tomados 50 µL de cada poço da placa de microtitulação onde não houve multiplicação bacteriana e foram transferidos para uma nova placa, com auxílio de micropipeta. Cada poço da nova placa também recebeu 150 µL de TSB. A placa foi incubada a 37 °C por 24 horas. Após incubação, a placa foi lida em aparelho espectrofotômetro (550 nm).

Foi considerada a CBM a menor concentração onde não houve multiplicação bacteriana, verificada por meio da turbidez da cultura comparada aos controles. O experimento foi realizado em triplicata e repetido, pelo menos, três vezes.

#### 4.5 Curva de tempo de morte

Foram utilizados apenas os isolados SA4038 e SU3580 tanto para esse ensaio como para os demais a partir dele, pois os resultados obtidos nos testes de CIM e CBM para os outros isolados tornavam sua utilização ilógica. A curva de tempo de morte foi determinada segundo Shi et al (2014), com modificações. Resumidamente, partindo da concentração  $10^7$ , as culturas em caldo foram incubadas com as concentrações equivalentes à CIM e à CBM determinadas anteriormente. A cada tempo pré-determinado, 0, 4, 8, 12 e 24h, uma alíquota de 50 µL foi retirada e a partir dela realizada uma diluição seriada na base 10 em salina 0,9% autoclavada. Cinquenta microlitros das diluições obtidos foram plaqueados em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) por espalhamento, em duplicata. O controle foi conduzido na ausência dos compostos testados. Após incubação das placas por 24 h a 37 °C, foram contadas as UFC's das placas que tiveram entre 25 e 300 colônias. Ao final, foi traçada uma curva da função logarítmica com as contagens obtidas com auxílio de software Microsoft Excel® 2010.



#### 4.6 Teste de liberação de proteína

A quantificação da liberação de proteínas pelos isolados SA4038 e SU3580 submetidos aos compostos 7-epi e 7-epi-Cu foi determinada segundo Oyedemi et al. (2009) e Bhande et al. (2013), com modificações. Resumidamente, o conteúdo de proteína no sobrenadante foi determinado pela centrifugação a  $3000\times g$  por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  da suspensão bacteriana em concentração  $10^5$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  tratada com a CIM dos dois compostos ( $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) nos tempos 0, 3, 6, 12, 24 e 48 h. A concentração das proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando Albumina de Soro Bovino (BSA) para traçar a curva padrão. Os controles utilizados foram as soluções bacterianas na ausência dos compostos e apenas os compostos. O resultado foi mensurado por espectrofotometria (550 nm).

#### 4.7 Avaliação da aderência

Os isolados SA4038 e SU3580 foram incubados em caldo até atingirem a concentração  $10^5$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ . Foi utilizada a concentração subinibitória dos compostos equivalente a  $\frac{1}{2}$  CIM (SILVA et al., 2014). Foram plaqueados 100  $\mu\text{L}$  de cultura de cada isolado com 100  $\mu\text{L}$  de solução dos compostos, por poço, em placas de microtitulação de 96 poços. O controle positivo foi constituído de 100  $\mu\text{L}$  de cultura com 100  $\mu\text{L}$  de solução salina 0,9% e para o controle negativo, 200  $\mu\text{L}$  de TSB. As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24h e a capacidade aderente foi analisada por espectrofotometria (550 nm). Foram realizadas três lavagens com água destilada, as placas secaram a temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas com 250  $\mu\text{L}$  de metanol por 15 min. Após secagem, os poços foram corados com solução de cristal violeta 2% por 10 min e lavados com água destilada autoclavada, e novamente, secos a temperatura ambiente. Finalmente, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial 33%, e foi realizada a leitura em espectrofotômetro.

A indução da aderência foi medida por absorbância em aparelho espectrofotômetro leitor de placa. Comparou-se a D.O. dos tratamentos com a

dos controles. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes.

## **4.8 Efeito citotóxico em MAC-T**

### **4.8.1. Cultivo celular**

A linhagem de células alveolares mamária bovina (MAC-T) foi cedida gentilmente pelo Dr. Yung-Fu Chang, do Colégio de Medicina Veterinária da Universidade de Cornell, Ithaca, NY, E.U.A. As células MAC-T foram cultivadas em placas de cultura de fundo chato de 96 poços em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e estreptomicina ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). As células foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de  $\text{O}_2$  por 24 h (Forma™ Series II 3110 Water-Jacketed  $\text{CO}_2$  Incubators, Thermo Scientific™, Waltham, EUA). O crescimento das células foi visualizado e acompanhado em microscópio invertido (IX70, Olympus®, Tóquio, Japão) até atingir a confluência ( $3 \times 10^5$  células) (SILVA et al., 2014).

### **4.8.2. Concentrações dos compostos**

Para cada composto, foram testadas duas diferentes concentrações: CIM e  $7 \times \text{CIM}$ . A concentração  $7 \times \text{CIM}$  foi testada por ser considerada um valor de segurança no caso de superdosagem.

### 4.8.3. Ensaio MTT

O sal de tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) tem seu anel clivado por desidrogenases mitocondriais formando cristais azul escuros de formazan. Essa reação só ocorre em células metabolicamente ativas, portanto, células vivas (MOSMANN, 1983).

A porcentagem de células viáveis foi mensurada como descrito por Al-Sheddi et al (2015). Brevemente, após atingirem a confluência, as células MAC-T foram expostas aos compostos nas concentrações CIM e 7×CIM por 24 h. Em seguida, adicionou-se 10 µl de MTT (solução estoque de 5 mg mL<sup>-1</sup> em PBS pH 7,6, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em 100 µl de meio e incubou-se a placa por 4 h. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 µl de DMSO por poço, para dissolver os cristais formados. Agitou-se a placa gentilmente. A cor desenvolvida foi lida em espectrofotômetro leitor de placa a 550 nm. Células que não foram expostas aos compostos serviram como controle. O experimento foi realizado em quadruplicata.

### 4.8.4. Ensaio de Captação de Vermelho Neutro

Vermelho neutro (NR) é um corante fracamente catiônico que se acumula em lisossomos de células vivas (BORENFREUND; PUERNER, 1985). Após 24 h de exposição aos compostos nas concentrações CIM e 7×CIM, o meio foi aspirado e as células MAC-T foram duas vezes lavadas com PBS (pH 7,6) e incubadas por 3 horas com meio suplementado com NR (50 µg mL<sup>-1</sup>). O meio foi lavado rapidamente com solução de formaldeído (0,5%, Wirath, São Paulo, Brasil) e cloreto de cálcio (1%, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, as células MAC-T foram incubadas por 20 minutos a 37°C em uma mistura de ácido acético (1%, Synth, Diadema, Brasil) e etanol (50%, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) para extrair o corante. As placas foram lidas a 550 nm. Os valores foram comparados com o controle constituído de células MAC-T que não foram expostas a nenhum composto (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). O experimento foi realizado em quadruplicata.

#### **4.9 Análise estatística**

As médias obtidas nos ensaios de MTT, vermelho neutro, teste de liberação de proteínas e avaliação da aderência foram comparadas pelo ANOVA seguido pelo Tukey, usando o software SASM-Agri (CANTERI et al., 2001). O nível de significância adotado foi 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM encontrada para os compostos 7-epiclusianona (7-epi) e 7-epiclusianona-cobre (7-epiCu) foi de  $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$  para as cepas SA4038, SU959 e SU3580. A cepa SA3930 foi resistente aos dois compostos nas maiores concentrações testadas que foram  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  para 7-epi e  $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para 7-epi-Cu (Figuras 4 e 5).

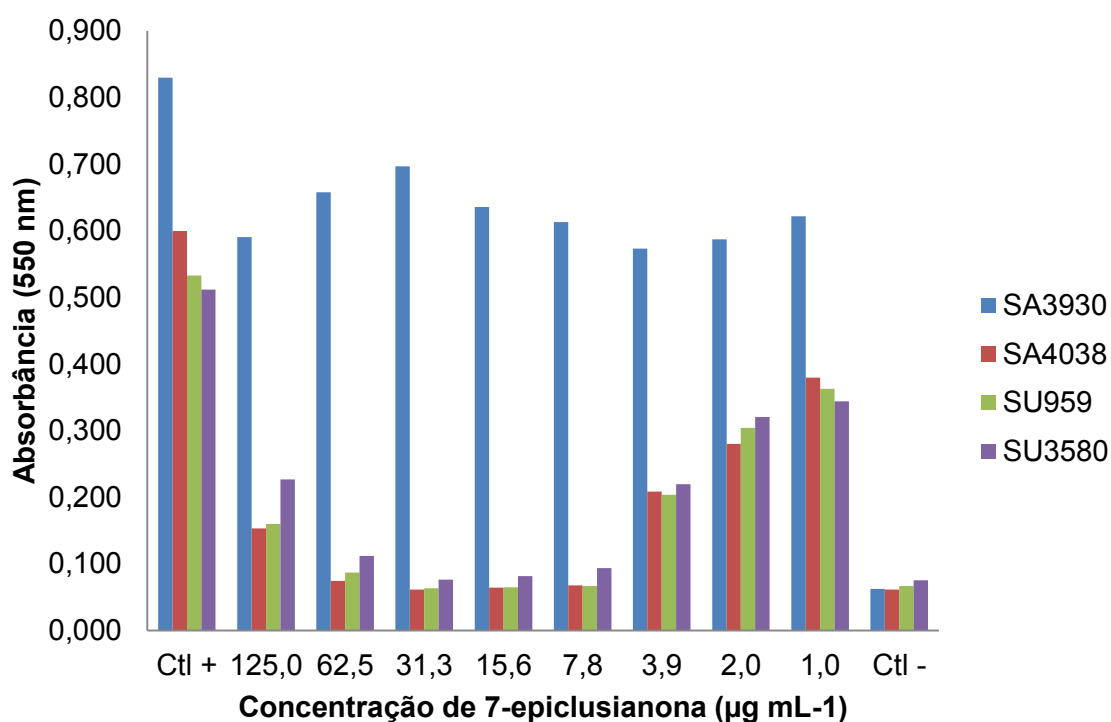


Figura 4 - Multiplicação de *Streptococcus agalactiae* 3930 (SA3930), *S. agalactiae* 4038 (SA4038), *Streptococcus uberis* 959 (SU959) e *S. uberis* 3580 (SU3580) isoladas de mastite bovina submetidas a diferentes concentrações de 7-epiclusianona por 24 horas. Ctl + = Controle de crescimento (100  $\mu\text{L}$  de cultura bacteriana + 100  $\mu\text{L}$  de TSB); Ctl - = Controle de esterilidade (200  $\mu\text{L}$  de TSB).

Os valores de concentração bactericida mínima são exibidos na tabela 1. A cepa SA3930 não foi utilizada no teste, uma vez que não apresentou sensibilidade aos compostos no teste da CIM.

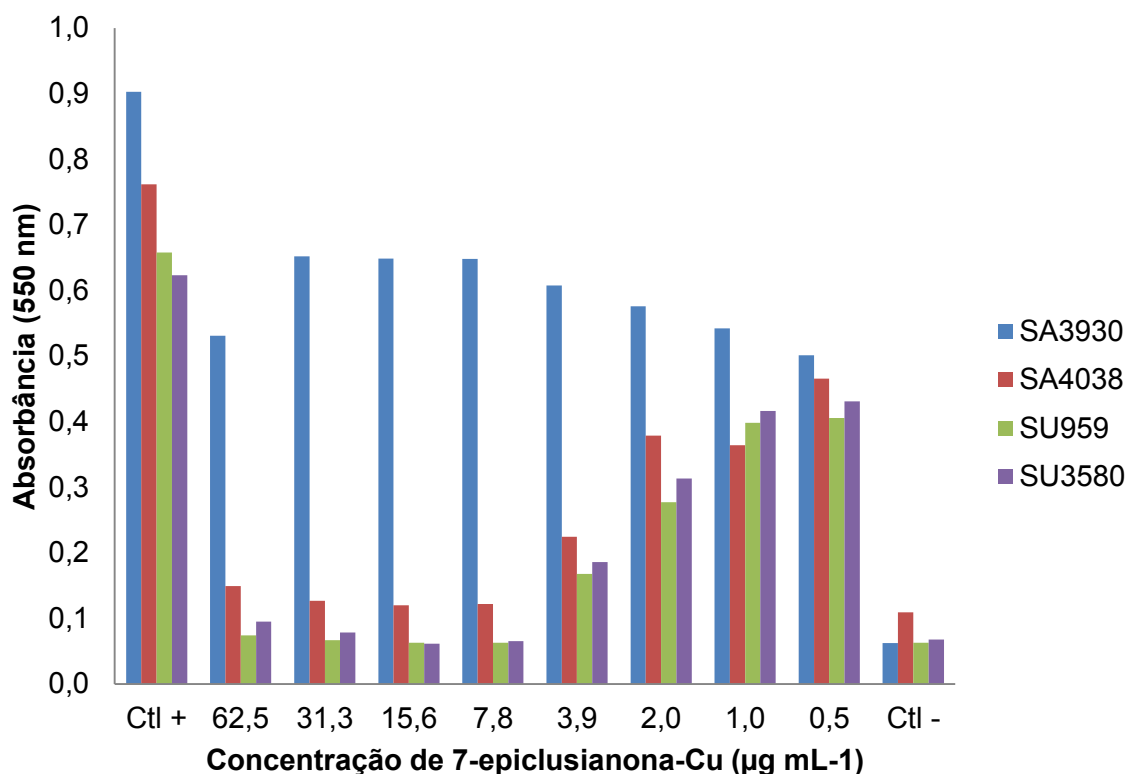


Figura 5 - Multiplicação dos isolados *Streptococcus agalactiae* 3930 (SA3930), *S. agalactiae* 4038 (SA4038), *Streptococcus uberis* 959 (SU959) e *S. uberis* 3580 (SU3580) isoladas de mastite submetidas a diferentes concentrações de 7-epiclusionona-cobre por 24 horas. Ctl + = Controle de crescimento (100 µL de cultura bacteriana + 100 µL de TSB); Ctl - = Controle de esterilidade (200 µL de TSB).

Em um estudo utilizando flavanonas isoladas de *Albizia myriophylla* foram encontrados valores de CIM variando de 0,98 a 125 µg mL<sup>-1</sup> sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Bacillus cereus* ATCC 11778 (JOYCHARAT et al., 2015). Fonseca e colaboradores (2013) avaliando a atividade de ácido *ent*-copálico, um diterpeno derivado de plantas, encontraram valores de CIM variando de 1,56 a 6,25 µg mL<sup>-1</sup> contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 e isolado de mastite), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386 e *Streptococcus dysgalactiae* ATCC 12238. Avaliando-se a atividade de

curcumina sobre *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 35984, Chusri e colaboradores (2016) encontraram valores de 32 e 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. A molécula  $\alpha$ -mangostina, apresentou valores de CIM variando de 1 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para esses mesmos isolados (CHUSRI et al., 2016).

Tabela 1 - Valores de concentração bactericida mínima para os *Streptococcus agalactiae* 4038 (SA4038), *Streptococcus uberis* 959 (SU959) e *S. uberis* 5880 (SU3580) isolados de mastite bovina em relação aos compostos 7-epiclusianona (7-epi) e 7-epiclusianona-cobre (7-epi-Cu).

Isolados	Compostos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
	7-epi	7-epi-Cu
<b>SA4038</b>	15,6	31,3
<b>SU959</b>	31,3	31,3
<b>SU3580</b>	31,3	31,3

Segundo Ríos e Recio (2005), valores de atividade inibitória abaixo de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para compostos isolados de plantas são considerados relevantes. Cos e colaboradores (2006), por sua vez, descrevem atividade inibitória significativa abaixo de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Assim, qualquer que seja o ponto de corte adotado para definir boa atividade antibacteriana, dentre os descritos na literatura, os dois compostos avaliados tiveram resultados satisfatórios.

Compostos isolados da casca de caule de *Ficus drupácea* tiveram valores de CBM variando de 40 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sobre bactérias Gram negativas e Gram positivas (YESSOUFOU et al., 2015). A benzofenona 7-epi apresentou valores de CBM variando de 10 a 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sobre *S. mutans* isolado de cárie dental (ALMEIDA et al., 2008), resultado próximo ao obtido no presente estudo para outras espécies de *Streptococcus*.

A fim de comparar os resultados entre as moléculas testadas, podemos converter a unidade de concentração dos compostos para  $\text{mmol L}^{-1}$ . Dessa maneira obtemos CIM de 15,53  $\text{mmol L}^{-1}$  para 7-epi e de 7,32  $\text{mmol L}^{-1}$  para 7-epi-Cu. Portanto, 7-epi-Cu é ativo numa concentração menor do que a metade da CIM de 7-epi. Esse valor pode ser explicado pela composição do complexo,

onde cada molécula é composta por duas moléculas de 7-epi e um íon de cobre II.

Os metais, dentre eles o cobre, possuem diversos mecanismos de toxicidade microbiana, dentre eles, disfunção de proteínas, produção de espécies reativas de oxigênio e depleção dos antioxidantes, danos à função da membrana, interferência na assimilação de nutrientes e também podem ser genotóxicos (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013). Uma vez que esse íon já foi relatado como efetivo contra bactérias e fungos isolados de mastite (WERNICKI et al., 2014), esperava-se, então, maior atividade do complexo em relação à molécula livre.

Comparando-se a atividade de sufatiazol e nimesulida complexados ou não com cobre, as moléculas com cobre exibiram resultados superiores, tendo apresentado atividade enquanto a molécula sem cobre não foi ativa (NUNES et al., 2016). Santi e colaboradores (2016) avaliaram a atividade biológica de xilitol livre e complexado com cobre e zinco, encontraram metade do valor de CIM (em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para os complexos, quando comparado com o xilitol livre. Em nosso estudo encontramos o mesmo valor de CIM para 7-epi e seu complexo com cobre,  $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Micro-organismos possuem mecanismos genéticos e bioquímicos para suportar a toxicidade do metal, como absorção reduzida, efluxo, sequestro extracelular, sequestro intracelular, reparo, contorno de vias metabólicas e modificação química (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013). Algum desses mecanismos pode explicar a semelhança, em termos de concentração, da atividade antibacteriana exibida pela benzofenona 7-epi e seu complexo com cobre.

Outra hipótese que explica a semelhança entre os valores de atividade entre 7-epi e 7-epi-Cu é a existência de impedimento estérico do cobre, ou seja, na conformação espacial da molécula o íon cobre pode não estar acessível, e, portanto, incapacitado de realizar qualquer atividade antibacteriana. Ainda, o tamanho do complexo pode impedir sua ação, uma vez que é uma molécula grande ( $1065,5 \text{ g mol}^{-1}$ ).



## 5.2 Curva de tempo de morte

A curva de tempo de morte tem a capacidade de simular diferentes perfis de concentração-tempo, oferecendo um complemento atrativo para os estudos *in vitro*, uma vez que pode aperfeiçoar o planejamento de dosagens (NIELSEN et al., 2007).

Foram utilizadas as cepas SA4038 e SU3580 para construir a curva de tempo de morte para os compostos em teste. A curva de tempo de morte de *S. agalactiae* é exibida na figura 6, e a de *S. uberis* é exibida na figura 7.

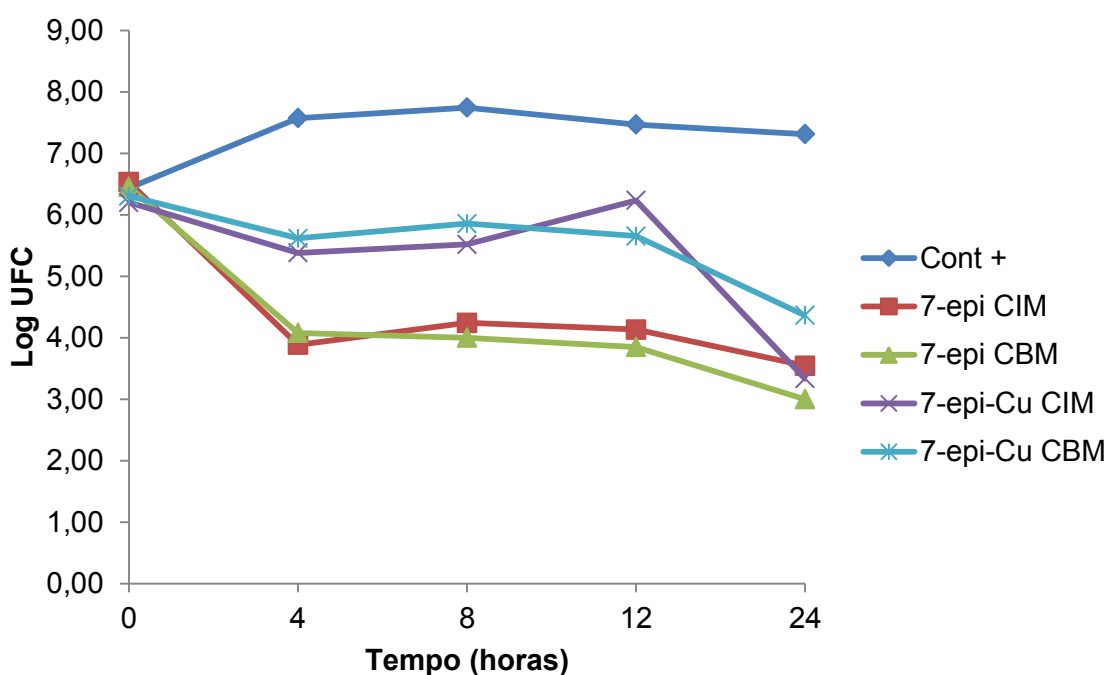


Figura 6 - Curva de tempo de morte de *Streptococcus agalactiae* isolado de mastite após tratamento com os compostos 7-epiclusianona (7-epi) e 7-epiclusianona-Cu (7-epi-Cu) nas concentrações inibitória mínima (CIM = 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e bactericida mínima (CBM = 15,6 e 31,3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para 7-epi e 7-epi-Cu, respectivamente). Cont + = Curva de crescimento para *S. agalactiae*.

A dinâmica da curva de tempo de morte de *S. agalactiae* tratada com 7-epi e 7-epi-Cu, mostra que esses dois compostos atuam inibindo a multiplicação dessa bactéria, tendo, portanto, ação bacteriostática. Esse

comportamento é observado também na CBM, que é uma concentração das drogas superior à CIM das mesmas.

A curva de tempo de morte de *S. uberis* submetida aos compostos 7-epi e 7-epi-Cu tem comportamento semelhante àquele de *S. agalactiae*, onde os compostos atuam retardando sua fase exponencial. Mais uma vez, mesmo em concentração superior à CIM, o comportamento bacteriostático se conserva.

O composto 7-epi e seu complexo com cobre mantiveram o mesmo comportamento durante o período observado, sempre inibiram a multiplicação bacteriana (Figuras 6 e 7). O comportamento foi semelhante também nas duas concentrações testadas. Isso mostra que os comportamentos de 7-epi e 7epi-Cu não são tempo/dose-dependentes.

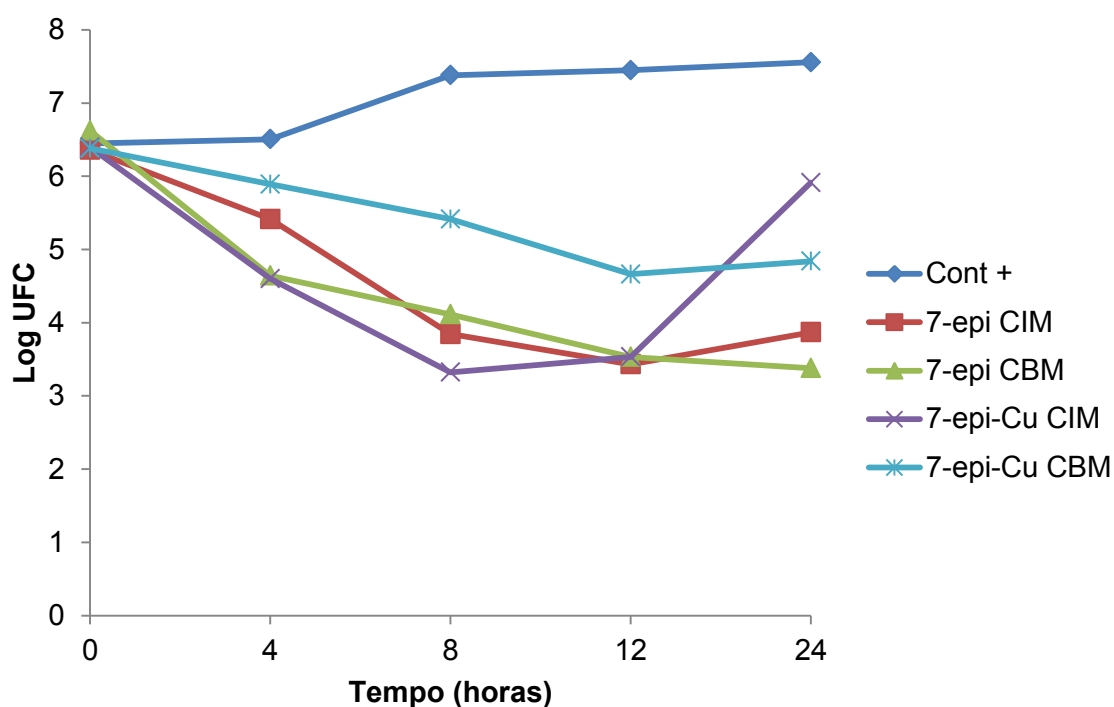


Figura 7 - Curva de tempo de morte de *Streptococcus uberis* isolado de mastite após tratamento com os compostos 7-epiclusianona (7-epi) e 7-epiclusianona-Cu (7-epi-Cu) nas concentrações inibitória mínima (CIM =  $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e bactericida mínima (CBM =  $31,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Cont + = Curva de crescimento para *S. uberis*.

O comportamento bacteriostático dos compostos 7-epi e 7-epi-Cu frente a essas duas espécies bacterianas não deve ser julgado como uma característica negativa. Pankey e Sabath (2004) descrevem que há poucos

relatos na literatura de maior importância clínica de drogas com ação bactericida *in vitro* quando comparadas a agentes bacteriostáticos, ou seja, os resultados obtidos *in vitro* não são suficientes para concluir sobre o comportamento *in vivo*. Além disso, a ação de uma droga pode ser dependente da carga bacteriana e da interação com o sistema imunitário no local de infecção (NEMETH; OESCH; KUSTER, 2015).

Uma complicação teórica do uso de agentes bacteriostáticos seria a recidiva da infecção após o tratamento, uma vez que não há eliminação total da infecção. Nemeth, Oesch e Kuster (2015), buscando distinção clinicamente relevante entre antimicrobianos bactericidas e bacteriostáticos, não encontraram diferença na taxa de reincidência entre essas duas categorias.

Compostos bactericidas podem ocasionar a liberação de toxinas e a liberação de fragmentos de parede celular, levando ao aumento de liberação de prostaglandinas, resultando em exacerbada resposta inflamatória (PANKEY; SABATH, 2004).

### 5.3 Teste de liberação de proteína

A presença de proteínas no sobrenadante é um indicativo de diminuição da integridade da parede celular bacteriana (DIAO et al., 2014). O corante Coomassie Brillante Blue G-250 tem sua absorvância aumentada quando ligado a proteínas (BRADFORD, 1976).

A quantificação das proteínas presentes no sobrenadante dos isolados *S. agalactiae* e *S. uberis* tratados com 7-epi e 7-epi-Cu nos tempos 0 e 48 horas é exibida na figura 8.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos e os controles em nenhum dos tempos estudados 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas (dados não exibidos), portanto, não foi evidenciada a presença de proteína no sobrenadante. Algumas combinações apresentaram valores de absorvância abaixo do branco do teste, o que resultou em uma concentração proteica menor que a desse parâmetro de comparação; porém essa discrepância não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

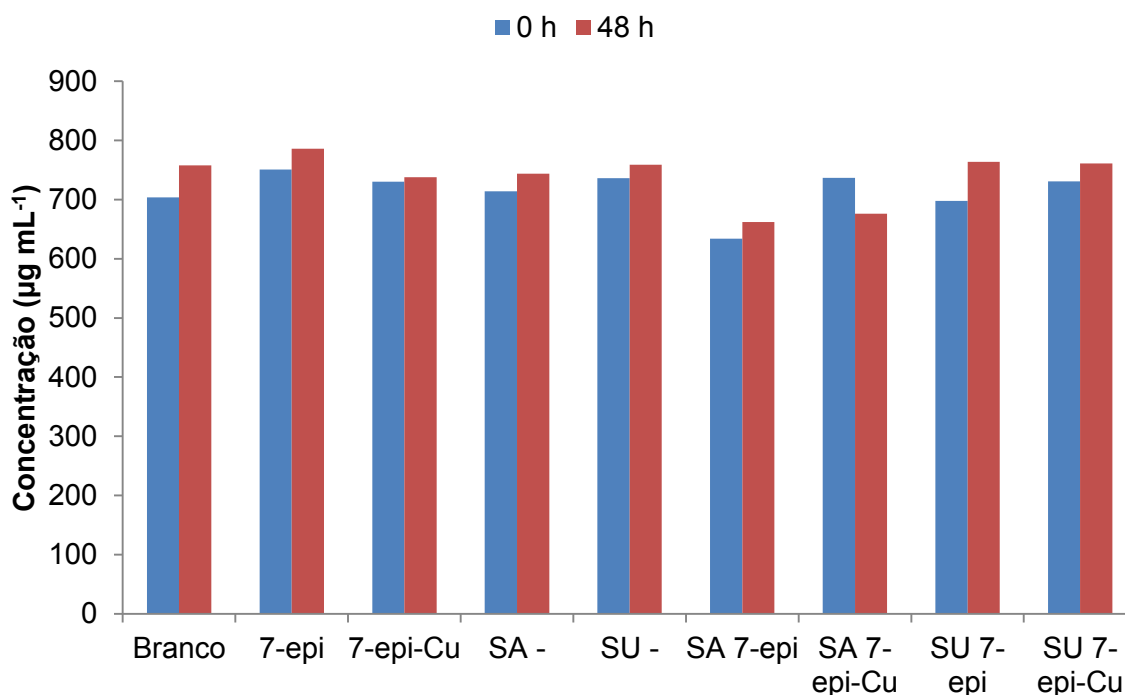


Figura 8 - Concentração de proteínas no sobrenadante da cultura de *Streptococcus agalactiae* (SA) e *Streptococcus uberis* (SU) após tratamento com 7-epiclusianona (7-epi) e 7-epiclusianona-cobre (7-epi-Cu). Não houve diferença entre os diferentes tratamentos, pela ANOVA, a 5% de significância. Branco (salina 0,85% + reagente de Bradford); 7-epi, 7-epi-Cu, SA- (*S. agalactiae* não tratada) e SU- (*S. uberis* não tratado) são os controles.

A ausência de proteínas no sobrenadante indica não haver alteração da integridade da parede celular. Esse resultado era esperado uma vez que os compostos que apresentam modo de ação bacteriostático e antimicrobianos bacteriostáticos atuam inibindo a síntese proteica bacteriana (BRÖTZ-OESTERHELT; BRUNNER, 2008). Antimicrobianos bactericidas, por sua vez, atuam inibindo a síntese de DNA, de RNA, da parede celular ou a síntese proteica (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010). As drogas bactericidas levam à morte bacteriana, portanto a lise celular resultaria em maior concentração de proteínas no sobrenadante.

## 5.4 Avaliação da aderência

Após tratamento com 7-epi e 7-epi-Cu, foi medida a aderência de *S. agalactiae* e *S. uberis*. Os resultados são mostrados nas figuras 9 e 10, respectivamente.

Os compostos 7-epi e 7-epi-Cu em subdose (1/2 CIM) não induziram a aderência das bactérias *S. agalactiae* e *S. uberis* isoladas de mastite bovina.

A indução da aderência tem relevância clínica visto que o estabelecimento bem-sucedido de infecção por patógenos bacterianos requer a adesão às células do hospedeiro e a colonização de tecidos (PIZARRO-CERDA; COSSART, 2006). Evidências sugerem que antimicrobianos em doses subterapêuticas, representam um estímulo para as bactérias alterarem seu metabolismo e expressar fatores de virulência como os de adesão e invasão (BRADLEY; GREEN, 2009; COSTA et al., 2012; HOFFMAN et al., 2005). Essas concentrações ocorrem no início e final dos regimes de dosagens e durante tratamentos de baixas doses (ODENHOLT, 2001; SILVA et al., 2014). Há aditivos na ração animal em concentrações abaixo da dose terapêutica (ppm) com o objetivo de promover o crescimento e controlar doenças em animais (WALLINGA; BURCH, 2013).

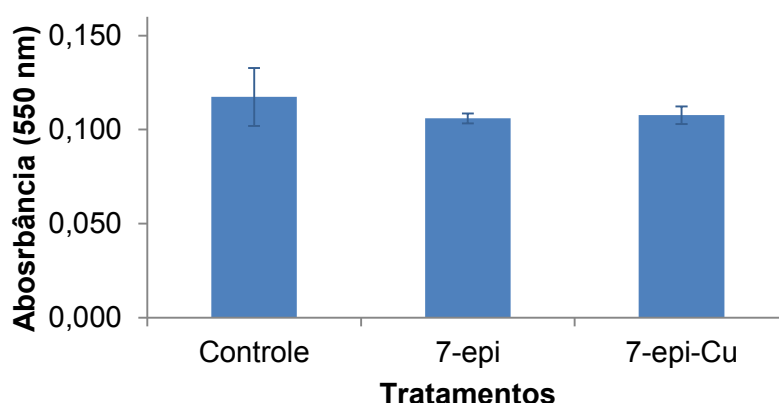


Figura 9 - Aderência de *Streptococcus agalactiae* submetido à 1/2 concentração inibitória mínima de 7-epiclusianona (7-epi) e seu complexo com cobre (7-epi-Cu). Não houve diferença entre os diferentes tratamentos, pela ANOVA, a 5% de significância. Controle = *S. agalactiae* não submetida a nenhum tratamento.

*Staphylococcus aureus* submetida a sub-doses de florfenicol e ciprofloxacina tiveram sua adesão às células do hospedeiro aumentada. Em *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, o uso de aminoglicosídeos também aumentou a aderência aos tecidos do hospedeiro (ANDERSSON; HUGHES, 2014).

A adesão e a internalização de *S. uberis* em células epiteliais mamárias são importantes eventos precoces no estabelecimento de mastite em vacas (ALMEIDA et al., 2015). A adesão de *S. agalactiae* às células hospedeiras constitui uma relevante etapa da colonização (CHUZEVILLE et al., 2015; NOBBS; JENKINSON; EVERETT, 2015).

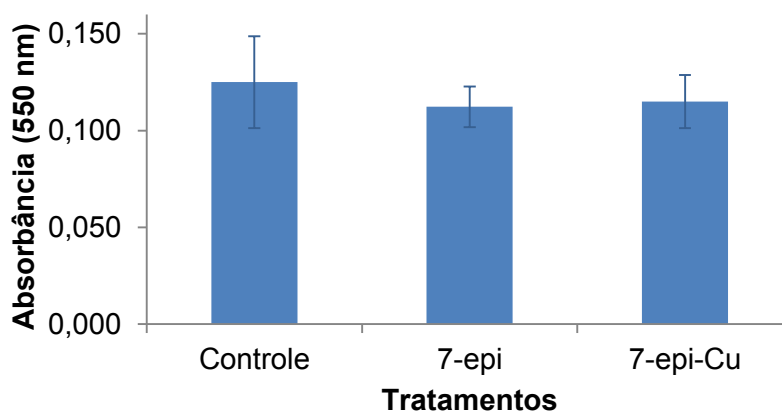


Figura 10 - Aderência de *Streptococcus uberis* submetido à 1/2 concentração inibitória mínima de 7-epiclusianona (7-epi) e seu complexo com cobre (7-epi-Cu). Não houve diferença entre os diferentes tratamentos, pela ANOVA, a 5% de significância. Controle: *S. uberis* na ausência de tratamento.

Adesão é o primeiro passo na instalação de uma infecção e também a primeira etapa na formação de biofilmes. A adesão bacteriana à superfície pode ser dividida em fases distintas: adesão primária e reversível, adesão secundária e reversível e formação de biofilme (DUNNE JR., 2002). Biofilme é definido como um aglomerado de células fechado numa matriz auto-produzida (GOMES; HENRIQUES, 2016). Devido à resistência de biofilmes aos antimicrobianos, a investigação biomédica está focando na capacidade das bactérias em formar biofilmes. Na medicina veterinária as características clínicas e resultados terapêuticos no tratamento da mastite sugerem a

formação de biofilme pelos patógenos causadores de mastite (MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006).

Os compostos aqui testados não induziram a adesão. Esse resultado é relevante clinicamente.

## 5.5 Teste de citotoxicidade

Após 24 horas de exposição aos compostos 7-epi e 7-epi-Cu, as células MAC-T foram submetidas aos testes de MTT e de captação de Vermelho Neutro (NR). A figura 11 mostra os resultados obtidos nos dois testes de citotoxicidade em termos de viabilidade celular.

Os valores médios de D.O. obtidos podem ser visualizados na tabela 2.

A comparação dos valores obtidos das células tratadas com o controle, pelo teste do MTT, mostra que não houve diferença estatística na formação de formazan pelas desidrogenases mitocondriais, portanto, as drogas em teste não são citotóxicas. Esses valores são semelhantes mesmo ao se usar a concentração sete vezes maior que a inibitória mínima.

Ao se avaliar os resultados obtidos na captação NR pelos lisossomos, houve diferença estatística até mesmo quando utilizada a CIM. Portanto, segundo essa metodologia, os compostos são considerados citotóxicos.

Notam-se resultados contraditórios entre os dois ensaios. Essa diferença entre as metodologias pode ser explicada pela maior sensibilidade da captação do NR em relação ao MTT (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Apesar das diferenças entre os tratamentos pelo ensaio da captação de NR terem sido estatisticamente significantes, não houve alteração da morfologia celular, quando as células foram expostas à CIM dos compostos (dados não mostrados). Nessa concentração, as células apresentaram-se como aquelas do controle. Isso não se repetiu ao se usar a concentração equivalente a 7×CIM. Nessa concentração as células mostraram-se mais arredondadas que o controle e com o citoplasma vacuolizado. Além disso, nesse tratamento houve desprendimento e lise celular.

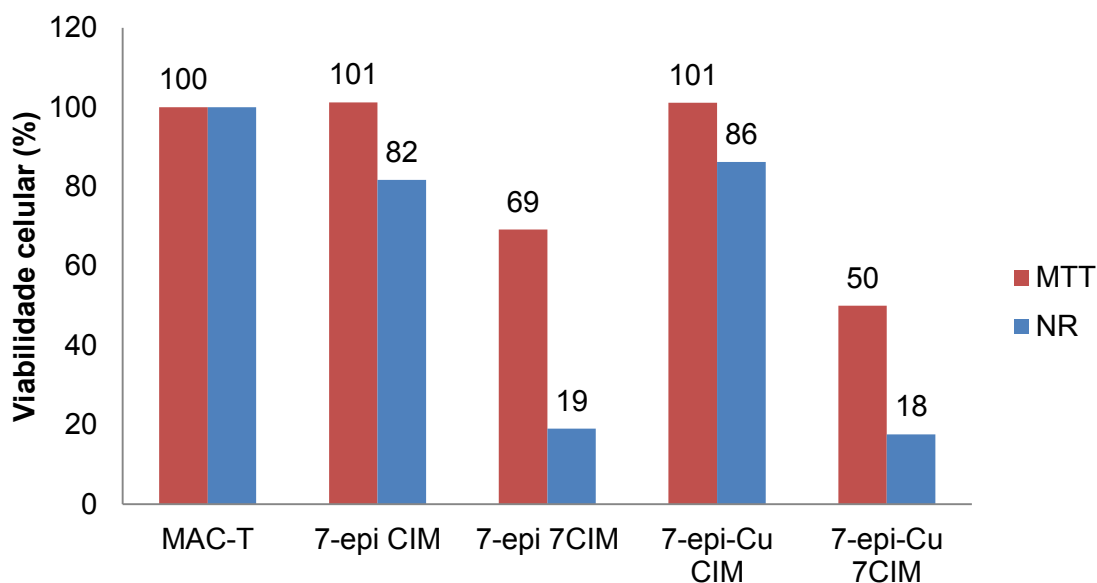


Figura 11 - Viabilidade de células MAC-T pelos ensaios de MTT e captação de vermelho neutro. Células MAC-T foram tratadas com 7-epiclusianona (7-epi) e 7-epiclusianona-cobre (7-epi-Cu) durante 24 h, na concentração inibitória mínima (CIM) e sete vezes essa concentração (7CIM). Os resultados foram apresentados como a viabilidade das células em relação ao controle (MAC-T), que foi considerado 100%.

Alterações morfológicas também foram visualizadas após o teste do MTT na concentração 7×CIM para os dois compostos (dados não mostrados).

Tabela 2 - Valores médios de absorbância (550 nm) de células MAC-T submetidas a 7-epiclusianona (7-epi) e 7-epiclusianona-cobre (7-epi-Cu) nas concentrações inibitória mínima (CIM) e 7×CIM, após ensaios do MTT e captação do vermelho neutro (NR). Controle: célula MAC-T sem exposição a nenhum composto.

Ensaio	Controle	7-epi		7-epi-Cu	
		CIM	7×CIM	CIM	7×CIM
MTT	1,728a	1,724a	1,457 <sup>a</sup>	1,31a	1,725a
NR	0,465a	0,379b	0,089c	0,401b	0,082c

Médias seguidas de mesma letra na linha não se diferenciam entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

Apesar dos resultados estatísticos, a análise microscópica da cultura celular submetida aos compostos permite dizer que ambos não apresentaram atividade citotóxica quando na concentração inibitória mínima para as células MAC-T, porém foram tóxicos na concentração 7×CIM. Sendo assim, são



necessários novos testes para definir qual a maior concentração que não será tóxica para essa linha celular.

## CONCLUSÃO

O biocomposto 7-epiclusianona e o complexo metálico 7-epiclusianona-cobre apresentaram valores de concentração inibitória mínima considerados ótimos pela literatura. Os dois compostos apresentaram modo de ação bacteriostático *in vitro*. A benzofenona 7-epi e seu complexo 7-epi-Cu não parecem ter atividade sobre a parede celular bacteriana e não influenciam a aderência de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis* isolados de mastite bovina. Os testes de citotoxicidade aliados à morfologia celular mostraram que os compostos não são tóxicos para as células MAC-T na concentração inibitória mínima, porém, o são em uma concentração sete vezes maior que essa, sendo, portanto, necessários mais estudos para decidir sobre a citotoxicidade dos compostos. As duas moléculas tiveram, então, excelentes resultados quanto à sua atividade contra essas bactérias Gram-positivas. Dado que 7-epi e 7-epi-Cu apresentaram valores de atividade próximos, talvez seja mais vantajosa a utilização de 7-epi sem complexá-la, uma vez que após o isolamento já apresenta níveis satisfatórios de atividade. A complexação dessa molécula com cobre onera os custos de produção e, conseqüentemente de tratamento, tanto em relação ao valor utilizado para aquisição desse metal quanto em relação ao tempo despendido no processo de complexação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, A.; VILJOEN, A. The *in vitro* antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. **Phytomedicine**, v. 22, n. 6, p. 657–665, 2015.
- ALMEIDA, L. S. B. et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 10, p. 886–891, 2008.
- ALMEIDA, R. A. et al. Role of *Streptococcus uberis* adhesion molecule in the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 3-4, p. 332–335, 2015.
- AL-SHEDDI, E. S. et al. Protective effect of *Lepidium sativum* seed extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver cells (HepG2). **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 2, p. 314–321, 2015.
- ALTALHI, A. D.; HASSAN, S. A. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. **Food Control**, v. 20, n. 10, p. 913–917, 2009.
- ALVES, T. M. D. A. et al. Biological Activities of 7-Epiclusianone. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 2, p. 369–371, 1999.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 465–78, 2014.
- BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: A multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 383–407, 2011.
- BHANDE, R. M. et al. Enhanced synergism of antibiotics with zinc oxide nanoparticles against extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers implicated in urinary tract infections. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2013.
- BLAIR, J. M. A.; PIDDOCK, L. J. V. How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 1–6, 2016.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, v. 24, n. 2-3, p. 119–124, 1985.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. Factors affecting cure when treating bovine

clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 5, p. 1941–1953, 2009.

BRASIL. Instrução Normativa 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCRC e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado – PCRP. **Diário Oficial** (da República Federativa do Brasil), p. 213, Brasília, de 22 de dezembro de 1999. Seção 1.

BRASIL. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. 1<sup>a</sup>. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica, 2006.

BRASIL. Instrução Normativa 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial** (da República Federativa do Brasil), p. 6, Brasília, de 30 de dezembro de 2011. Seção 1.

BRÖTZ-OESTERHELT, H.; BRUNNER, N. A. How many modes of action should an antibiotic have? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 564–573, 2008.

CANTERI, M. G. et al. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18–24, 2001.

CARVALHO, I. A. et al. Short communication: Recovery of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from retail pasteurized whole milk in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 6946–6948, 2012.

CARVALHO-SILVA, L. B. et al. Antioxidant, cytotoxic and antimutagenic activities of 7-epi-clusianone obtained from pericarp of *Garcinia brasiliensis*. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 180–186, 2012.

CHANDER, M. P. et al. Antimicrobial and antimalarial properties of medicinal plants used by the indigenous tribes of Andaman and Nicobar Islands, India. **Microbial Pathogenesis**, v. 96, p. 85–88, 2016.

CHANDRASHEKHAR, K. M. et al. Limit of detection of genomic DNA by conventional PCR for estimating the load of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* associated with bovine mastitis. **Folia Microbiologica**, v. 60, n. 6, p. 465–72, 2015.

CHUSRI, S. et al. Antibacterial and anti-biofilm effects of a polyherbal formula and its constituents against coagulase-negative and -positive staphylococci isolated from bovine mastitis. **Journal of Applied Animal Research**, p. 1–9, 2016.

CHUZEVILLE, S. et al. Antigen I/II encoded by integrative and conjugative elements of *Streptococcus agalactiae* and role in biofilm formation. **Microbial Pathogenesis**, v. 88, p. 1–9, 2015.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard**. Ninth ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratorial Standards Institute, 2012. v. 32

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290–302, 2006.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 1, p. 3–9, 1998.

COSTA, J. C. M. et al. Increased production of biofilms by *Escherichia coli* in the presence of enrofloxacin. **Veterinary microbiology**, v. 160, p. 488–490, 2012.

CRUZ, A. J. et al. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. **Phytomedicine**, v. 13, n. 6, p. 442–445, 2006.

DIAO, W.-R. et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 109–116, 2014.

DIZAJ, S. M. et al. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 278–284, 2014.

DUARTE, C. M.; FREITAS, P. P.; BEXIGA, R. Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 27, n. 6, p. 665–72, 2015.

DUNNE JR., W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–166, 2002.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 436, p. 1–25, 2016.

DZOTAM, J. K.; TOUANI, F. K.; KUETE, V. Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosoma mafaffa* Lam., *Moringa oleifera* (L.) Schott and *Passiflora edulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 9, 2016.

FONSECA, A. P. et al. In Vitro Antimicrobial Activity of Plant-Derived Diterpenes against Bovine Mastitis Bacteria. **Molecules**, v. 18, p. 7865–7872, 2013.

GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. **Current Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 377–382, 2016.

GÜRLER, H. et al. Investigation On The Etiology Of Subclinical Mastitis In Jersey And Hybrid Jersey Dairy Cows. **Acta Veterinaria**, v. 65, n. 3, p. 358–370, 2015.

HAMADANI, H. et al. Bovine Mastitis - A Disease of Serious Concern for Dairy Farmers. **International Journal of Livestock Research**, v. 3, n. 1, p. 42–55, 2013.

HOFFMAN, L. R. et al. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. **Nature**, v. 436, p. 1171–1175, 2005.

HOQUE, M. N. et al. Different screening tests and milk somatic cell count for the prevalence of subclinical bovine mastitis in Bangladesh. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 79–86, 2014.

INGLE, A. P.; DURAN, N.; RAI, M. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 1001–1009, 2014.

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

JOYCHARAT, N. et al. Chemical constituents and biological activities of *Albizia myriophylla* wood. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 62–73, 2015.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria : from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 423–435, 2010.

KULKARNI, A. G.; KALIWAL, B. B. Bovine Mastitis: A Review. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 4, n. 5, p. 543–548, 2013.

LEELAHAPONGSATHON, K. et al. Comparison of transmission dynamics between *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 2, p. 1418–26, 2016.

LEMIRE, J. A; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 371–84, 2013.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. M.; VEIGA JR., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **Veterinary Journal**, v. 171, n. 3, p. 398–407, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NANI, J. P. et al. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and their relation with somatic cell scores in Argentinean dairy cattle. **Journal of Applied Genetics**, v. 56, n. 4, p. 505–13, 2015.

NEMETH, J.; OESCH, G.; KUSTER, S. P. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 382–395, 2015.

NEVES, J. S. et al. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 73, n. 7, p. 644–649, 2007.

NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P. Review: How well have United States dairy producers adopted mastitis-control technologies for reducing herd somatic cell counts and improving milk quality? **The Professional Animal Scientist**, v. 30, n. 2014, p. 115–124, 2014.

NIELSEN, E. I. et al. Semimechanistic Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model for Assessment of Activity of Antibacterial Agents from Time-Kill Curve Experiments. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 128–136, 2007.

NOBBS, A. H.; JENKINSON, H. F.; EVERETT, D. B. Generic determinants of *Streptococcus* colonization and infection. **Infection, Genetics & Evolution**, v. 33, p. 361–370, 2015.

NUNES, J. H. B. et al. Synthesis, spectroscopic characterization, crystallographic studies and antibacterial assays of new copper(II) complexes with sulfathiazole and nimesulide. **Journal of Molecular Structure**, v. 1112, p. 14–20, 2016.

ODENHOLT, I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. **International journal of antimicrobial agents**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2001.

OLIVEIRA, J. M. B. DE et al. Fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Garanhuns, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 391–395, 2012.

OSPINA, M. A. **SISTEMAS DE EFLUXO MULTIDROGAS EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE MASTITE BOVINA E USO DE SEUS INIBIDORES COMO POSSÍVEIS ADJUVANTES**. 2012. 49 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864–870, 2004.

PESSINI, G. L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 21–24, 2003.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Review**, v. 6, n. 11, p. 1–5, 2012.

PETROVSKI, K. R.; TRAJCEV, M.; BUNESKI, G. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. **Journal Of The South African Veterinary Association-Tydskrif Van Die Suid-A**, v. 77, n. 2, p. 52–60, 2006.

PICCINELLI, A. L. et al. Structural revision of clusianone and 7-*epi*-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. **Tetrahedron**, v. 61, n. 34, p. 8206–8211, 2005.

PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. **Cell**, v. 124, p. 715–727, 2006.

POL, M.; RUEGG, P. L. Relationship Between Antimicrobial Drug Usage and Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Mastitis Pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 262–273, 2007.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–31, 2008.

RESHI, A. A. et al. Bovine Mastitis as an Evolving Disease and Its Impact on the Dairy Industry. **International Journal of Current Research and Review**, v. 7, n. 5, p. 48–55, 2015.

RICHARDS, V. P. et al. Genome Based Phylogeny and Comparative Genomic Analysis of Intra-Mammary Pathogenic *Escherichia coli*. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1–11, 2015.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 80–84, 2005.

ROYSTER, E.; WAGNER, S. Treatment of Mastitis in Cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 17–46, 2015.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 280–285, 2011.

SANTI, E. et al. Antimicrobial evaluation of new metallic complexes with xylitol active against *P. aeruginosa* and *C. albicans*: MIC determination, post-agent effect and Zn-uptake. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 155, p. 67–75, 2016.



SANTOS, M. H. DOS et al. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 654–660, set. 1999.

SHARMA, A. et al. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 1–66, 2016.

SHOME, B. R. et al. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* isolates from bovine milk. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 8, p. 1981–1992, 2012.

SILVA, P. B. et al. A Nanostructured Lipid System as a Strategy to Improve the In Vitro Antibacterial Activity of Copper(II) Complexes. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 761–772, 2015.

SILVA, V. O. et al. 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.

SPONCHIADO, G. et al. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 289–296, 2016.

VLIEGHER, S. et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1025–1040, 2012.

WALLINGA, D.; BURCH, D. G. S. Does adding routine antibiotics to animal feed pose a serious risk to human health? **BMJ**, v. 347, n. f4214, p. 9–11, 2013.

WANG, W. et al. Development of intramammary delivery systems containing lasalocid for the treatment of bovine mastitis: impact of solubility improvement on safety, efficacy, and milk distribution in dairy cattle. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 631–642, 2015.

WERNICKI, A. et al. Antimicrobial properties of gold, silver, copper and platinum against selected microorganisms isolated from cases of mastitis in cattle. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 70, n. 9, p. 4, 2014.

YESSOUFOU, K. et al. Antifungal, antibacterial and anticancer activities of *Ficus drupacea* L. stem bark extract and biologically active isolated compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 752–758, 2015.