

Samira de Aquino Leite Fiordalisi

**POTENCIAL DE PRODUTOS NATURAIS NO
CONTROLE DA MASTITE BOVINA: TEOR DE
FENÓLICOS E FLAVONOIDES, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E EFEITOS SOBRE CÉLULAS
EPITELIAIS MAMÁRIAS BOVINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agroecossistemas da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para obtenção do título de

Doutor em Agroecossistemas.

Orientador: Prof. Dr^a. Shirley Kuhnen

Co-orientadora: Dra. Luciana Honorato

**FLORIANÓPOLIS
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fiordalisi, Samira de Aquino Leite
POTENCIAL DE PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DA
MASTITE BOVINA: TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES,
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITOS SOBRE CÉLULAS
EPITELIAIS MAMÁRIAS BOVINA / Samira de Aquino Leite
Fiordalisi ; orientador, Shirley Kuhnen,
coorientador, Luciana Aparecida Honorato, 2018.
141 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Agroecossistemas, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Agroecossistemas. 2. Mastite bovina . 3.
Fitoterapia. 4. Agroecologia. I. Kuhnen, Shirley.
II. Honorato, Luciana Aparecida. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Agroecossistemas. IV. Título.

“Potencial de Produtos Naturais no Controle da Mastite Bovina: Teor de Fenólicos e Flavonóides, Atividade Antimicrobiana e Efeitos Sobre Células Epiteliais Mamárias Bovina”

Por

**SAMIRA DE AQUINO LEITE
FIORDALISI**

Tese julgada adequada, em 23 de agosto de 2018, e aprovada em sua forma final, pela Orientadora e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutora em Agroecossistemas. Área de Concentração Agroecologia, no Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias/UFSC.



Arcângelo Loss (Coordenador do Programa)

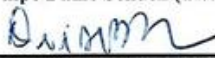
Banca Examinadora:



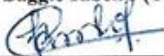
Luciana Aparecida Honorato (Presidente /Coorientadora)



Luiz Filipe Damé Schuch (Titular Externo/Universidade Federal de Pelotas)



Deise Helena Baggio Ribeiro (Titular Externo/PPGA/CTA/UFSC)



Fernanda Ramlov (Titular Externo/Programa de Biotecnologia e Biociências/CCB/UFSC)

Candidata ao título:



SAMIRA DE AQUINO LEITE FIORDALISI

Florianópolis, 23 de agosto de 2018

*Dedico este trabalho às pessoas que
mais amo... Luíza, Joana e
Antonela.*

AGRADECIMENTOS

É momento de agradecer, e muitos são os envolvidos nesta conquista.

Agradeço a minha família...

...à minha mãe, Maria Albertina, que desde sempre foi minha maior incentivadora.

... ao meu marido, William, que compreendeu todas as ausências e crises de humor durante todos estes anos de formação.

...às minhas filhas Luiza e Joana, que nos momentos de cansaço me supriram com um carinho revigorante e que me fazia entender o real motivo de tudo valer a pena.

...à minha neném Antonela, minha preciosa, que ao longo de quase 40 semanas aguentou comigo as jornadas diárias de trabalho e foi minha companheira nas horas cansativas de escrita durante as madrugadas. Aguardou pacientemente o dia da defesa da tese nascendo de maneira plena e emocionante, apenas três dias depois da apresentação.

Agradeço ao meu maravilhoso grupo de pesquisa...

...Aos amig@s querid@s do Laboratório de Bioquímica e Morfofisiologia Animal, foram muitos momentos inesquecíveis que guardarei sempre com muito carinho.

...As melhores orientadoras, Shirley e Luciana, sem o incentivo e apoio delas, principalmente na reta final, eu não teria conseguido.

...A banca examinadora, professores Luiz Felipe, Deise e Fernanda, que contribuíram com excelência para a melhoria do trabalho.

...A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas que sempre estiveram presente apoiando durante todas as fases da pesquisa.

...Ao Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Rural e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos que me acolheram durante a fase de formação e nesta fase profissional, agradeço pelo apoio e compreensão.

CAPES, que concedeu bolsa durante todo o doutorado, utilizando a minha formação.

*“A compaixão para com os animais
é das mais nobres virtudes da
natureza humana.”*

Charles Darwin

RESUMO

A mastite é a doença mais frequente e de maior impacto econômico em rebanhos leiteiros no mundo. O uso indiscriminado de antimicrobianos para o seu controle tem gerado graves problemas de saúde pública como a frequente presença de resíduos daqueles compostos em amostras comerciais de leite. Desse modo, a busca por métodos e/ou produtos alternativos que possam ser empregados na prevenção e tratamento da doença é de grande interesse. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de três produtos naturais, com reconhecidas propriedades biológicas, i.e., propolis, babosa (*Aloe vera*) e macela (*Achyrocline satureoides*), no tratamento da mastite bovina, empregando modelos de estudos *in vitro*. A composição química dos extratos, além da atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e os efeitos sobre células epiteliais mamárias bovina da linhagem MAC-T foram avaliadas. Com relação aos extratos de própolis, as amostras sazonais do Município de Urupema (SC) mostraram atividade antimicrobiana similar, estando relacionada ao sinergismo entre quercetina e demais compostos químicos dos extratos em estudo. A concentração inibitória mínima (CIM) variou de 140 µg/mL a 280 µg/mL. Nestas mesmas concentrações, elevada citotoxicidade foi encontrada às células MAC-T. No entanto, a perda da viabilidade celular esteve relacionada à indução de apoptose. No exsudato da folha de babosa, embora a sazonalidade tenha influenciado o conteúdo de aloína acumulado nas folhas, a atividade antimicrobiana foi similar, sendo a CIM 1000 µg/mL. Este produto mostrou elevado efeito tóxico às células MAC-T, causando redução significativa da viabilidade celular a partir de 7,8 µg/mL e IC₅₀ de 91,89 µg/mL. O estudo com a macela compreendeu amostras de duas origens geográficas (SC e RS) e dois métodos de preparação dos extratos. Os extratos hidroalcoólicos

mostraram maior atividade antimicrobiana que os decoctos, independentemente da origem geográfica da amostra. Para o decocto, enquanto a amostra de SC apresentou CIM de 1000 $\mu\text{g/mL}$, a do RS foi 250 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado, a CIM do extrato hidroalcoólico de SC foi 125 $\mu\text{g/mL}$ e o do RS foi 250 $\mu\text{g/mL}$. Embora o flavonoide quercetina tenha sido o composto majoritário em todas as amostras de macela analisadas, o método de extração exerceu influência sobre a composição química dos extratos, sendo os hidroalcoólicos com maiores teores de compostos fenólicos. Diferentemente do que foi observado para os outros produtos testados, a macela mostrou baixa toxicidade às células MAC-T. A IC₅₀ dos extratos aquosos sobre a viabilidade das MAC-T foi 1940 $\mu\text{g/mL}$ para a amostra de SC e 2066 $\mu\text{g/mL}$ para a amostra do RS. Para os extratos hidroalcoólicos, a IC₅₀ foi em torno de 500 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as origens. Em conjunto, pode-se verificar que os produtos estudados mostraram-se promissores para o controle da mastite bovina seja para uso interno (própolis ou macela) ou externo (babosa), constituindo uma alternativa viável principalmente para sistemas de produção orgânico ou agroecológico.

Palavras chaves: Mastite, própolis, macela, babosa, MAC-T.

ABSTRACT

Mastitis is the most frequent disease and of greatest economic impact in dairy herds in the world. The indiscriminate use of antimicrobials for its control has generated serious public health problems such as the frequent presence of residues of these compounds in commercial samples of milk. Thus, the search for alternative methods and / or products that may be employed in the prevention and treatment of the disease is of great interest. In this context, the present study had the objective of evaluating the potential of three natural products with recognized biological properties, ie, propolis, *Aloe vera* and macela (*Achyrocline satureoides*), in the treatment of bovine mastitis, using *in vitro* study models. The chemical composition of the extracts, the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and the effects on bovine mammary epithelial cells of the MAC-T lineage were evaluated. Regarding the propolis extracts, the seasonal samples from of Urupema (SC) showed similar antimicrobial activity, being related to the synergism between quercetin and other chemical compounds of the extracts under study. The minimum inhibitory concentration (MIC) ranged from 140 $\mu\text{g} / \text{mL}$ to 280 $\mu\text{g} / \text{mL}$. At these same concentrations, high cytotoxicity was found in MAC-T cells. However, the loss of cell viability was related to the induction of apoptosis. In the exudate of *Aloe vera* leaf, although the seasonality influenced the accumulated aloin content in the leaves, the antimicrobial activity was similar, with MIC being 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. This product showed a high toxic effect on MAC-T cells, causing a significant reduction in cell viability from 7.8 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and IC50 of 91.89 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The macela study comprised samples from two geographic origins (SC and RS) and two methods of preparing the extracts. Hydroalcoholic extracts showed higher antimicrobial activity than decocts, regardless of

the geographical origin of the sample. For the decoction, while the SC sample had MIC of 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$, the RS sample was 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$. On the other hand, the MIC of the hydroalcoholic extract of SC was 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and that of RS was 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Although the flavonoid quercetin was the major compound in all the analyzed, the extraction method exerted influence on the chemical composition of the extracts, being hydroalcoholic with higher contents of phenolic compounds. Unlike what was observed for the other products tested, the macela showed low toxicity to MAC-T cells. The IC 50 of the aqueous extracts on viability of MAC-T was 1940 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for the SC sample and 2066 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for the RS sample. For the hydroalcoholic extracts, the IC50 was around 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for both origins. Together, it can be verified that the products studied were promising for the control of bovine mastitis either for internal use (propolis or macela) or external (*Aloe vera*), constituting a viable alternative mainly for organic or agroecological production systems.

Key words: Mastitis, propolis, *Achyrocline satureoides*, *Aloe vera*, MAC-T.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Variação sazonal dos conteúdos* de fenólicos totais (μg de EAG/mg), flavonoides totais (μg QE/mg) e atividade antioxidante (% de inibição de radicais DPPH) dos extratos de propolis de Urupema..... 82
- Tabela 2. Conteúdo* dos principais compostos fenólicos nos extratos sazonais da propolis de Urupema (SC, Brasil). 85
- Tabela 3. Percentual* de inibição (%) do crescimento microbiano de *S. aureus* após exposição aos extratos sazonais de propolis de Urupema (SC, Brasil). 87
- Tabela 4. Porcentagem de viabilidade * das células MAC-T após exposição a diferentes concentrações dos extratos de propolis de Urupema coletados nas diferentes estações do ano. 89
- Tabela 5. Concentração Inibitória (IC50) de extratos de propolis de diferentes estações do ano em linhagem de células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T)..... 90
- Tabela 6. Percentual de inibição* (%) da cepa padrão de *S. aureus* ATCC (25923) e de sete isolados de leite mastítico frente às diferentes concentrações ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos extratos hidroalcoólicos e decoctos de Macela oriundos dos estados de Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS).127
- Tabela 7. Percentual de viabilidade celular em linhagem MAC-T * (%) após exposição à diferentes concentrações ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos extratos hidroalcoólicos e decoctos de macela coletados nos estados de Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS).....130

Tabela 8. Concentração Inibitória ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos, hidroalcolico e decocto de macela de RS e SC, capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular em linhagem de células epiteliais mamária bovina da linhagem MAC-T.131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Representação gráfica do percentual de células apoptóticas (quadrante superior e inferior direito), necróticas (quadrante superior esquerdo) e normais (quadrante inferior esquerdo) após tratamento com três diferentes concentrações de extrato primavera de propolis de Urupema. (B) Média de nove réplicas distribuídas em três experimentos independentes \pm DP do percentual de células em necrose, apoptose e sem alteração após 24h de tratamento com 60, 120 e 240 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de propolis primavera de Urupema. Letras maiúsculas representam diferenças no percentual de uma mesma alteração celular em diferentes concentrações testadas; letras minúsculas indicam diferenças significativas no percentual de alterações celulares distintas para uma mesma concentração testada ($p < 0,05$). 93

Figura 6. Conteúdo* de fenólicos (μg EAG/ mg) totais nos extratos de macela coletados em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, de acordo com o método de extração empregado ($P < 0,05$). *(média \pm desvio padrão). As letras diferentes representam diferenças estatística entre os extratos para uma mesma classe de compostos analisada 124

Figura 7. Concentração (μg / mg) de quercetina, luteolina e 3- θ -metilquercetina nos extratos de macela coletados em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, de acordo com o método de extração empregado ($P < 0,05$). *(média \pm desvio padrão). As letras diferentes representam diferenças na concentração de um mesmo composto em relação ao método de extração e origem. 126

Figura 8. Média de nove réplicas distribuídas em três experimentos independentes \pm DP do percentual de células em necrose, apoptose e sem alteração após 24h de tratamento com 250, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de hidroalcoólico de macela de Santa Catarina. Letras maiúsculas representam diferenças no percentual de uma mesma alteração celular em diferentes concentrações testadas; letras minúsculas indicam diferenças

significativas no percentual de alterações celulares distintas para
uma mesma concentração testada ($P < 0,05$). 134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlCl₃- Cloreto de Alumínio
BHI- Brain Heart Infusion (Infusão de Cérebro e Coração)
CCA- Centro de Ciências Agrárias
CEM- Células Epiteliais Mamárias
IC50- Concentração Inibitória de 50%
CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMH- Caldo Muller Hinton
CMT- California Mastitis Test (Teste de Mastite California)
CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DRS- Decocto Rio Grande do Sul
DSC- Decocto Santa Catarina
DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPPH- 2,2 Difetil-1-picrilidrazil
EAG- Equivalentes em Ácido Gálico
EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EF- Exsudato de folha
EH- Extrato Hidroalcolico
EM- Espectrofotometria de Massa
EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EQ- Equivalentes em Quercetina
EtOH- Etanol
FAASC- Federação das Associações de Apicultores de Santa Catarina (FAASC)
FEPAGRO- Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
H⁺- Cátion de Hidrogênio
H₂O- Água
HRS- Extrato hidroalcolico do Rio Grande do Sul
HSC- Extrato hidroalcolico de Santa Catarina
IV- inverno
IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC50- Concentração Inibitória 50%
IL-6- Interleucina 6
IL-8- Interleucina 8
IL-β- Interleucina β
IN- Instrução Normativa

IPVDF- Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
LABIMA- Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica Animal
LPS- Lipopolissacarídeo
MAC-T- Alveolar Mammary Cells (Células mamárias alveolares)
MTT- Brometo de 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Na₂CO₃- Carbonato de Sódio
NAPH- Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
OU- outono
pH- Potencial hidrogeniônico
PM- peso molecular
PMNs – Células Polimorfonucleares
PR- Primavera
RP- FAse Reversa
RS- Rio Grande do Sul
SC- Santa Catarina
SFB- Soro Fetal Bovino
TR – Tempo de Retenção
UFC- Unidades Formadoras de Colônias
UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina
VE- verão

LISTA DE SIMBOLOS

mL- mililitro
mg- miligrama
%- Percentual
°C – Graus Célsius
g- Grama
h- Hora
L- litro
μL- microlitro
μg- micrograma
μm- micrometro
mm- milímetro
mM- micromolar
min- minutos
nm- nanometro
rpm- Rotação por minuto

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	20
OBJETIVO.....	22
□ GERAL.....	22
□ ESPECÍFICO	22
CAPITULO I.....	24
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
1.1 Mastite bovina	24
1.2 Estratégias de controle e tratamento da mastite bovina	27
1.3 Implicações do uso de antimicrobianos no controle da mastite bovina.....	31
1.4 Produtos Naturais e sua aplicação no controle da Mastite	33
1.5 Modelos de estudos em Mastite bovina.....	40
1.6 Propolis	44
1.7 Babosa (<i>Aloe barbadensis</i>).....	47
1.8 Macela (<i>Achyrocline saturioides</i>)	49
REFERÊNCIAS.....	52
CAPITULO II- Influência sazonal na propolis de Urupema: screening fitoquímico, atividade antimicrobiana e efeito sobre células epiteliais mamárias bovina.....	75
1. INTRODUÇÃO.....	76
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	78
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4. CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS	96

CAPITULO III- <i>Aloe barbadensis</i> Miller leaf exudate is a potential treatment for bovine mastitis.....	107
CAPITULO IV- Efeito da origem geográfica e do método de extração sobre o potencial <i>in vitro</i> de extratos de <i>Achyrocline satureioides</i> (LAM.) D. C. (“macela”) no controle da mastite bovina.....	115
1. INTRODUÇÃO.....	116
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	118
2.1 Coleta e Extração de macela.....	119
2.2 Caracterização química.....	119
2.3 Atividade Antimicrobiana.....	120
2.4 Citotoxicidade.....	121
2.5 Análise da indução da apoptose celular.....	122
2.6 Análise Estatística.....	123
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	123
3.1 Fenólicos e Flavonoides Totais.....	123
3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	125
3.3 Atividade Antimicrobiana.....	127
3.4 Citotoxicidade.....	130
3.5 Indução da apoptose em células MAC-T.....	133
4. CONCLUSÃO.....	135
5. REFERENCIAS.....	135
CAPITULO V- Considerações Finais.....	142

INTRODUÇÃO

A mastite, inflamação da glândula mamária bovina, é descrita como o principal entrave sanitário para a produção leiteira mundial (MUSHTAQ et al., 2018a). Dentre esses, estão as perdas econômicas associadas ao alto volume de leite descartado durante o tratamento do animal, a queda na produção de leite, as alterações nos componentes lácteos, gerando um produto de baixa qualidade, os custos com medicamentos para o tratamento, além do custo com o possível descarte precoce do animal (VISSIO et al., 2015).

Em estudo recente com 48 rebanhos de gado de leite da província de Córdoba, maior bacia leiteira da Argentina, estimou-se que a perda média em volume de leite por conta da incidência de mastite é de 2,8 litros/vaca/dia, correspondendo a um custo de US\$ 0,99 vaca/dia (VISSIO et al., 2015). No Brasil, não há estudos sobre estimativas dos danos econômicos causados pela mastite. Em parte, isto se deve ao fato de que a preocupação com a qualidade do leite há pouco tempo vem sendo discutida no País. A primeira Política Nacional de Qualidade de leite foi instituída em 1996, e desde então uma série de instruções normativas (IN) vem sendo adaptadas à realidade dos produtores de leite brasileiros. No ano de 2011, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu a IN 62 que estabelecia padrões máximos de Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT) no leite cru comercializado no País. Até a metade do ano de 2016, os produtores das regiões sudeste, centro-oeste e sul do Brasil, deveriam se adequar aos parâmetros máximos de 500.000 células somáticas/mL e 300.000 unidades formadoras de colônias/mL de leite *in natura*. Entretanto, em virtude da não adequação de mais de 75% dos produtores a esta realidade exigida pela legislação, o MAPA prorrogou o prazo de ajustamento para 2018 em todo Brasil e para o ano de 2019 nas regiões nordeste e norte.

Entretanto, a extensão da prorrogação para entrada em vigência dos novos parâmetros não altera o cenário de baixa qualidade do leite produzido no País. Ao contrário, tende a causar desinteresse dos produtores e queda na credibilidade. Os produtores de leite, por sua vez, na tentativa de se adaptar a

legislação tem feito o uso cada vez mais frequente de antimicrobianos, muitas vezes não respeitando os períodos de carência dos medicamentos para a comercialização do leite, sendo este um grave problema de saúde pública (NERO et al., 2007; BIACCHI; JORGE; UENO, 2008; VIEIRA et al., 2012; RODRIGUES; DALL'AGNOL; BITTENCOURT, 2015; BRITO et al., 2016).

Além disto, o uso de antimicrobianos na produção leiteira para o controle de doenças, como a mastite, torna-se um obstáculo para a produção orgânica e agroecológica de leite. O leite orgânico, como previsto pela legislação através da IN nº 46, de 2011, deve ser produzido segundo rigorosas regras na cadeia produtiva que determinam desde padrões de alimentação, manejo, instalações, escolha de animais e sanidade, até aspectos do processamento e empacotamento do produto final. No quesito sanidade, a legislação preconiza medidas preventivas para garantir a eficácia terapêutica que deve estar baseada no uso de produtos homeopáticos e fitoterápico, restringindo o uso de antimicrobianos convencionais.

A fitoterapia, empiricamente, já tem sido administrada por produtores de leite para o controle da mastite, principalmente em pequenas propriedades rurais, onde o acesso a produtos alopáticos é restrito (SCHUCH, 2007). A composição química complexa dos produtos naturais é aliada no controle e tratamento da mastite, isto porque o sinergismo entre os compostos químicos pode resultar em diferentes mecanismos de ação sobre os patógenos causadores da doença, podendo-se ter maior eficácia e menor risco de resistência microbiana que os medicamentos convencionais (MUSHTAQ et al., 2018b). Todavia, a complexidade química também é fator controverso, uma vez que a alta variabilidade dos compostos em função dos fatores ambientais (principalmente sazonais) dificulta a padronização de uma formulação estável e com eficiência garantida (ALVARENGA et al., 2009).

No tratamento da mastite bovina, particularmente, o produto deve apresentar, além de atividade contra os patógenos, baixa toxicidade às células epiteliais mamárias, devido aos tratamentos intramamários que geralmente são preconizados

(LANGONI et al., 2017). Dentre a ampla variedade de produtos naturais com indicação terapêutica foram escolhidos três com reconhecidas propriedades biológicas com potencial para o controle da mastite bovina, i.e., atividade antimicrobiana: propolis, macela e babosa (HABEEB et al., 2007; SPEROTTO, 2010; WANG et al., 2016b). Foram considerados nesse estudo, o efeito da sazonalidade, a origem geográfica e o método de extração dos compostos de interesse sobre as características químicas, atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, citotóxica e de indução da apoptose em células epiteliais mamárias bovina da linhagem MAC-T.

Nas pesquisas que envolvem o estudo de novos fármacos para o controle de doenças em animais não há obrigatoriedade de estudos prévios *in vitro* antes da aplicação nos mesmos (BASSO; BRACARENSE, 2013), porém, o alto risco de efeitos tóxicos aos indivíduos testados não pode ser ignorado nos experimentos *in vivo*. O uso de modelos *in vitro* prévios para investigação de produtos para o controle da mastite bovina é um tema inovador, que tem sido proposto pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Morfofisiologia Animal (LABIMA) da Universidade Federal de Santa Catarina (FIORDALISI et al., 2016a), visando a substituição parcial do uso de animais em pesquisa.

OBJETIVO

- **GERAL**

_Avaliar *in vitro* o potencial de extratos de própolis, babosa e macela no controle da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*.

- **ESPECÍFICOS**

_Identificar o efeito da sazonalidade sobre o perfil químico de extratos de própolis e exsudato de folha de babosa;

_Identificar o efeito da origem geográfica e do método de extração sobre o perfil químico de extratos de macela.

_Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos de própolis, macela e de exsudato de folha de babosa contra a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* e isolados de leite mastítico;

_ Avaliar *in vitro* a citotoxicidade dos extratos de própolis, macela e exsudato de folha de babosa sobre células epiteliais mamárias bovina (MAC-T);

_Determinar o efeito dos extratos de própolis e macela sobre a indução de apoptose em células epiteliais mamárias bovina (MAC-T);

CAPITULO I

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Mastite bovina

A mastite continua sendo a principal doença dos rebanhos leiteiros no mundo. Perdas anuais bilionárias no mercado mundial de leite e indústria de laticínios são estimadas em decorrência dessa doença (MUSHTAQ et al., 2018a). Também de grande importância são as alterações causadas no comportamento do animal e redução no seu bem-estar (FOGSGAARD et al., 2015). Esta enfermidade se caracteriza por ser uma inflamação da glândula mamária e, embora seja uma doença plurietiológica e multifatorial, geralmente é causada por bactérias (FOX; ZADOKS; GASKINS, 2005).

Segundo BOGNI; ODIERNO; RASPANTI (2011) a ocorrência de mastite depende da interação entre o hospedeiro, o agente microbiano e fatores ambientais. O grau de inflamação depende da natureza do patógeno causal, da idade, da raça, do estado imunológico de saúde e do grau de lactação do animal. A defesa da glândula mamária envolve um complexo sistema de tecidos, células e moléculas que trabalham em conjunto contra os organismos causadores de mastite. As infecções começam quando os microrganismos penetram na parte interna do teto e multiplicam-se nos tecidos produtores de leite. Após a ordenha, o canal do teto fica susceptível a infecções devido ao esfíncter que permanece temporariamente dilatado. Deste modo, os microrganismos que usualmente estão do lado de fora da glândula, penetram no canal do teto e, com a exposição repetitiva, tem-se o estabelecimento da infecção (CUNNINGHAM; KLEIN, 2009).

No úbere, a infecção se estabelece, inicialmente, nos tecidos que circundam os ductos e as cisternas mamárias desencadeando a morte das células produtoras de leite. O aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos sinaliza à migração e recrutamento de leucócitos adicionais para a região afetada. Estas células de defesa liberam substâncias na tentativa de fagocitar e destruir os patógenos. Assim, o número de células somáticas no leite torna-se elevado (BRAMLEY et al., 2005;

SORDILLO, 2016). Caso não sejam totalmente destruídos, os microrganismos continuam a se multiplicar e colonizar os ductos menores e a região alveolar. À medida que a infecção persiste, há a obstrução dos ductos e o aprisionamento do leite, o que culmina na regressão das células secretoras dos alvéolos ao estado de repouso (não produtor). As mesmas substâncias liberadas pelos leucócitos, para a destruição do patógeno, também levam à destruição completa das estruturas alveolares, que são preenchidas por tecidos conjuntivos e cicatriciais, reduzindo a área de produção de leite (CUNNINGHAM; KLEIN, 2009).

Com base no modo de transmissão, os microrganismos causadores de mastite podem ser classificados em ambientais ou contagiosos, neste caso quando são transmitidas entre vacas infectadas. Este tipo de transmissão é de particular importância porque causam principalmente as formas subclínica da doença, que frequentemente são de difícil detecção por não apresentarem sinais clínicos. Nestes casos, a contagem de células somáticas (CCS) constitui uma ferramenta útil para avaliar a qualidade do leite e o estado de saúde da glândula mamária (ATAKISI et al., 2010).

Por outro lado, os agentes patogênicos ambientais incluem uma grande variedade de microrganismos que ocorrem no ambiente e, apesar de comumente causarem a doença em sua manifestação clínica, é improvável que uma grande proporção de vacas em um rebanho seja infectada com a mesma estirpe. Além disto, animais com mastite clínica são facilmente identificados no rebanho por apresentarem sinais macroscópicos como febre, perda de apetite, função do rúmen reduzida, fraqueza, prostração, inchaço, calor e vermelhidão no úbere, além de apresentarem alterações no aspecto do leite, tais como flocos, coágulos e uma aparência aquosa (BOGNI; ODIERNO; RASPANTI, 2011)

De acordo com ACOSTA et al. (2016) a mastite clínica é classificada de acordo com a intensidade da infecção. São atribuídos escores conforme a manifestações dos sinais da doença. Considera-se a mastite como branda quando ocorrem apenas alterações macroscópicas no aspecto leite; moderada na qual há também alterações no aspecto da glândula mamária tais como vermelhidão, edema, calor e dor; e severa quando além das

modificações no aspecto normal do leite, há um comprometimento sistêmico como febre elevada, alteração na frequência cardíaca e respiratória, ausência de movimentos ruminais e alterações externas do úbere.

Existem mais de 135 microrganismos diferentes, entre bactérias, fungos e algas, que já foram isolados de leite mastítico. Entretanto, as infecções causadas pelas bactérias gram-positivas *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. e bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli*, são as mais frequentes (WATTS, 1988).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. lideram o ranking dos agentes etiológicos causadores de mastite. São capazes de causar infecções de longa duração, com tendência a se tornarem crônicas, com baixa taxa de cura, com grande perda da produção de leite, especialmente quando causadas por *Staphylococcus aureus* (SABOUR et al., 2004). A alta virulência desta espécie se deve, principalmente, a resistência contra a morte por macrófagos, i.e., a primeira linha de defesa contra infecções, e a habilidade de aderir ao epitélio mamário. A capacidade de *S. aureus* de formar biofilmes já foi descrita como um importante fator de virulência. As multicamadas formadas por bactérias na matriz extracelular dos biofilmes as tornam resistentes aos agentes antimicrobianos e ao sistema imunitário do hospedeiro, por prejudicar a ação de células fagocíticas e também por facilitar a adesão e colonização do epitélio mamário (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; JACQUES; ARAGON; TREMBLAY, 2010). FOX; ZADOKS; GASKINS (2005) relataram que linhagens de *S. aureus* isolados da glândula mamária bovina foram mais eficazes em formar biofilme *in vitro* do que as linhagens isoladas de fontes extra-mamárias como as da pele do teto e dos revestimentos de unidades de ordenha. Além disto, esta espécie de bactéria tem por característica colonizar a célula epitelial extravasando o conteúdo celular e disseminando o patógeno dentro da glândula mamária (PETERSSON-WOLFE, MULLARKY, 2010; ANDERSON; AZIZOGLU, 2014).

O monitoramento do desempenho da saúde do úbere depende da aplicação de métodos de diagnósticos confiáveis, tais como a contagem de células somáticas, a cultura bacteriológica do leite, a medição de N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAGase), a atividade da lactato desidrogenase (LDH) ou a condutividade

elétrica (CE). O California Mastitis Test (CMT) (SCHALM; NOORLANDER, 1957) é um teste rápido e capaz de detectar a ocorrência de mastite em estágios iniciais, pelo aumento de células somáticas, principalmente polimorfonucleares (PMN). Sua metodologia consiste na mistura de uma alíquota de leite a mesma proporção de um detergente aniônico (alquil-lauril sulfato de sódio). Este é capaz de emulsificar os lipídios das membranas celulares presentes no leite. Como consequência, ocorre à liberação dos ácidos nucléicos e o DNA liberado produz uma viscosidade que caracteriza esta reação (SCHALM; NOORLANDER, 1957). Infelizmente, nem sempre tais métodos estão disponíveis, principalmente em propriedades pequenas com pouca infraestrutura. Nestes casos, o diagnóstico da mastite se dá, frequentemente, pela observação visual do úbere e do leite, quando a infecção já está estabelecida e o processo de inflamação da glândula mamária em fase avançada.

Além disto, a identificação correta dos agentes etiológicos envolvidos no processo de mastite é fundamental para o sucesso do tratamento e para o estabelecimento de estratégias eficazes de controle e profilaxia da doença (BRADLEY, 2002; FOX; ZADOKS; GASKINS, 2005; ERICSSON UNNERSTAD et al., 2009; TASSI et al., 2013).

1.2 Estratégias de controle e tratamento da mastite bovina

O controle da mastite tem como princípios básicos a redução de novas infecções intramamárias e da duração dos casos existentes (BRADLEY, 2002). Inicialmente, o controle se dá pela adoção de estratégias preventivas que incluem o diagnóstico prévio, a segregação dos animais doentes e a melhoria nas condições de higiene e protocolos terapêuticos (BUENO et al., 2003; AVANCINI; WIEST, 2008). Outra medida possível a ser adotada como prevenção ao estabelecimento da doença envolve a manipulação do mecanismo de defesa do hospedeiro. SORDILLO (2016) ressalta que o desenvolvimento de estratégias inovadoras, que podem melhorar os mecanismos de defesa da glândula mamária que estão prejudicados durante os períodos de maior susceptibilidade à doença, pode ter um impacto

importante na incidência de mastite. BRADLEY et al. (2015) sugerem que a vacinação preventiva de rebanhos leiteiros contra os agentes etiológicos da mastite pode desempenhar um papel útil nos programas de controle da doença. Apesar, de resultados controversos, a vacina estafilocócica, já foi descrita como bem-sucedida na prevenção de novas infecções por *S. aureus* em novilhas leiteiras (DELPORTE et al., 2002; LANDIN et al., 2015; ISMAIL, 2017).

Contudo, uma vez estabelecida à infecção e iniciado o processo de inflamação da glândula mamária, o tratamento da mastite bovina pode ser realizado por diferentes terapêuticas. Embora amplamente utilizadas, estas práticas são muitas vezes, aparentemente, insuficientes e ineficazes em conter a doença (GREEN et al., 2004). Dentre as várias terapêuticas relatadas, a administração de antimicrobianos é o procedimento mais usual em rebanhos leiteiros no mundo (MUKHERJEE; DASH; RAM, 2005).

Durante a lactação, o uso de antimicrobianos como tratamento da mastite é considerado pouco eficaz e oneroso, com baixa taxa de sucesso. Isto porque requer o descarte do leite por um período de tempo prolongado, conforme a carência do fármaco utilizado. Com a antibioticoterapia busca-se curar os casos de mastite clínica de maneira rápida e diminuir o desconforto do animal, reduzir as fontes de infecção de mastite contagiosa, retornar à produção leiteira normal, e evitar a morte do animal em casos de mastite aguda. Estes tratamentos, geralmente, são iniciados imediatamente após o início dos sinais, sem prévio conhecimento do agente causador, pelo uso de protocolo pré-definido e, na maioria das vezes, sem a supervisão de um profissional responsável (MUKHERJEE; DASH; RAM, 2005; SANTOS, et al., 2011). Quando o quadro de mastite clínica é considerado brando se procede com o tratamento de suporte, caracterizado pelo esgotamento da glândula mamária e observação dos animais até que os resultados microbiológicos estejam disponíveis. Para os casos mais severos da doença, onde há comprometimento sistêmico dos animais, o uso de fármacos é necessário para controlar a dor, a febre e a infecção (SEARS; MCCARTHY, 2003).

A escolha dos agentes antimicrobianos e a via de aplicação deveria ser definida pelas características da infecção, do

agente etiológico e em acordo com as questões regulamentares, em conjunto entre produtor e veterinário, o que na maioria das vezes não ocorre. No Brasil, existem no mercado 181 medicamentos com indicação ao tratamento da mastite bovina. Entretanto em 69 deles (38%), constatou-se a ausência de bula, o que é um grave problema, pois a falta de informações quanto à aplicação e cuidados com o tempo de carências pode ter graves consequências (SANTOS et al., 2011).

Muitos fatores interferem na eficiência do tratamento com antimicrobianos durante a lactação. Entre eles, merece destaque: (a) espécie de patógeno; (b) a duração da infecção: mastites crônicas tem menor chance de cura que mastites recentes; (c) características inerentes ao animal como a idade do animal; animais mais velhos têm menos chances de sucesso na terapia, bem como animais em fase final de lactação; (d) gravidade da infecção (BOGNI; ODIERNO; RASPANTI, 2011).

Portanto, em casos clínicos de mastite é recomendado o tratamento com antimicrobianos durante a lactação assim que sejam identificados os sinais no animal. Para o sucesso do tratamento, o fármaco deve atingir os locais onde se encontram a infecção no quarto mamário afetado, devendo-se manter a concentração inibitória mínima por um período mínimo necessário para eliminar o microrganismo. A via mais comum para tratamento de casos de mastite clínica em vacas leiteira é a intramamária, através da infusão de antimicrobianos de amplo espectro, em bisnagas descartáveis. Mesmo após o desaparecimento dos sinais, recomenda-se a aplicação por mais 24 h, visando a cura microbiológica e não só a cura clínica.

As recomendações são para que o tratamento com antibioticoterapia seja realizado apenas nos casos de mastite clínica ou em situações muito específicas de mastite subclínica. Isto se justifica pelas baixas taxas de curas de casos subclínicos e aos altos custos do descarte do leite com resíduos de antimicrobianos, o que na maioria das situações supera os benefícios do tratamento de casos subclínicos. Tradicionalmente, o tratamento de casos subclínicos é realizado na última ordenha do período de lactação com antimicrobianos aprovados para uso em vacas secas (HOE; RUEGG, 2005; LANGONI et al., 2017).

Além disto, em situações como estas, recomenda-se a adoção de estratégias que reduzam o alastramento da doença entre os outros animais do rebanho, tais como, a identificação precoce dos animais doentes, a ordenhas destes por último, a limpeza e desinfecção dos implementos, entre outros. Deste modo, a taxa de cura, nestes casos, é chamada espontânea. Atualmente, tem sido proposto, também, um novo protocolo para tratamento de mastite, chamado de terapia simultânea. Esta estratégia de controle destina-se a animais que, embora, apresentem casos de mastite clínica, seja feito o diagnóstico de mastite subclínica nos demais quartos e, caso se confirme a ocorrência de casos subclínicos no mesmo animal, o tratamento pode ser feito em todos os quartos infectados, clínicos e subclínicos ao mesmo tempo (LEITNER et al., 2003).

No intervalo entre lactações (período seco), o tratamento com antimicrobianos é conhecido como terapia da vaca seca (TVS) e consiste na aplicação também intramamária destes fármacos no período seco. Esta técnica é utilizada na expectativa de curar as infecções ocorridas na lactação anterior e prevenir novas infecções. Desde os anos 60, quando se iniciou sua recomendação, essa terapia passou a ser amplamente adotada (cerca de 75 a 99% dos produtores a utilizam), dependendo do País e, de fato, a incidência de mastite no próximo período de lactação é significativamente menor quando esta terapia é utilizada. As preparações convencionais para a TVS são formuladas (veículos, solventes, pH) para causar irritação mínima dos tecidos mamários, evitando danificar o tecido secretório e prevenir a sua fibrose. Geralmente é escolhido um antimicrobiano que é ativo contra organismos gram-positivos em baixas concentrações, e se forem usadas combinações, os antimicrobianos devem ter preferivelmente efeitos bactericidas. Combinações antimicrobianas de oxacilina, ampicilina, cefapirina, estreptomicina, cefalexina, eritromicina, amoxicilina e penicilina são frequentemente utilizados (BOGNI; ODIERNO; RASPANTI, 2011; LANGONI et al., 2017).

De acordo com LANGONI et al. (2017), apesar de ser uma opção para produtores convencionais, o manejo de TVS possui uma série de desvantagens, incluindo o fato de não ser totalmente eficaz, uma vez que as bactérias causadoras da mastite se alojam em locais aonde a ação dos antimicrobianos é

dificultada, além de representar um elevado custo para o produtor e por ser uma prática aplicada com restrições para produtores orgânicos de leite que devem respeitar um período de carência três vezes maior que na produção convencional e uma frequência máxima de aplicação de duas vezes durante toda a vida do animal (ZAFALON et al., 2008).

1.3 Implicações do uso de antimicrobianos no controle da mastite bovina

O uso contínuo de antibióticos no tratamento da mastite, principalmente no período de lactação representa alguns riscos à saúde humana e animal. Dentre eles, está a ameaça de resíduos de antibióticos no leite consumido, caso não sejam respeitados os períodos de carência estabelecidos (NICKERSON, 2009). O período de carência corresponde ao prazo de eliminação do produto no leite. Os fármacos possuem períodos de carência variáveis de acordo com sua via de administração e composição química. É fundamental que os produtores estejam atentos aos prazos de carência e durante este período descartem todo o leite produzido pelos animais em tratamento (VAN SCHAIK; LOTEM; SCHUKKEN, 2002).

Entretanto, a presença de resíduos antimicrobianos em amostras comerciais de leite tem sido relatada por diversos autores, que apontam esta como uma situação crítica a saúde pública, sendo que a ingestão arbitrária destes fármacos pode causar desde uma leve reação alérgica a casos mais graves como choque anafilático (NERO et al., 2007; BIACCHI; JORGE; UENO, 2008; MARIA et al., 2009; VIEIRA et al., 2012; RODRIGUES; DALL'AGNOL; BITTENCOURT, 2015; BRITO et al., 2016).

A indução da resistência microbiana pelo uso indiscriminado de subdoses de antimicrobianos e do consumo não proposital destes fármacos através do leite contaminado também se caracteriza como uma preocupação em potencial para a sociedade. SANTANA et al. (2012) alertam que o consumo de doses sub-terapêuticas de antimicrobianos pela população, por exemplo, induz à resistência crônica de microorganismos e inibe

a multiplicação da microbiota natural, interferindo também na qualidade do leite e derivados.

Dentre os agentes etiológicos da mastite bovina, *S. aureus* é apontado como um agente de alta resistência às adversidades no ambiente e resistente aos antimicrobianos (DIAZ et al., 2010), sendo a resistência um fator limitante ao tratamento. Recentemente ASLANTAŞ; DEMIR (2016) realizaram um estudo avaliando a susceptibilidade e a capacidade de formação de biofilme de cepas de *S. aureus* isolados de leite oriundos de animais diagnosticados com mastite subclínica. Cerca de metade das amostras foi resistente à penicilina, 40% à ampicilina e 30% a tetraciclina e eritromicina que são os principais fármacos utilizados no controle desta doença. Todos os isolados foram susceptíveis apenas à vancomicina e gentamicina. Mesmo assim, cerca de 70% dos isolados foram capazes de formar biofilmes. Estes resultados indicaram que *S. aureus* a partir de casos de mastite bovina foram principalmente resistentes a antibióticos β -lactâmicos e, em menor grau, a tetraciclina e eritromicina. Além disso, os mesmos autores constataram que os genes relacionados ao biofilme e à adesão, reconhecidos como um importante fator de virulência na patogênese de *S. aureus*, foram detectados a uma taxa elevada. Resultados similares foram relatados por (BOCHNIARZ et al. (2016) avaliando a resistência de *Staphylococcus chromogenes* isolados também de leite de animais com mastite subclínica.

Na China, foram também encontrados resultados alarmantes de resistência bacteriana de *S. aureus* a 22 antimicrobianos comerciais em amostras de leite. Neste estudo, 100% dos isolados foram resistentes a sulfametoxazol, 95% a penicilina e ampicilina, 70% a eritromicina e azitromicina e em menor porcentagem a outros antimicrobianos convencionais (WANG et al., 2016a). Os autores concluíram que existe uma alta incidência de *S. aureus* com variação genômica de genes de resistência, o que é assunto de grande preocupação. A resistência crescente aos antimicrobianos e seus resíduos na cadeia alimentar tem estimulado estudos por opções substitutivas aos químicos sintéticos.

FAN et al. (2016) afirmaram ser urgente a necessidade de se desenvolver agentes antibacterianos para o tratamento e profilaxia de infecções causadas por estas bactérias

multirresistentes causadoras de mastite. Estes autores sugerem uma nova abordagem no tratamento de mastite causada por *S. aureus* com o uso de bacteriófagos específicos. Os bacteriófagos agem na terminação do ciclo de crescimento da bactéria, que ao infectarem as células bacterianas produzem duas pequenas proteínas, a holina e a endolisina. A primeira cria poros na membrana plasmática da bactéria, permitindo que a segunda interaja com o peptidoglicano da parede celular hidrolisando-o, causando assim a morte celular (FISCHETTI, 2010). Entretanto, FAN et al., (2016) alertaram para vários fatores limitantes ao uso de fagos inespecíficos no tratamento da mastite, tais como a ligação de proteína de soro de leite à superfície bacteriana impedindo a ligação dos fagos.

O emprego de fitoterápicos no controle da mastite bovina, em substituição aos antimicrobianos convencionais, também têm apresentado resultados promissores. Trabalhos recentes indicam o potencial de produtos naturais como antibacterianos frente a cepas causadoras de mastite, sendo que em alguns dos casos não houve registros de resistência bacteriana (SPEROTTO, 2010; SANTANA et al., 2012; FIORDALISI et al., 2016).

No que diz respeito à mastite é importante destacar que a busca por produtos naturais deve envolver compostos com ações distintas, incluindo antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, cicatrizante e também imunestimulante. Ter um produto com essas características requer o sinergismo de uma matriz complexa, o que possivelmente só poderá ser encontrado na natureza.

1.4 Produtos Naturais e sua aplicação no controle da Mastite

Os produtos naturais constituem um tipo de terapia alternativa que tem sido explorada há séculos por várias comunidades devido às evidências das suas atividades contra um largo espectro de doenças que acometem o ser humano e também os animais. Este conhecimento foi construído empiricamente, ao longo de milênios, constituindo gradualmente os princípios da

medicina tradicional (MUKHERJEE; DASH; RAM, 2005; CUNHA, 2007; ROCHA et al., 2015).

ALLEN (2012) relata que os primeiros registros arqueológicos da utilização de plantas culturalmente importantes datam cerca de 60.000 anos, em sepultamentos humanos na região onde hoje é o Iraque (ALLEN, 2012). Em 5.000 A.C., os chineses elaboraram a primeira lista que se tem relato contendo nomes e aplicações de princípios ativos vegetais. Várias espécies importantes, tais como a *Ephedra sinica* Stapf, conhecida por sua atividade estimulante e antiasmática, encontrava-se mencionada neste documento. Apesar de seu reconhecimento como fitoterápico desde a antiguidade, esta planta só foi incorporada a farmacopeia ocidental na segunda metade do século XIX, relacionando suas propriedades terapêuticas à presença de alcaloides derivados da fenilalanina (CUNHA, 2007; BOFF et al., 2008).

Outro marco na história da fitoterapia ocorreu por volta de 1000 D.C. com a publicação de 30 tratados intitulado *Al-Tasri li-man 'ajiza 'an al-ta'li*, escrito por Abu'l-Qasim Khalaf ibn 'Abbas (Abulcassis). Nesta obra, estão descritos assuntos pertinentes à medicina, cirurgia, farmácia, matéria médica, química farmacêutica e cosmética. Além disto, relata parte da flora e fauna ibéricas e suas aplicações medicinais (ROCHA et al., 2015).

Na Idade Média, a importância das plantas na medicina ficou explícita quando a obra *Materia Medica* da comunidade judia do Cairo foi publicada por volta do século XIII. Nestes documentos, encontravam-se descritas 168 espécies vegetais, o que corresponde a 81,6% dos remédios recomendados. Os fármacos de origem inorgânica correspondiam a 10,6% do total, enquanto as de origem animal eram apenas 7,8% (ROCHA et al., 2015). De acordo com LEV (2007), esses percentuais de utilização refletem o uso ancestral da flora pelas comunidades judias, no qual 70 das 400 espécies vegetais citadas têm aplicações medicinais.

Já na Idade Moderna, através da experimentação e da observação dos resultados de novos tratamentos, entre eles os herbais, ampliaram-se os conhecimentos a cerca desta área. As plantas medicinais passaram a ser vistas como fontes curativas por suas propriedades medicinais intrínsecas, afastando-se da

conotação religiosa que a fitoterapia até então possuía (ROCHA et al., 2015; RAINARD; CUNHA; GILBERT, 2016). No Brasil, os primeiros registros de uso de plantas no tratamento de enfermidades são anteriores a chegada dos portugueses em 1500. Os indígenas que habitavam o território brasileiro usavam uma vastidão de espécies de plantas com intuito medicinal. Posteriormente, muitas delas foram sendo incorporadas a tradição dos novos habitantes. Nos séculos seguintes, a biodiversidade brasileira passou a ser amplamente empregada na Europa, gerando uma lucrativa rede comercial. Apesar de figura importante desses, os primórdios da Farmacopéia Brasileira, o reconhecimento dos fitoterápicos como recurso terapêutico ocorreu apenas em 2006, quando a partir de uma iniciativa da organização mundial da Saúde (OMS) foi instituída a PNPIC (Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares). A PNPIC foi um grande progresso para o desenvolvimento de fitoterápicos no País, uma vez que regulamenta parâmetros legais e leva em conta peculiaridades socioeconômicas culturais e científicas do processo de produção e comercialização de vários produtos naturais (ROCHA et al., 2015).

Em suma, alguns autores afirmam que a história da fitoterapia se confunde com a história da farmácia, uma vez que muitos medicamentos, até o século passado, eram formulados basicamente a partir de plantas medicinais. Esta prática, contudo, diminuiu frente ao processo de avanço da química orgânica que permitiu a síntese de novas moléculas, ocorrido nas décadas de 1940 e 1950, ressurgindo atualmente o interesse no uso de produtos naturais para o controle de diversas doenças (BRAGANÇA, 1996; FERRO et al., 2008; BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012; BERNARDI et al., 2011). YUNES; PEDROSA; FILHO (2001) atribuem este fenômeno aos avanços ocorridos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes, à impossibilidade de mimetizar toda a diversidade encontrada na natureza por síntese química e à crescente tendência da população em buscar terapias menos agressivas. A utilização de medicamentos naturais aumentou cerca de 20% desde os anos 90 nos EUA e a venda de formulações de ervas medicinais é

estimada em 4 bilhões de dólares por ano naquele país (WOODFORD, 2005).

No entanto, a preocupação quanto à eficácia e segurança dos fitoterápicos com respaldo científico é tema em discussão. HABEEB et al. (2007), consideram que embora haja riqueza na biodiversidade vegetal a ser explorada há também a escassez de pesquisas nesta área. E, segundo os autores, isto se deve ao fato de que as empresas farmacêuticas não percebem nos fitoterápicos um retorno financeiramente gratificante e que as pequenas empresas de biotecnologia, normalmente consideradas mais inovadoras, são prejudicadas por falta de recursos financeiros. Além disso, ULRICH-MERZENICH et al. (2009), afirmam que em resposta às exigências dos mercados e das indústrias, as pesquisas de novos fármacos eficazes a base de plantas tem objetivado encontrar um único composto ativo. Muitos esforços têm sido feitos recentemente para isolar e identificar moléculas que poderiam ser consideradas realmente bem-sucedidas. Entretanto, na maioria dos casos, os metabólitos secundários das plantas mostraram ter efeito em sinergismo e não isoladamente (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

As propriedades terapêuticas atribuídas aos fitoterápicos estão diretamente relacionadas à suas composições químicas. Há 400 milhões de anos, quando as plantas terrestres evoluíram, a produção de metabólitos secundários foi fundamental como meio de defesa contra herbívoros, microrganismos e plantas competidoras. No metabolismo vegetal, os compostos ou metabólitos secundários são produzidos em reações que desempenham um papel importante na interação da planta com o ambiente e estão envolvidos na adaptação das espécies a um dado ecossistema, representando uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante. Portanto, a síntese desses compostos é afetada por condições ambientais. É sabido que os conteúdos totais e proporcionais dos metabólitos secundários nas plantas podem sofrer variações temporais e espaciais em diferentes níveis (sazonais e diários; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (DARROW; BOWERS, 1997).

Os metabólitos secundários geralmente são compostos bioativos que podem interferir com alvos moleculares em animais e microrganismos. Portanto, muitas plantas e substâncias isoladas a partir delas são fontes valiosas de ativos na medicina e área farmacêutica (KUTCHAN, 2001). Algumas das classes de metabólitos secundários que exercem este papel protetor são os terpenos, os óleos essenciais, as saponinas, os alcaloides, os fenólicos, as lectinas, as lactonas, os polipéptidos e os poliacetilenos (KUTCHAN, 2001).

Os compostos fenólicos são reconhecidos por exercerem diversas atividades biológicas tais como, antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica, antioxidante, antitumoral, entre outras. Neste grupo, os compostos podem ser classificados em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Os compostos fenólicos têm recebido interesse especial, principalmente devido a correlação entre o seu conteúdo e a atividade antioxidante. Tal ação deve-se às suas propriedades redutoras, as quais estão relacionadas à sua estrutura química. Estes desempenham um papel importante na neutralização e sequestro de radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (YUNES; PEDROSA; FILHO, 2001).

O uso de fitoterápicos no tratamento de enfermidades veterinárias é tão recorrente quanto o seu uso em humanos (BISCHOFF et al., 2016). Estudos etnoveterinários revelam que estas práticas são extremamente relevantes em locais onde as pessoas são muito dependentes de plantas medicinais para tratar enfermidades em animais devido à falta de acesso a medicamentos alopáticos. Estes estudos exploram informações sobre doenças e seu controle, remédios e práticas clínicas para tratamento, prevenção e alimentação, através da troca de experiências entre a população, com o objetivo de resgatar esses saberes tradicionais estabelecendo uma conexão com o saber científico. Além disto, este conhecimento vem servir de subsídio a novas tecnologias capazes de atender as demandas de novos sistemas de produção agrícola baseados na utilização de insumos

renováveis, integrando o tradicional com o cientificamente desenvolvido (SCHUCH, 2007; JAMIL AHMED; MURTAZA, 2015).

No controle da mastite bovina, o uso de fitoterápicos por agricultores e veterinários se dá tanto para a prevenção quanto para o tratamento. Entretanto, predominam as práticas em tratamento, com a utilização de soluções ou pomadas medicinais à base de ervas para uso local ou a administração de plantas verdes ou secas via oral (SCHUCH, 2007; MUSHTAQ et al., 2016).

MUSHTAQ et al. (2016) em estudo etnoveterinário confirmaram a eficiência de extrato metanólico de *Thalictrum minus* L., erva tradicionalmente usada no controle de mastite em regiões da Ásia e Europa, sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas causadoras de mastite bovina. Resultados semelhantes foram encontrados por SPEROTTO (2010), estudando infusões de macela (*Achyrocline saturioides*), popularmente usada na América do Sul, contra bactérias *S. aureus* e *E. coli* isoladas de leite mastítico. SCHUCH (2007) também demonstrou atividade antimicrobiana de diferentes plantas, incluindo *Baccharis trimera*, *Bidens pilosa*, *Eucalyptus* sp., *Polygonum hydropiper* e *Tagetes minuta* frente a cepas de diferentes bactérias causadoras de mastite. VALERIANO et al. (2012) relataram atividade antimicrobiana de óleo essencial de *Minthostachys verticillata* e do limoneno isolado contra *Streptococcus uberis*, um importante patógeno causador de mastite bovina. Atividades biológicas *in vivo*, de produtos naturais, também já foram relatadas. PEIXOTO et al., (2016) descreveram resultados positivos no tratamento de cabras com mastite experimental após a aplicação de formulações contendo *Hymenaea martiana*, espécie conhecida popularmente como jatobá típica de biomas como o cerrado e caatinga brasileiros. Já DIARRA et al. (2013) demonstraram a ação antimicrobiana de *Vaccinium oxycoccus* (oxicoco/cranberry) por afetar a síntese de peptidoglicanos de *S. aureus*, atuando em sinergia com antimicrobianos β -lactâmicos.

Além de investigados por suas atividades antimicrobianas, alguns estudos tem demonstrado a promissora ação anti-inflamatória de produtos naturais com potencial de uso no tratamento da mastite. FU et al. (2014) registraram uma atenuação da resposta inflamatória da glândula mamária de ratas

inoculadas com LPS, após a aplicação de curcumina, substância extraída do alçafrão (*Curcuma longa*), conhecido como poderoso anti-inflamatório. WEI et al. (2015) encontraram similar inibição da resposta inflamatória em modelos *in vitro* e *in vivo*, utilizando células mamária murinas e LPS, após o tratamento com magnolol, composto extraído de *Magnolia officinalis*. WANG et al. (2016), também verificaram efeito anti-inflamatório em células mamárias bovina, após o tratamento com extratos de propolis chinesa.

Apesar de ser uma alternativa ao uso de terapêuticas convencionais no tratamento da mastite, a administração de produtos naturais de forma interna na glândula mamária bovina deve ser realizada com cautela, preferencialmente subsidiada por resultados de ensaios que garantam a sua eficácia. GALLI; LOVISON; PÍCCOLI, (2015) alertam para a crença sobre a ausência de toxicidade e de efeitos prejudiciais do emprego de fitoterápicos no tratamento de doenças. Contudo, desde que existam evidências e subsídios científicos sobre a utilização adequada, sem perda da efetividade dos princípios ativos, tem-se a diminuição dos riscos de intoxicações pelo seu uso inadequado e o sucesso do tratamento (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005). MUKHERJEE; DASH; RAM (2005), por exemplo, em um estudo para avaliar o potencial imunoterápico de extratos aquosos de *Ocimum sanctum* na recuperação de animais com mastite subclínica, apesar de encontrarem uma redução na contagem bacteriana total, perceberam também um aumento na contagem de neutrófilos, linfócitos e enzimas lisossomais no leite, indicando uma evolução no processo inflamatório. Da mesma forma PEREIRA & BOTTEON (2008), após a administração intramamária de extratos de propolis em vacas leiteiras verificaram um aumento da CCS, sugerindo o efeito pró-inflamatório local do produto e indicando que o seu uso deve ser realizado com muita cautela. Tais resultados demonstram a necessidade de estudos mais aprofundados que possam subsidiar a indicação de uso de produtos naturais no tratamento da mastite bovina.

1.5 Modelos de estudos em Mastite bovina

Em virtude da importância que esta enfermidade representa para a produção leiteira, inúmeros estudos têm se dedicado a investigar métodos de controle e prevenção. Também é notável o aumento no número de trabalhos científicos que tem como tema este assunto. Quando realizada uma busca no portal Science Direct usando como termos de indexação “bovine mastitis” observa-se que antes de 1995 havia cerca de 3700 acessos relacionados a estas palavras, já o somatório dos vinte anos seguintes contabilizou cerca de 7000 arquivos, sendo 2300 deles publicados nos últimos seis anos.

Apesar desses números, muito pouco se avançou em relação aos modelos empregados no estudo da mastite, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Atualmente alguns modelos matemáticos têm sido desenvolvidos com o objetivo de estimar perdas na produtividade, eficiência de programas de controle e processo de transmissão de patógenos (BARLOW, 2011). Utilizando cálculos baseados nas reduções proporcionais das variáveis de interesse, estes modelos são aplicados com restrições, uma vez que estes sistemas matemáticos não conseguem prever com precisão as complexas relações entre as variáveis que intermediam o quadro clínico da doença. Ainda assim, a maior parte dos modelos de estudo da mastite compreendem ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Mesmo sendo eticamente questionáveis, os modelos *in vivo* ainda são os mais utilizados em trabalhos científicos sobre a mastite bovina. Nesses casos, a mastite é induzida em animais como ratos, cabras, ovelhas ou vacas, inoculando-se os agentes patogênicos ou seus componentes (KORNALIJNSLIJPER et al., 2004; LAUZON; ZHAO; LACASSE, 2006; WEI et al., 2015). Após indução da infecção, procede-se a realização de análises tais como contagem de células somáticas, avaliação histopatológica, dosagem de citocinas, entre outros marcadores bioquímicos (LAUZON; ZHAO; LACASSE, 2006; DIARRA et al., 2013; WANG et al., 2013; WEI et al., 2015). Em algumas situações, faz-se necessário o abate do animal para a realização de algumas análises específicas ou por complicações referentes à infecção.

TUCHSCHERR et al. (2011), por exemplo, inocularam ratas lactantes com 10^5 UFC/mL de diferentes estirpes de *S.*

aureus encapsuladas com polissacarídeos gram-negativos, com o objetivo de determinar a sua maior virulência. Após doze dias de incubação, os animais foram abatidos e avaliações histopatológicas do tecido mamário foram realizadas. Uma migração massiva de células de defesa para o tecido mamário característica de uma infecção crônica e persistente foi observada. Apesar disso, os mecanismos pelos quais o aumento da migração de células de defesa em resposta a infecção por cepas *S. aureus* gram-negativamente encapsulados não foram elucidados, requerendo outras investigações. Já SANTOS et al. (2007), com o objetivo de avaliar a influência da mastite induzida experimentalmente sobre as manifestações clínicas e as características físico-químicas do leite, inocularam 10^4 UFC/mL de *S. aureus* em uma das mamas de dez ovelhas primíparas da raça Santa Inês. As observações clínicas e laboratoriais foram realizadas em intervalos de 12 horas durante os primeiros 14 dias após a inoculação do agente etiológico. Todos os animais apresentaram manifestações clínicas sistêmicas nas glândulas inoculadas, observadas com mais intensidade a partir de 24 horas após a inoculação. O tratamento foi instituído nas ovelhas 36 h após a indução. Entretanto, um animal morreu 48h após o início do experimento. A recuperação clínica ocorreu para os demais animais. No entanto, não houve o restabelecimento fisiológico das mamas inoculadas, que perderam a funcionalidade. Tais estudos revelam o grave comprometimento do bem-estar dos animais submetidos às infecções experimentais. Na literatura também são encontrados estudos sobre a reação comportamental de animais com mastite que veem demonstrando que os mesmos expressam reações similares aos animais naturalmente doentes. FOGSGAARD et al., (2015), verificaram por exemplo, que vacas leiteiras da raça Holandês com mastite induzida após inoculação de *Escherichia coli* reduziram o consumo de alimentos, apresentaram maior agitação durante a ordenha caracterizada pela maior frequência de disparos e chutes e passaram menos tempo deitadas.

Estes e muitos outros estudos utilizando animais em pesquisa científica têm sido fortemente criticados pela sociedade que anseia por métodos alternativos e substitutivos à

experimentação animal. O desenvolvimento de modelos alternativos que substituam ou reduzam o uso de animais em pesquisas e ensino é uma demanda da população (BASSO; BRACARENSE, 2013) prevista na legislação brasileira. Através da lei 11.794 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008), que regulamenta o artigo 225 da Constituição Federal, foram estabelecidas normas para o uso de animais no ensino e em pesquisas científicas. De acordo com a Constituição, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), vinculado ao Ministério da Ciência e Tecnologia, é o órgão responsável pela fiscalização a nível nacional do cumprimento destas leis. Dentre suas atribuições está o ato de zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade científica e também o monitoramento e avaliação da introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa.

Nestes casos, pode-se sugerir a realização de testes *in vitro* com células e/ou explantes da glândula mamária para avaliação dos possíveis efeitos dos produtos às células do animal. Esta medida reduz os riscos ao bem-estar animal, garantido maior segurança na recomendação de doses menos tóxicas (FIORDALISI et al., 2016).

Dos 2700 arquivos indexados com as palavras “bovine mastitis”, nos últimos seis anos, 964 possuíam também “antimicrobial” como termo de indexação, indicando o amplo emprego desta técnica para o estudo da mastite. Estas metodologias envolvem desde a identificação e prevalência dos agentes etiológicos da mastite até a avaliação da ação direta de produtos sobre a susceptibilidade dos microorganismos de interesse (FILIPPSEN et al., 2001; MEDEIROS et al., 2009; DIAZ et al., 2010). Apesar de serem amplamente aceitos no meio científico, principalmente no screening de novas substâncias para o controle da mastite, os testes antimicrobianos possuem limitações quanto à indicação de novos agentes terapêuticos para uso interno, principalmente por não prever o efeito dos mesmos sobre os tecidos da glândula mamária. Testes *in vitro* utilizando os tecidos da glândula mamária ou células epiteliais mamárias (CEM) bovina não têm sido utilizados com o objetivo de buscar novos agentes terapêuticos, mas têm sido apontados como adequados para o estudo de diferentes funções da glândula

mamária, dentre elas, a resposta inicial à infecção como ocorre na mastite (RABOT et al., 2007; WEI et al., 2015). Hoje se sabe através desses testes *in vitro* que diversos tipos celulares podem produzir citocinas e óxido nítrico (NO), incluindo as próprias células epiteliais da glândula mamária, além dos macrófagos e leucócitos residentes que migram para a glândula em resposta à infecção (STRANDBERG et al., 2006).

Dentre as linhagens de CEM conhecidas, as células MAC-T (Mammary Alveolar Cell-T) (HUYNH; ROBITAILLE; TURNER, 1991) constituem a principal linhagem epitelial mamária já estabelecida. Estas vêm sendo também utilizadas na investigação das funções da glândula mamária e também na expressão de mediadores de processos inflamatórios (BOUDJELLAB; CHAN-TANG; ZHAO, 2000; BOUTET et al., 2004; PIOTROWSKA-TOMALA et al., 2015). Contudo, de uma maneira geral, estudos com cultura de células também são questionados, uma vez que há o risco inerente de extrapolação dos resultados obtidos com cultura isolada para a complexidade de organismos vivos (BASSO; BRACARENSE, 2013). Deste modo, alguns autores tem sugerido o uso de explantes mamários (fatias de tecido alveolar) para o estudo dos mecanismos de patogenicidade e virulência de microrganismos (LEIGH; FIELD; WILLIAMS, 1990) e aspectos funcionais da glândula mamária bovina, em especial aqueles relacionados à síntese de leite e seus constituintes (BYATT; BREMEL, 1986; BAUMRUCKER;STEMBERGER, 1989; FEUERMANN et al., 2006). Mais recentemente, o uso de explantes mamários bovinos no estudo da resposta inflamatória e imunitária da glândula mamária mostrou-se adequado uma vez que os resultados encontrados foram similares aos encontrados *in vivo* (RABOT et al., 2007).

Nesse contexto, cabe destacar que ainda que existam modelos *in vitro* estabelecidos na literatura, utilizando células e explantes para o estudo da resposta inflamatória da glândula mamária, nenhum destes métodos foi empregado para avaliar a ação de novos agentes terapêuticos para o controle da mastite. Como mencionados anteriormente, em um primeiro momento são realizados testes antimicrobianos *in vitro*, seguidos dos testes *in*

vivo, sem análise preliminar dos possíveis efeitos tóxicos ou colaterais que estes produtos possam causar aos animais. Além disso, o efeito anti-inflamatório de novas substâncias não tem sido realizado, embora sugerido por alguns autores (WEI ET AL., 2014).

Propor um tratamento alternativo da mastite através do uso de produtos naturais aliado ao emprego de modelos de estudos menos agressivos e mais seguros aos animais foi um dos objetivos do presente estudo. Dentre os produtos naturais com propriedades biológicas já descritas e comprovadas pela literatura, propolis, babosa e macela foram escolhidas para serem investigadas quanto ao seu potencial no tratamento da mastite bovina.

1.6 Propolis

Propolis é um termo genérico utilizado para denominar o material resinoso e balsâmico coletado e processado pelas abelhas a partir de diversas fontes vegetais usado para vedação de suas colmeias (BANKOVA, 2005). Este produto é constituído por resinas vegetais, seguido de ceras de abelhas, óleos essenciais, açúcares e pólen. A presença do produto nas colmeias tem sido considerada como o responsável pela baixa incidência de bactérias no seu interior (KALOGEROPOULOS et al., 2009).

Esta matriz complexa tem sido utilizada há milhares de anos para os mais diversos fins. Segundo TEIXEIRA et al. (2010), desde a idade antiga os sacerdotes faziam uso da propolis no processo de mumificação de cadáveres. Nos tempos mais atuais, este produto tem despertado o interesse da indústria farmacêutica e cosmética. Dentre os produtos naturais, a propolis se destaca por possuir grande potencial de uso no tratamento da mastite em virtude de suas reconhecidas atividades biológicas, incluindo a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (SANTANA et al., 2012b; WANG et al., 2016b). No entanto, as eficiências destas atividades têm variações em decorrência de sua composição química associada principalmente a presença de compostos como flavonoides, terpenos, ácidos fenólicos e ésteres (CUSHNIE; LAMB, 2005; POPOVA et al., 2005; SANTANA et al., 2012; FIORDALISI et al., 2016).

A composição química da propolis, por sua vez, pode ser afetada por diversas características tais como a flora da região, estações do ano, fatores genéticos ligados às abelhas e a natureza dos tecidos vegetais disponíveis, como flores, ramos, brotos, exsudados e outras partes da planta. Em função desta variabilidade, a propolis pode assumir uma coloração que varia do amarelo claro ao negro (JORGE et al., 2008). PARK et al. (2000), por exemplo, ao estudarem propolis de diferentes regiões brasileiras encontraram uma predominância de resinas de cor marrom e verde. Entretanto, em alguns locais como no nordeste e norte brasileiros foram encontradas de coloração vermelha, típica de países caribenhos e de algumas localidades da Venezuela (BANKOVA et al., 1999; JORGE et al., 2008).

Em relação à atividade antimicrobiana da propolis, alguns estudos tem demonstrado que os extratos de propolis apresentam ação mais eficiente contra bactérias Gram-positivas em relação às Gram-negativas isoladas de leite mastítico (FIORDALISI et al., 2016). Esta diferença na sensibilidade pode estar associada às características da composição da parede celular entre os dois grupos de bactérias o que, por sua vez, pode influenciar na eficiência do mecanismo de ação da propolis (NAJMADEEN & KAKAMAND, 2009).

Apesar de amplamente discutido, o mecanismo de ação antimicrobiana da propolis ainda é desconhecido (DA SILVA et al., 2006). TAKAISI-KIKUNI; SCHILCHER (1994) sugerem que a propolis inibe o crescimento bacteriano por prevenir a divisão celular, resultando em formas pseudo-multicelular. Segundo os autores, seria também responsável por desorganizar o citoplasma, a membrana citoplasmática e a parede celular, causando bacterólise parcial e inibindo a síntese proteica. Portanto, o mecanismo de ação da propolis não seria similar aos descritos classicamente para antibióticos convencionais que interferem na síntese dos peptidoglicanos, os quais são responsáveis pela integridade da parede celular, ou inibem a atividade da DNA girase ou topoisomerase II enzimas essenciais à sobrevivência bacteriana (GOLDEBERG, 1965). Muito possivelmente, os diversos efeitos da propolis sobre a sobrevivência e crescimento bacteriano, devem ser decorrentes da

sua complexidade, uma vez que seus efeitos não podem ser atribuídos apenas a uma classe de metabólitos, sendo resultante do sinergismo entre flavonoides e sesquiterpenos (KEDZIA, et al., 1990; POPOVA et al., 2009). KUJUMGIEV et al., (1999), por exemplo, ao estudarem a propolis tropical, constataram que esta não continha altos teores de ácidos fenólicos e flavonoides, reconhecidos como sendo os responsáveis pela atividade antimicrobiana. Contudo, ainda assim, os extratos mostraram a atividade desejada, indicando que diferentes combinações de substâncias na propolis são essenciais para garantir sua atividade biológica. Da mesma forma, DA SILVA et al. (2006) ao investigarem a capacidade de extratos de propolis de inibir o crescimento de *S. aureus* e também à sua capacidade para sequestrar radicais DPPH (atividade antioxidante), verificaram que os teores de flavonoides tinham maior influência sobre a atividade antioxidante do que sobre a capacidade inibitória antimicrobiana.

Ainda que extratos de propolis sejam exaustivamente investigados quanto s suas propriedades antimicrobiana e também anti-inflamatória pouco se sabe sobre seus efeitos sobre as células epiteliais da glândula mamária bovina. Recentemente, (WANG et al., 2016), encontraram forte efeito protetor da propolis em células bMECs, uma linhagem de células epiteliais mamária bovina, após incubação com diferentes patógenos causadores de mastite. Os extratos de propolis demonstraram efeito positivo, reduzindo a perda de viabilidade celular, bem como a apoptose induzida por LPS e estirpes inativada de *E. coli* e *S. aureus* neste tipo celular. Segundo os autores, estes efeitos foram resultantes da modulação parcial da expressão de genes de citocinas inflamatórias e da estimulação de genes de defesa antioxidante.

Além dos estudos de atividade antimicrobiana e anti-inflamatória, a propolis tem atraído o interesse científico pelo efeito citotóxico sobre determinados tipos celulares. Esta propriedade biológica tem sido investigada visando o uso potencial da propolis como anticancerígeno, anti-angiogênico e antitumoral (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001; ORŠOLIĆ; ŠARANOVIĆ; BAŠIĆ, 2006; MONTORO et al., 2012; MENEGHELLI et al., 2013; ŽIŽIĆ et al., 2013; CALHELHA et al., 2014). No entanto, para a indicação do seu uso intramamário em casos de mastite bovina, tal efeito não é

desejado, uma vez que o mesmo não deve agredir o epitélio mamário. Deste modo, propolis que possuam efeito citotóxico sobre as células da glândula mamária não serviriam a esse propósito. Ainda que pouco estudada, a toxicidade da propolis sobre as células da glândula mamária já foi relatada. Concentrações bactericidas de propolis foram extremamente tóxicas, reduzindo a zero a viabilidade de células de explantes mamários bovinos (FIORDALISI et al., 2016). Portanto, fica evidente que é fundamental uma avaliação prévia desta propriedade *in vitro* antes que sejam propostas aplicações *in vivo* dos produtos naturais para o controle da mastite bovina.

1.7 Babosa (*Aloe barbadensis*)

As plantas do gênero *Aloe* spp. são originárias do continente africano e conhecidas na medicina popular há muito tempo por apresentarem propriedades curativas e terapêuticas (CORAN; BARTOLUCCI; BAMBAGIOTTI-ALBERTI, 2011; LUCINI et al., 2015). Este gênero compreende mais de 100 espécies de plantas semi-tropicais de floração perene (SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2017). Apesar da demanda por produtos naturais de *Aloe* spp. e sua adequação ao cultivo em regiões de terras secas, poucas espécies são utilizadas comercialmente. Na África do Sul, por exemplo, anualmente, são exportadas cerca de 600 toneladas de exsudato de folha de *Aloe* spp. coletadas quase inteiramente de populações naturais, o que gera preocupação quanto a preservação desta espécie no ecossistema local (GRACE et al., 2008). LIAO et al. (2004) afirmam que embora diferentes espécies de *Aloe* spp. sejam conhecidas, *Aloe barbadensis* Miller L. (trivialmente chamada de *A. vera*) e *Aloe arborescens* L. são as mais extensivamente cultivadas no mundo.

As folhas de babosa, parte da planta utilizada medicinalmente, podem ser divididas em duas partes principais, uma delas representada pela camada mais externa, contendo a casca (parênquima clorofiliano) e outra constituída pelas camadas mais internas que contém um líquido mucilaginoso incolor

(parênquima de reserva), muito conhecido por seu uso na medicina popular (SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2017).

Ao parênquima de reserva, têm-se dado enorme importância medicinal, principalmente por suas propriedades cicatrizantes, antineoplásica, anti-inflamatória e imunomodulatória (ESMAT; TOMASETTO; RIO, 2006a; CHOONHAKARN et al., 2008; JETTANACHEAWCHANKIT et al., 2009; SALAZAR-SÁNCHEZ et al., 2010). Esta parte da planta contém grande quantidade de carboidratos complexos, com destaque para as acemananas (RAY; GUPTA; GHOSH, 2013). Os trabalhos que investigam estas atividades terapêuticas, geralmente, usam a planta inteira ou apenas o parênquima de reserva, e poucos se destinam a estudar os efeitos exsudato de folha de babosa que embora possua uso na medicina popular, é considerado um subproduto.

O exsudato de folha de babosa contém grande quantidade de derivados de 1,8-dihidroxi-antraquinonas e seus glicosídeos (HAMMAN, 2008). Do PC de *Aloe* sp. é extraído um exsudado conhecido como "Aloe drug". Este líquido é muito conhecido por sua utilização como aditivo de preparações com efeitos catárticos (NG et al., 2017). Entre estes, as antraquinonas são os compostos majoritários que são uma mistura de dois diastereoisômeros, diferentes na configuração da fração de anglicona antraquinônica C-10, a aloína A e aloína B. Estes compostos são os principais responsáveis pelas propriedades purgantes, antimicrobiana e antineoplásica (CORAN; BARTOLUCCI; BAMBAGIOTTI-ALBERTI, 2011; PELLIZZONI et al., 2012; DUVAL et al., 2016).

Estas antraquinonas presentes nas plantas de babosa são estruturalmente análogas ao antibiótico tetraciclina e atuam como estes na inibição da síntese protéica bacteriana, através do bloqueio ribossomal (DUVAL et al., 2016). Desde modo, as bactérias não conseguem crescer nos meios que contêm o exsudato de folha de *A. vera*. Devido às evidências de atividade biológica das aloínas A e B, existem vários estudos visando quantificar esses componentes em folhas ou em produtos à base de *Aloe* spp. Dentre os métodos empregados de quantificação, os cromatográficos são os mais usados para distinção destes diastereoisômeros. Contudo, mesmo as metodologias mais refinadas, nem sempre são conclusivas. CORAN;

BARTOLUCCI; BAMBAGIOTTI-ALBERTI, (2011) testaram vários sistemas eluentes e condições cromatográficas, e apesar de estabelecerem um método com resolução satisfatória notaram uma sobreposição parcial entre os picos de aloína em algumas das amostras analisadas. Os autores consideraram, então, a aloína como um único composto quantificado através do somatório dos picos cromatográficos.

Além da aloína, muitos outros compostos são citados como constituintes do extrato do parênquima clorofiliano, incluindo aloesina, aloeresina, aloe-emodina, homonataloína, nataloemodina, aloinosídeo A e B, aloenina A e B, 7,4-hidroxi aloína e 5-hidroxi aloína (PARK; KWON; SUNG, 2009). Apesar de ser um dos principais compostos extraídos do EF de babosa, existem poucas evidências que demonstram relação entre a aloína isolada e os mecanismos de proteção celular, como defesa antioxidante ou anti-inflamatória conferidos a esta planta (ESMAT; TOMASETTO; RIO, 2006b). RAHMANI et al. (2015) acreditam que exista um sinergismo entre os vários metabólitos presentes nas folhas de babosa (parênquima de reserva e exsudato da folha) que lhe garante estas propriedades biológicas.

Em relação ao uso da babosa no tratamento da mastite bovina, poucos trabalhos na literatura relacionam as propriedades biológicas da *Aloe* spp. com o controle desta doença. Porém, alguns estudos já evidenciaram o potencial antimicrobiano do gel de babosa sobre cepas *S. aureus* resistentes a oxacilina e meticilina, que embora não tenham sido isoladas de leite mastítico, são as principais causadoras de mastite bovina (HABEEB et al., 2007). O EF, entretanto, até o presente momento, não havia sido investigado com o propósito de controle desta enfermidade.

1.8 Macela (*Achyrocline satureioides*)

A *Achyrocline satureioides* (LAM) D.C. (Compositae) é uma erva medicinal perene e aromática, nativa da América do Sul, conhecida popularmente como "marcela" ou "macela". Esta planta é comumente encontrada nos campos nativos do Brasil,

Uruguai, Paraguai e Argentina e usada em infusões, macerados, decocções e como xarope (RETTA et al., 2012).

Diversas propriedades já foram atribuídas à macela, tais como hepatoprotetora, antimicrobiana, antineoplásica e antioxidante (RETTA et al., 2012; DO CARMO et al., 2015; SALGUEIRO et al., 2016). Sua infusão é amplamente utilizada no tratamento de várias doenças digestivas, além de ser administrada como preparação anti-inflamatória, sedativa, anti-aterosclerótica e para alguns distúrbios do sistema nervoso. (RUFFA et al., 2002; ARREDONDO et al., 2004).

Todas estas atividades biológicas da macela têm sido atribuídas principalmente aos elevados teores de flavonoides encontrados nos extratos das suas inflorescências (POLYDORO et al., 2004). Dentre os flavonoides relatados em extratos de inflorescências de macela são destaques em maior quantidade a quercetina, luteolina e 3- θ -metilquercetina (POLYDORO et al., 2004; SOUZA et al., 2018).

Outras propriedades terapêuticas da macela, geralmente ligadas à proteção celular, também já foram relatadas. KADARIAN et al. (2002) demonstraram atividade hepatoprotetora da macela após indução de lesão hepática em ratos. A administração do extrato aquoso de *A. satureioides* também reduziu os níveis de TBARS nas células hepáticas lesionadas.

As funções hepatoprotetora e nefroprotetora dessa planta estão certamente associadas à propriedade antioxidante dos seus compostos, os quais agem como sequestradores de radicais livres, e, além disso, corroboram com o uso popular de infusões de suas inflorescências no tratamento de problemas relacionados ao aparelho digestivo e urinário. A presença majoritária de flavonoides em sua composição química proporciona a proteção da membrana celular, principalmente devido ao restabelecimento dos valores dos marcadores plasmáticos de lesão hepática, como a fosfatase alcalina e a lactato desidrogenase, reduzindo também o grau de esteatose e a extensão da fibrose hepática (DESMARCHELIER; COUSSIO; CICCIA, 1998; KADARIAN et al., 2002).

Além disso, existem relatos sobre a atividade antimicrobiana de extratos de *A. satureoide* sobre bactéria gram positivas e gram negativas. Os estudos demonstram que o

sinergismo entre os constituintes das amostras é responsável por esta atividade biológica e não seus compostos isoladamente (ARREDONDO et al., 2004; JORAY; PALACIOS; CARPINELLA, 2013; RITTER et al., 2017). Neste caso os metabólitos secundários da macela atuam sobre as mitocôndrias do agente etiológico, levando a um aumento em espécies reativas de oxigênio através da cadeia de transporte de elétrons, causando danos à membrana celular e ao DNA, resultando na morte do microorganismo (SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013).

O potencial antimicrobiano da macela frente a bactérias causadoras de mastite bovina foi previamente investigado por SPEROTTO (2010) e MOTA; CARVALHO; WIEST (2011). Estes autores obtiveram resultados promissores no controle bactericida/bacteriostático de extratos aquosos de macela contra cepas padrões e isolados de leite mastítico de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Diante da eficiente ação de extratos de macela sobre agentes etiológicos de mastite bovina, surge o interesse do uso interno deste produto no controle desta doença. Entretanto, embora o uso interno de infusões de macela ser considerado seguro, uma vez que esta planta não tem sido associada à toxicidade ou comprometimento da saúde humana e animal (RETTA et al., 2012), o efeito de diferentes extratos de macela sobre as células ou tecidos de glândula mamária bovina até então, ainda não foram avaliados. SABINI et al. (2013) afirmam que são fundamentais estudos de efeitos citotóxicos e genotóxicos desta espécie vegetal antes de sugerir esta como tratamento no controle de doenças e distúrbios metabólicos. Isto por que, em altas concentrações extratos de macela induziram toxicidade pelo teste do *Allium cepa* L., um bioindicador de citogenotoxicidade comumente usado para avaliação de infusões de plantas medicinais de confiabilidade comprovada e aceita através de certificado em órgãos internacionais (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SABINI et al., 2011). Entretanto, a toxicologia genética determinada através de um único teste não pode prever os efeitos genotóxicos de uma substância sobre tipos celulares diversos. Além disto, em estudo recente realizado com os flavonoides quercetina, luteolina e 3- θ -metilquercetina,

extraídos e purificados de inflorescências de macela e extrato bruto da planta, foi possível notar atividade anticancerígena destes compostos sobre linhagem celular de glioma cerebral, bem como toxicidade comparativa nas células normais do cérebro (astrócitos, neurónios e culturas hipocampais organotípicas). De acordo com os autores, os flavonoides isolados e os extratos de *A. satureioides* reduziram a proliferação, a sobrevivência e induziram a apoptose em células de glioma, além de potencializar o efeito citotóxico e indução de apoptose pela temozolomida quimioterápica (TMZ) (SOUZA et al., 2018).

Considerando o que foi exposto, o presente estudo destinou-se a investigar o potencial antimicrobiano de propolis, macela e babosa frente a *S. aureus*, visando o seu uso no controle da mastite bovina. Tais produtos naturais na literatura já são referenciados como possuidores de propriedades terapêuticas diversas. Aliado a isto se investigou a citotoxicidade dos mesmos frente a células epiteliais mamárias bovinas, a fim de se prever potenciais efeitos nocivos do uso interno na glândula.

O texto a seguir está organizado na forma de capítulos, sendo que cada um deste está dedicado à apresentação dos resultados obtidos para cada um dos produtos naturais investigados.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. C.; DA 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.

ALVARENGA, F. C. R.; GARCIA, E. D. F.; BASTOS, E. M. A. F.; GRANDI, T. S. M.; DUARTE, M. G. R. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2 A, p. 442–448, 2009.

ALLEN, G.M. et al. **50 Common native important plants in Florida's ethnobotanical history**. University of Florida. Circular 1439, p. 1-21, 2012.

ANDERSON, K. L.; AZIZOGLU, R. O. **Detection and Causes of Bovine Mastitis with Emphasis on *Staphylococcus aureus***. Elsevier Ltd., 2014. v. 2

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas Medicinais de Uso Caseiro - Conhecimento Popular e Interesse por Cultivo Comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v.6, n2. p.1-6. 2005.

ARREDONDO, M. F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MORQUIO, A.; FERREIRA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; LAFON, L.; DAJAS, F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 13–20, 2004.

ASLANTAŞ, Ö.; DEMIR, C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p.8607-8613. 2016.

ATAKISI, O.; ORAL, H.; ATAKISI, E.; MERHAN, O.; METIN PANCARCI, S.; OZCAN, A.; MARASLI, S.; POLAT, B.; COLAK, A.; KAYA, S. Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 1, p. 10–13, 2010.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Schlecht. - Guttiferae (“escadinha/sinapismo”), frente diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.10, p.90-98. 2008.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p. 29-32. 2005.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S.; MARCUCCI, M. C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, v. 70, n. 2, p. 190–193, 1999.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 561–571. 2001.

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.

BASSO, K. M.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Explantes teciduais: Um modelo redescoberto na experimentação animal. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6 SUPPL. 2, p. 3951–3958. 2013.

BAUMRUCKER, C. R.; STEMBERGER, B. H. Insulin and Insulin-Like Growth Factor-I Stimulate DNA Synthesis in Bovine Mammary Tissue *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 67, n.12, 1, p. 3503–3514. 1989.

BIACCHI, N. de C.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Detecção de resíduos antibióticos em leite bovino na região do Vale do Paraíba, São Paulo. **Revista Biociências**, v. 10, n. 1-2, p. 47-49. 2008.

BISCHOFF, J.; SPARKES, R. B.; SELVER, A. D.; SPENCER, R. G. M.; GUSTAFSSON, Ö.; SEMILETOV, I. P.; DUDAREV, O. V.; WAGNER, D.; RIVKINA, E.; VAN DONGEN, B. E.; TALBOT, H. M. Source, transport and fate of soil organic matter inferred from microbial biomarker lipids on the East Siberian Arctic Shelf. **Biogeosciences**, v. 13, n. 17, p. 4899–4914, 2016.

BOCHNIARZ, M.; ADASZEK, Ł.; DZIĘGIEL, B.; NOWACZEK, A.; WAWRON, W.; DĄBROWSKI, R.; SZCZUBIAŁ, M.; WINIARCZYK, S. Factors responsible for subclinical mastitis in cows caused by *Staphylococcus*

chromogenes and its susceptibility to antibiotics based on *bap*, *fnbA*, *eno*, *mecA*, *tetK*, and *ermA* genes. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, p. 9514-9520. 2016.

BOFF, B. D. S.; SEBEN, V. C.; PALIOSA, P. K.; AZAMBUJA, I.; SINGER, R. B.; LIMBERGER, R. P. Investigação da presença de efedrinas em *Ephedra tweediana* Fisch & C.A. Meyer e em *E. triandra* Tul. (Ephedraceae) coletadas em Porto Alegre/RS. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 394-401, 2008.

BOGNI, C.; ODIERNO, L.; RASPANTI, C. War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. **Microbial Pathogens**, p. 483-494, 2011.

BOUDJELLAB, N.; CHAN-TANG, H. S.; ZHAO, X. Bovine interleukin-1 expression by cultured mammary epithelial cells (MAC-T) and its involvement in the release of MAC-T derived interleukin-8. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 127, n. 2, p. 191-199, 2000.

BOUTET, P.; BOULANGER, D.; GILLET, L.; VANDERPLASSCHEN, A.; CLOSSET, R.; BUREAU, F.; LEKEUX, P. Delayed Neutrophil Apoptosis in Bovine Subclinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 12, p. 4104-4114, 2004.

BRADLEY, A. J. **Bovine mastitis: An evolving disease** **Veterinary Journal**, v. 164, p. 116-128, 2002.

BRADLEY, A. J.; BREEN, J. E.; PAYNE, B.; WHITE, V.; GREEN, M. J. An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1706-1720. 2015.

BRAGANÇA, A. L. R. Plantas medicinais antidiabéticas: uma

abordagem multidisciplinar. Niterói: EDUFF; 1996.

BRAMLEY, E.; LEAN, I. J.; FULKERSON, W. J.; COSTA, N. D. Clinical acidosis in a Gippsland dairy herd. **Australian Veterinary Journal**, v. 88, p. 95. 2005.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Conselho Nacional de Controle de experimentação animal. Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. 2008.

BRITO, U. M. B.; DE SOUZA, L. M.; LEITE, P. A. G.; RIBEIRO, A. R. da P. Detecção de resíduos de antibióticos no leite UAT e pasteurizado comercializado no município de Itabuna-Bahia. **Veterinária e Zootecnia**, v. 23, n.1, p. 123-130. 2016.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. de M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2675–2685, 2012.

BUENO, V. F. F.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; ANDREA, R. R.; SILVA, A. B.; COSTA, E. O.; COELHO, K. O.; D V, C. Etiologia e suscetibilidade a antimicrobianos dos agentes da mastite bovina isolados na região de Pirassununga-SP-BRASIL. **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, n. 1, p. 33-44, 2003.

BYATT, J. C.; R. D. BREMEL. Lactogenic effect of bovine placental lactogen on pregnant rabbit but not pregnant heifer mammary gland explants. **Journal of Dairy Science**, p. 2066-2069, 1986.

CALHELHA, R. C.; FALCÃO, S.; QUEIROZ, M. J. R. P.; VILAS-BOAS, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Cytotoxicity of portuguese propolis: The proximity of the *in vitro* doses for tumor

and normal cell lines. **BioMed Research International**, v. 1, 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/897361>.

CHOONHAKARN, C.; BUSARACOME, P.; SRIPANIDKULCHAI, B.; SARAKARN, P. The efficacy of aloe vera gel in the treatment of oral lichen planus: a randomized controlled trial. **The British journal of dermatology**, v. 158, n. 3, v. 573-577. 2008.

CHRISTINA PETERSSON-WOLFE, ISIS K. MULLARKY, G. M. J. Staphylococcus aureus Mastitis: Cause, Detection, and Control. **Virginia Cooperative Extension**, v. 404, n. 229, p. 7, 2010.

CORAN, S. A.; BARTOLUCCI, G.; BAMBAGIOTTI-ALBERTI, M. Selective determination of aloin in different matrices by HPTLC densitometry in fluorescence mode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 2, p. 422–425, 2011.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n.5418, p. 1318-1322. 1999.

CUNHA, A. P. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia. In: CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R.; SILVA, A. P. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

CUNNINGHAN, J.G.; KLEIN, B.G. Tratado de Fisiologia Veterinária, 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 770 p

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-56. 2005.

DA SILVA, J. F. M.; DE SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; DE ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. C Correlation analysis

between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, p. 431–435. 2006.

DARROW, K.; BOWERS, M. D. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 1, p. 1–11. 1997.

DELPORTE, C.; MUÑOZ, O.; ROJAS, J.; FERRÁNDIZ, M.; PAYÁ, M.; ERAZO, S.; NEGRETE, R.; MALDONADO, S.; SAN FELICIANO, A.; BACKHOUSE, N. Pharmacotoxicological study of *Kageneckia oblonga*, Rosaceae. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 57, n. 1–2, p. 100–108. 2002.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (“marcela”). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 9, p. 1163-1170. 1998.

DIARRA, M. S.; BLOCK, G.; REMPEL, H.; OOMAH, B. D.; HARRISON, J.; MCCALLUM, J.; BOULANGER, S.; BROUILLETTE, É.; GATTUSO, M.; MALOUIN, F. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of cranberry press cake extracts alone or in combination with β -lactams against *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n.1, p. 90-114. 2013.

DIAZ, M. a. N.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, D. M.; RIBON, A. D. O. B.; AGUILAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 724–728, nov. 2010.

DO CARMO, G. M.; BALDISSERA, M. D.; VAUCHER, R. A.; RECH, V. C.; OLIVEIRA, C. B.; SAGRILLO, M. R.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ALVES, M. P.;

FRANÇA, R. T.; LOPES, S. T. A.; SCHWERTZ, C. I.; MENDES, R. E.; MONTEIRO, S. G.; DA SILVA, A. S. Effect of the treatment with *Achyrocline satureioides* (free and nanocapsules essential oil) and diminazene aceturate on hematological and biochemical parameters in rats infected by *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v. 149, p. 39–46, 2015.

DUVAL, J.; PECHER, V.; POUJOL, M.; LESELLIER, E. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 812–833, 2016.

ERICSSON UNNERSTAD, H.; LINDBERG, A.; PERSSON WALLER, K.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-ÖST, M.; BENGTSSON, B. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. **Veterinary Microbiology**, vol. 137, n. 1–2, p. 90–97. 2009.

ESMAT, A. Y.; TOMASETTO, C.; RIO, M.-C. Cytotoxicity of a natural anthraquinone (Aloin) against human breast cancer cell lines with and without ErbB-2: Topoisomerase II-alpha coamplification. **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, n. 1, p. 97–103, 2006.

FAN, J.; ZENG, Z.; MAI, K.; YANG, Y.; FENG, J.; BAI, Y.; SUN, B.; XIE, Q.; TONG, Y.; MA, J. Preliminary treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, with trx-SA1, recombinant endolysin of *S. aureus* bacteriophage IME-SA1. **Veterinary Microbiology**, vol. 191, p. 65–71, 2016.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 502p

FILIPPSEN, L. F.; LEITE, D. M. G.; SILVA, A. da; VARGAS, G. A. Prevalência de doenças infecciosas em rebanho de suínos criados ao ar livre na região sudoeste do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 299–302, 2001.

FIORDALISI, S. A. L.; HONORATO, L. A.; LOIKO, M. R.; AVANCINI, C. A. M.; VELEIRINHO, M. B. R.; FILHO, L. C. P. M.; KUHNEN, S. The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 3, p. 2308–18, 2016.

FISCHETTI, V. A. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, vol. 300, n. 6, p. 357-362, 2010.

FOGSGAARD, K. K.; LØVENDAHL, P.; BENNEDSGAARD, T. W.; ØSTERGAARD, S. Changes in milk yield, lactate dehydrogenase, milking frequency, and interquarter yield ratio persist for up to 8 weeks after antibiotic treatment of mastitis. **Journal of Dairy Science**, vol. 98, n. 11, p. 7686-7698. 2015.

FOX, L. K.; ZADOKS, R. N.; GASKINS, C. T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Veterinary Microbiology**, v. 107, n. 3-4, p.295-299. 2005.

FU, Y.; GAO, R.; CAO, Y.; GUO, M.; WEI, Z.; ZHOU, E.; LI, Y.; YAO, M.; YANG, Z.; ZHANG, N. Curcumin attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 54–58, 2014.

GALLI, K. B.; LOVISON, R.; PÍCCOLI, S. Promoção da saúde em comunidades rurais do oeste catarinense através do uso de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Surgery & Clinical Research**, 2015.

GRACE, O. M.; SIMMONDS, M. S. J.; SMITH, G. F.; VAN WYK, A. E. Therapeutic uses of *Aloe* L. (Asphodelaceae) in southern Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 604–614, 2008.

GREEN, M. J.; BURTON, P. R.; GREEN, L. E.; SCHUKKEN, Y. H.; BRADLEY, A. J.; PEELER, E. J.; MEDLEY, G. F. The use of Markov chain Monte Carlo for analysis of correlated binary data: Patterns of somatic cells in milk and the risk of clinical mastitis in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 64, n. 2-4, p. 157-174. 2004.

HABEEB, F.; SHAKIR, E.; BRADBURY, F.; CAMERON, P.; TARAVATI, M. R.; DRUMMOND, A. J.; GRAY, A. I.; FERRO, V. A. Screening methods used to determine the antimicrobial properties of *Aloe vera* inner gel. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 315–320, 2007.

HAMMAN, J. H. Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1599–1616, 2008.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639–652, 2008.

HOE, F. G. H.; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n.9, 1461-1468. 2005.

HUYNH, H. T.; ROBITAILLE, G.; TURNER, J. D. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): An *in vitro* model for bovine lactation. **Experimental Cell Research**, v. 197, n. 2, p. 191–199, 1991.

ISMAIL, Z. B. Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. **Veterinary World**, 10, v.9, 1057-1062. 2017.

JACQUES, M.; ARAGON, V.; TREMBLAY, Y. D. N. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance.

Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases, v. 11, n. 2, 97-121. 2010.

JAMIL AHMED, M.; MURTAZA, G. A study of medicinal plants used as ethnoveterinary: Harnessing potential phytotherapy in Bheri, District Muzaffarabad (Pakistan). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 159, p. 209–214, 2015.

JETTANACHEAWCHANKIT, S.; SASITHANASATE, S.; SANGVANICH, P.; BANLUNARA, W.; THUNYAKITPISAL, P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. **Journal of pharmacological sciences**, v. 109, n. 4, p.525-531. 2009.

JORAY, M. B.; PALACIOS, S. M.; CARPINELLA, M. C. Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity. **Phytomedicine**, v. 20, n. 3–4, p. 258–261, 2013.

JORGE, R.; FURTADO, N. A. J. C.; SOUSA, J. P. B.; DA SILVA FILHO, A. A.; GREGÓRIO JUNIOR, L. E.; MARTINS, C. H. G.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. Brazilian propolis: Seasonal variation of the prenylated p-coumaric acids and antimicrobial activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 12, p. 889–893, 2008.

KADARIAN, C.; BROUSSALIS, A. M.; MIÑO, J.; LOPEZ, P.; GORZALCZANY, S.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam) D. C. **Pharmacological Research**, v. 45, n. 1, p. 57-61. 2002.

KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 452–461, 2009.

KORNALIJNSLIJPER, J. E.; DAEMEN, A. J. J. M.; VAN WERVEN, T.; NIEWOLD, T. A.; RUTTEN, V. P. M. G.;

NOORDHUIZEN-STASSEN, E. N. Bacterial growth during the early phase of infection determines the severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 177–186, 2004.

KOSHIOKA (NÉE NISHIMURA), M.; KOSHIOKA, M.; TAKINO, Y.; SUZUKI, M. Studies on the evaluation of *Aloe arborescens* Mill. Var. *Natalensis* berger and aloe extract (JP IX). **Pharmaceutical Biology**, v. 20, n. 2, p. 53–59, 1982.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235–240, 1999.

KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher . The Paradigm of Secondary Metabolism chemicals of diverse structure players in the interaction between signal compounds involved in and evolved role in the life cycle. **Society**, v. 125, n. January, p. 58–60, 2001.

LANDIN, H.; MÖRK, M. J.; LARSSON, M.; WALLER, K. P. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds. **Acta Veterinaria Scandinavica**, p. 57: 81. 2015.

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

LAUZON, K.; ZHAO, X.; LACASSE, P. Deferoxamine reduces tissue damage during endotoxin-induced mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3846–3857, 2006.

LEIGH, J. A.; FIELD, T. R.; WILLIAMS, M. R. Two strains of

Streptococcus uberis, of differing ability to cause clinical mastitis, differ in their ability to resist some host defence factors. **Research in Veterinary Science**, v. 49, n. 1, p. 85-87. 1990.

LEITNER, G.; LUBASHEVSKY, E.; GLICKMAN, A.; WINKLER, M.; SARAN, A.; TRAININ, Z. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows: I. Challenge trials. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2003.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application Mutation Research. **Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p.71-81. 2009.

LEV, E. Drugs held and sold by pharmacists of the Jewish community of medieval (11-14th centuries) Cairo according to lists of materia medica found at the Taylor-Schechter Genizah collection, Cambridge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 275–293, 2007.

LIAO, Z.; CHEN, M.; TAN, F.; SUN, X.; TANG, K. Micropropagation of endangered Chinese aloe. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 318, p. 179-185. 2004.

LUCINI, L.; PELLIZZONI, M.; PELLEGRINO, R.; MOLINARI, G. Pietro; COLLA, G. Phytochemical constituents and *in vitro* radical scavenging activity of different *Aloe* species. **Food Chemistry**, v. 170, p. 501–507, 2015.

MORAIS, C. M. Q. J.; DURAES, T. S.; NOBREGA, A. W.; JACOB, S. C. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* v.30, n.1, p.33-35. 2010.

MEDEIROS, E. S. De; VEIGA, M.; WILTON, J.; JÚNIOR, P.; FARIA, E. B. De; WANDERLEY, G. G.; ALMEIDA, A.; APARECIDO, R.; S, A. M. E.; SANTOS, M. V; W, P. J. J.; FARIA, E. B.; WANDERLEY, G. G. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-

dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp . isoladas de mastite bovina 1. v. 29, n. 1, p. 71–75, 2009.

MENEGHELLI, C.; JOAQUIM, L. S. D.; FÉLIX, G. L. Q.; SOMENSI, A.; TOMAZZOLI, M.; DA SILVA, D. A.; BERTI, F. V.; VELEIRINHO, M. B. R.; RECOUVREUX, D. de O. S.; DE MATTOS ZERI, A. C.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: An *in vitro* and *in vivo* study. **Microvascular Research**, v. 8, p. 1-11. 2013.

MONTORO, A.; SORIANO, J. M.; BARQUINERO, J. F.; ALMONACID, M.; MONTORO, A.; VERDÚ, G.; SAHUQUILLO, V.; VILLAESCUSA, J. I.; SEBASTIÀ, N. Assessment *in vitro* of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 216-221. 2012.

MOTA, F. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. C. Atividade antibacteriana *in vitro* de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae (“macela”, “marcela”) sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 298–304, 2011.

MUKHERJEE, R.; DASH, P. K.; RAM, G. C. Immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* (L) in bovine subclinical mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 79, n. 1, p. 37–43, 2005.

MUSHTAQ, S.; AGA, M. A.; QAZI, P. H.; ALI, M. N.; SHAH, A. M.; LONE, S. A.; SHAH, A.; HUSSAIN, A.; RASOOL, F.; DAR, H.; SHAH, Z. H.; LONE, S. H. Isolation, characterization and HPLC quantification of compounds from *Aquilegia fragrans* Benth: Their *in vitro* antibacterial activities against bovine mastitis pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 9–12, 2016.

MUSHTAQ, S.; SHAH, A. M.; SHAH, A.; LONE, S. A.;

HUSSAIN, A.; HASSAN, Q. P.; ALI, M. N. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, n. 2017, p. 357–361, 2018.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R. de; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. de M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 391–393, 2007.

NG, Y. C.; KIM, Y. W.; RYU, S.; LEE, A.; LEE, J. S.; SONG, M. J. Suppression of norovirus by natural phytochemicals from *Aloe vera* and *Eriobotryae Folium*. **Food Control**, v. 73B, n. 2017, p. 1362-1370. 2017.

NICKERSON, S. C. Control of heifer mastitis: Antimicrobial treatment-An overview. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, n.128-135. 2009.

ORŠOLIĆ, N.; ŠARANOVIĆ, A. B.; BAŠIĆ, I. Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. **Planta Medica**, v. 72, n. 1, p. 20–27, 2006.

PARK, Y.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. DE; MOURA, F. F. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v. 21, p. 85-90. 2000.

PARK, M.-Y.; KWON, H.-J.; SUNG, M.-K. Intestinal absorption of aloin, aloe-emodin, and aloesin; A comparative study using two *in vitro* absorption models. **Nutrition Research and Practice**, v. 3, n. 1, p. 9–14. 2009.

PEREIRA, L.S.; BOTTEON, R.C.C.M.; Efeito da aplicação intramamária de própolis sobre a composição do leite e a contagem de células somáticas. **35º Conbravet – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. In: Anais. 19-22 de outubro de 2008. Gramado-RS.

PEIXOTO, R. D. E. M.; ERASMO, W.; SILVA, L. E.;

GUEDES, J. R. Antibacterial potential of native plants from the caatinga biome against *Staphylococcus* spp. isolates from small ruminants. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 3, p. 758–763. 2016.

PELLIZZONI, M.; RUZICKOVA, G.; KALHOTKA, L.; LUCINI, L. Antimicrobial activity of different *Aloe barbadensis* Mill. and *Aloe arborescens* Mill. leaf fractions. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n.10, p. 1975-1981. 2012.

PIOTROWSKA-TOMALA, K. K.; BAH, M. M.; JANKOWSKA, K.; LUKASIK, K.; WARMOWSKI, P.; GALVAO, A. M.; SKARZYNSKI, D. J. Lipopolysaccharides, cytokines, and nitric oxide affect secretion of prostaglandins and leukotrienes by bovine mammary gland during experimentally induced mastitis *in vivo* and *in vitro*. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 52, p. 90–99, 2015.

POLYDORO, M.; DE SOUZA, K. C. B.; ANDRADES, M. E.; DA SILVA, E. G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DALPIZZOL, F.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sciences**, v. 74, n. 23, p. 2815–2826, 2004.

POPOVA, M. P.; CHINOU, I. B.; MAREKOV, I. N.; BANKOVA, V. S. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. **Phytochemistry**, v. 70, n.10, p.1262-71. 2009.

POPOVA, M.; SILICI, S.; KAFTANOGLU, O.; BANKOVA, V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. **Phytomedicine**, v. 12, n. 3, p. 221–228, 2005.

RABOT, A.; WELLNITZ, O.; MEYER, H. H. D.; BRUCKMAIER, R. M. Use and relevance of a bovine mammary gland explant model to study infection responses in bovine mammary tissue. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 1, p. 93–99, 2007.

RAHMANI, A.; ALDEBASI, Y.; SRIKAR, S.; KHAN, A.; ALY, S. *Aloe vera*: Potential candidate in health management via modulation of biological activities. **Pharmacognosy Reviews**, v. 9, n. 18, p.120-126. 2015.

RAINARD, P.; CUNHA, P.; GILBERT, F. B. Innate and adaptive immunity synergize to trigger inflammation in the mammary gland. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–15, 2016.

RAY, A.; GUPTA, S. D.; GHOSH, S. Evaluation of anti-oxidative activity and UV absorption potential of the extracts of *Aloe vera* L. gel from different growth periods of plants. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 712-719. 2013.

RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S. A.; BANDONI, A. L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 38, n. 1, p. 27–38, 2012.

RITTER, C. S.; BALDISSERA, M. D.; GRANDO, T. H.; SOUZA, C. F.; SAGRILLO, M. R.; DA SILVA, A. P. T.; MORESCO, R. N.; GUARDA, N. S.; DA SILVA, A. S.; STEFANI, L. M.; MONTEIRO, S. G. *Achyrocline satureioides* essential oil-loaded in nanocapsules reduces cytotoxic damage in liver of rats infected by *Trypanosoma evansi*. **Microbial Pathogenesis**, v. 103, p. 149–154, 2017.

ROCHA, F. A. G. da; ARAÚJO, M. F. F. de; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. da. O Uso Terapêutico Da Flora Na História Mundial. **Holos**, v. 1, p. 49, 2015.

RODRIGUES, M. X.; DALL'AGNOL, L.; BITTENCOURT, J. V. M. Levantamento da Ocorrência de Resíduos de Antibióticos em Leite Cru Produzido na Região dos Campos Gerais, Paraná. **Journal of Health Sciences**, 2015.

RUFFA, M. J.; FERRARO, G.; WAGNER, M. L.; CALCAGNO, M. L.; CAMPOS, R. H.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular

carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 335–339. 2002.

SABINI, M. C.; CARIDDI, L. N.; ESCOBAR, F. M.; BACHETTI, R. A.; SUTIL, S. B.; CONTIGIANI, M. S.; ZANON, S. M.; SABINI, L. I. Evaluation of cytogenotoxic effects of cold aqueous extract from *Achyrocline satureioides* by *Allium cepa* L test. **Natural Product Communications**, v. 6, n.7, p. 995-998. 2011.

SABINI, M. C.; CARIDDI, L. N.; ESCOBAR, F. M.; MAÑAS, F.; COMINI, L.; REINOSO, E.; SUTIL, S. B.; ACOSTA, A. C.; NÚÑEZ MONTOYA, S.; CONTIGIANI, M. S.; ZANON, S. M.; SABINI, L. I. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 463–470, 2013.

SABOUR, P. M.; GILL, J. J.; LEPP, D.; PACAN, J. C.; AHMED, R.; DINGWELL, R.; LESLIE, K. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. **Journal of Clinical Microbiology**, 2004.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 273, n. 3, p. 442-55. 2013.

SALAZAR-SÁNCHEZ, N.; LÓPEZ-JORNET, P.; CAMACHO-ALONSO, F.; SÁNCHEZ-SILES, M. Efficacy of topical *Aloe vera* in patients with oral lichen planus: a randomized double-blind study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 10, p.735-740. 2010.

SALGUEIRO, A. C. F.; FOLMER, V.; DA ROSA, H. S.; COSTA, M. T.; BOLIGON, A. A.; PAULA, F. R.; ROOS, D. H.; PUNTEL, G. O. *In vitro* and *in silico* antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 6–14, 2016.

SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; SENDÓN, R.; SANCHES-SILVA, A. *Aloe vera*: Ancient knowledge with new frontiers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, p. 94–102, 2017.

SANTANA, H. F.; BARBOSA, A. A. T.; FERREIRA, S. O.; MANTOVANI, H. C. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 485–91, 2012.

SANTOS, L. L.; COSTA, G. M.; PEREIRA, U. P.; SILVA, M. A.; SILVA, N. Dairy cattle with clinical and subclinical mastitis caused by coagulase negative *Staphylococcus*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 1, p. 1–7, 2011

SANTOS, R. A.; MENDONÇA, C. L.; AFONSO, J. A. B.; SIMÃO, L. C. V. Aspectos clínicos e características do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 6–12, 2007.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p.199-204. 1957.

SCHUCH, L. F. D. **Plantas Medicinais em Atenção Primária Veterinária: Atividade Antimicrobiana Frente a Bactérias Relacionadas com Mastite Bovina e a Dermatofitos** . 2008. 206f. Tese (doutorado)- Universidade Federal de Pelotas - Departamento de Ciências Veterinárias, Pelotas, RS. 2008.

SEARS, P. M.; MCCARTHY, K. K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p.171-185. 2003.

SORDILLO, L. M. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4967-4982.

2016.

SOUZA, P. O. de; BIANCHI, S. E.; FIGUEIRÓ, F.; HEIMFARTH, L.; MORESCO, K. S.; GONÇALVES, R. M.; HOPPE, J. B.; KLEIN, C. P.; SALBEGO, C. G.; GELAIN, D. P.; BASSANI, V. L.; ZANOTTO FILHO, A.; MOREIRA, J. C. F. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 51 abril, p. 23–33, 2018.

SPEROTTO, V. R. **Atividade antibacteriana in vitro do decocto de *Achyrocline satureioides* (lam.) d.c. – Asteracea – (“macela”), sobre bactérias isoladas de mastite bovina.** 2010. 55f. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre- RS. 2010.

STRANDBERG, B.; AXELSEN, J. A.; PEDERSEN, M. B.; JENSEN, J.; ATTRILL, M. J. Effect of a copper gradient on plant community structure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 743-753. 2006.

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medica**, 1994.

TASSI, R.; MCNEILLY, T. N.; FITZPATRICK, J. L.; FONTAINE, M. C.; REDDICK, D.; RAMAGE, C.; LUTTON, M.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Strain-specific pathogenicity of putative host-adapted and nonadapted strains of *Streptococcus uberis* in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 8, p. 5129-5145. 2013.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P. C. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 7,

n. 3, p. 307–15, 2010.

TUCHSCHERR, L.; MEDINA, E.; HUSSAIN, M.; V??LKER, W.; HEITMANN, V.; NIEMANN, S.; HOLZINGER, D.; ROTH, J.; PROCTOR, R. A.; BECKER, K.; PETERS, G. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: An effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. **EMBO Molecular Medicine**, v. 3, n. 3, p. 129-141. 2011.

ULRICH-MERZENICH, G.; ZEITLER, H.; VETTER, H.; KRAFT, K. Synergy research: Vitamins and secondary plant components in the maintenance of the redox-homeostasis and in cell signaling. **Phytomedicine**, v. 16, n. 1, p. 2–16, 2009.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R. H.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 57–67, 2012.

VAN SCHAİK, G.; LOTEM, M.; SCHUKKEN, Y. H. Trends in Somatic Cell Counts, Bacterial Counts, and Antibiotic Residue Violations in New York State During 1999–2000. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n.4, p. 782-789. 2002.

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

VISSIO, C.; AGÜERO, D. A.; RASPANTI, C. G.; ODIERNO, L. M.; LARRIESTRA, A. J. Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 47, n. 1, p. 7-14. 2015.

WANG, J.; GUO, C.; WEI, Z.; HE, X.; KOU, J.; ZHOU, E.; YANG, Z.; FU, Y. Morin suppresses inflammatory cytokine expression by downregulation of nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated primary bovine mammary

epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 3016–3022, 2016a.

WANG, K.; JIN, X. L.; LIU, J.; HU, F. Potential of dietary propolis in protecting bovine mammary epithelial cells against mastitis pathogens using *in vitro* models. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, v. 4, n. 2016, p. 2016, 2016b.

WANG, K.; JIN, X. L.; SHEN, X. G.; SUN, L. P.; WU, L. M.; WEI, J. Q.; MARCUCCI, M. C.; HU, F. L.; LIU, J. X. Effects of Chinese Propolis in Protecting Bovine Mammary Epithelial Cells against Mastitis Pathogens-Induced Cell Damage. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016c. doi: 10.1155/2016/8028291.

WANG, X.; XIU, L.; HU, Q.; CUI, X.; LIU, B.; TAO, L.; WANG, T.; WU, J.; CHEN, Y.; CHEN, Y. Deep sequencing-based transcriptional analysis of bovine mammary epithelial cells gene expression in response to *in vitro* infection with *Staphylococcus aureus* stains. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0082117.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 41–66, 1988.

WEI, W.; DEJIE, L.; XIAOJING, S.; TIANCHENG, W.; YONGGUO, C.; ZHENGTAO, Y.; NAISHENG, Z. Magnolol Inhibits the Inflammatory Response in Mouse Mammary Epithelial Cells and a Mouse Mastitis Model. **Inflammation**, v. 38, n. 1, p. 16–26, 2015.

WOODFORD, M. Central-Bank Communication and Policy Effectiveness. **Proceedings - Economic Policy Symposium - Jackson Hole, Federal Reserve Bank of Kansas City**, p. 399–474, 2005.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no brasil. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1,

p. 147–152, 2001.

ZAFALON, L. F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLLO, C. R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n.1, p. 56-65. 2008.

ŽIŽIĆ, J. B.; VUKOVIĆ, N. L.; JADRANIN, M. B.; ANDELKOVIĆ, B. D.; TEŠEVIĆ, V. V.; KACANIOVA, M. M.; SUKDOLAK, S. B.; MARKOVIĆ, S. D. Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n.12, p.3001-3009. 2013.

CAPITULO II- Influência sazonal na propolis de Urupema: screening fitoquímico, atividade antimicrobiana e efeito sobre células epiteliais mamárias bovina.

Autores: Samira de Aquino Leite Fiordalisi¹; Luciana Aparecida Honorato²; Shirley Kuhnen¹.

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Florianópolis – Brasil.

² Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciências Biológicas, Florianópolis – Brasil.

RESUMO

Propolis, uma mistura complexa de diversas substâncias resinosas coletadas das plantas por abelhas, é comumente usada na medicina popular, incluindo na mastite bovina. Considerando estudos prévios sobre o potencial da propolis do Sul do Brasil (Município de Urupema, Santa Catarina) no tratamento da mastite, este estudo objetivou avaliar o efeito da variação sazonal da composição química sobre atividades biológicas relacionados a mastite. Além da atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, foram também avaliadas a citotoxicidade e indução de apoptose em células epiteliais mamárias bovina da linhagem MAC-T. Nas amostras de própolis, a quercetina foi o composto fenólico majoritário nas amostras coletadas no verão (72,21 µgEQ/mg), outono (47,94 µgEQ/mg) e inverno (39,11 µgEQ/mg). Nas amostras de primavera, o composto majoritário não foi identificado, tendo sido a quercetina o segundo de maior ocorrência. Foram também identificados nos extratos, de acordo com a estação de produção, luteolina, 3- θ -metilquercetina, hesperidina e os ácidos fenólicos siringico, ρ -cumárico e ferúlico. A concentração inibitória mínima (CIM) da propolis contra *S. aureus* de leite mastítico foi 140 µg/mL para as amostras de primavera, outono e inverno e 280 µg/mL para a de verão. Para as células MAC-T, o extrato de própolis da primavera foi o mais tóxico, sendo a IC50 120 µg/mL. Para as amostras de outono,

inverno e verão a IC50 foi 236, 188 e 252 µg/mL, respectivamente. Com 120 µg/mL do extrato de própolis da primavera verificou-se ainda que somente 0,77% das células MAC-T estavam em necrose e 37% em apoptose. A porcentagem de células em apoptose aumentou 12% e o de células necróticas diminuiu 0,55% com 240 µg/mL do extrato. Portanto, apesar da moderada citotoxicidade nas concentrações próximas da CIM, a indução da morte celular por apoptose pelo extrato de própolis de Urupema sugere danos possivelmente menos graves a glândula mamária bovina. Além disso, a pequena variação sazonal da composição química da propolis do Sul do Brasil e das atividades biológicas avaliadas sugerem a indicação deste como uma alternativa ao uso de antimicrobianos comerciais no controle da mastite bovina e uma opção para subsidiar a produção orgânica de leite.

Palavras-chave: mastite bovina, propolis brasileira, células MAC-T, *Staphylococcus aureus*.

1. INTRODUÇÃO

A propolis é uma mistura complexa de diversas substâncias resinosas coletadas das plantas por abelhas, que tem sido comumente usada na medicina popular, incluindo no controle da mastite bovina (KALOGEROPOULOS et al., 2009; SANTANA et al., 2012; FIORDALISI et al., 2016)

Seu efeito sobre a redução do crescimento de diversos microorganismos, incluindo *S. aureus*, um dos principais agentes etiológicos da mastite, está amplamente relatado na literatura (SANTANA et al., 2012; FIORDALISI et al., 2016). Entretanto, a própolis, como uma matriz complexa, está sujeita a flutuações sazonais em decorrência da flora local. A vegetação da qual a resina é recolhida e a época de coleta são os fatores que mais afetam sua composição química (AHN et al., 2004; POPOVA et al., 2005; JORGE et al., 2008; LOTTI et al., 2010).

Mais recentemente, foi demonstrado o efeito protetivo da própolis em células epiteliais mamárias bovina da linhagem MAC-T contra os danos causados pelos patógenos que causam mastite foi demonstrado. (ZHANG et al., 2016).

As células MAC-T (Mammary Alveolar Cells), linhagem isolada do tecido alveolar da glândula mamária bovina, têm sido

comumente utilizada no estudo das funções da glândula mamária, como regulação hormonal, e também no estudo da resposta inflamatória (HUYNH; ROBITAILLE; TURNER, 1991; BOUDJELLAB; CHAN-TANG; ZHAO, 2000; LAHOUESSA et al., 2014; PIOTROWSKA-TOMALA et al., 2015). Por ser uma linhagem imortalizada do tecido alveolar bovino, as células MAC-T pode constituir um modelo adequado na avaliação dos efeitos de novos antimicrobianos sobre as células mamárias bovinas com o propósito de controlar a mastite. A preferência pelo uso de uma linhagem celular em detrimento a cultura de tecido, em estudos *in vitro*, por exemplo, implica em uma série de vantagens tais como a uniformidade genética, o menor risco de contaminação microbiana e a possibilidade no estudo de fenômenos inacessíveis em tecidos intactos (ALBERTS et al., 1994).

Na mastite bovina, danos que provoquem a morte celular podem agravar o processo inflamatório gerado pela infecção. Na tentativa de combater a inflamação, há a formação de tecido conjuntivo no local afetado, ocasionando uma diminuição da área alveolar responsável pela síntese do leite e, por conseguinte a produção de leite. Uma vez afetada, a funcionalidade da glândula mamária, pode ficar comprometida por várias lactações. A redução na produção de leite é responsável por aproximadamente 70% dos custos totais gerados pela incidência de mastite nos rebanho (ZHAO; LACASSE, 2008).

Os danos causados à glândula mamária podem ser induzidos tanto pelo processo de necrose celular quanto por apoptose das células. Esses dois tipos de morte celular podem ser distinguidos por mudanças na morfológicas, bioquímicas e moleculares. Durante a infecção da glândula mamária, o dano ao tecido pode ser inicialmente causado pela bactéria ou seus produtos. Certas bactérias produzem toxinas que destroem as membranas celulares, enquanto outras bactérias, como *S. aureus*, são capazes de invadir e se multiplicar dentro das células epiteliais mamárias antes de causar a morte celular. Enquanto a necrose é caracterizada pela perda de integridade da membrana, liberação de conteúdo celular e reação tissular, a apoptose ocorre geralmente sem danos a membrana, com fragmentação do DNA,

formação de corpos apoptóticos e sem reação tissular (LAMKANFI; DIXIT, 2010). A indução da apoptose tem sido também sugerida como uma estratégia das células no combate a infecção do patógeno (LIU et al., 2014). Sendo assim, o estudo dos possíveis efeitos da administração intramamária de produtos antimicrobianos é desejada, pois uma possível toxicidade, em especial a ocasionada por necrose, pode contribuir para a piora do quadro clínico do animal e compromete a funcionalidade da glândula para lactações futuras (TRONCARELLI et al., 2014).

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da variação sazonal da propolis do município de Urupema (Planalto de Santa Catarina, Brasil) sobre as atividades antimicrobiana in vitro contra *S. aureus* e em células epiteliais mamárias bovina da linhagem MAC-T, i.e., citotoxicidade e indução de apoptose em células epiteliais mamárias bovina da linhagem MAC-T.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de propolis utilizadas nesse estudo foram coletadas no município de Urupema, localizado na serra catarinense (latitude 28°17'38" sul, longitude 49°55'54" oeste, à uma altitude de 1500 m acima do nível do mar), durante as estações do ano de 2014. O clima da região é temperado úmido, com chuvas bem distribuídas durante todo o ano e temperatura média anual de 13°C, sendo comum também a ocorrência de neve nos meses mais frios (MARTINS-RAMOS et al., 2011).

Após a raspagem de toda a própolis das caixas de produção de mel, a resina foi acondicionada separadamente em sacos plásticos de acordo com a caixa da qual foi coletada. Em seguida as amostras foram congeladas a -20°C e encaminhadas ao Laboratório de Bioquímica e Morfofisiologia Animal (CCA-UFSC). No laboratório, as amostras foram processadas e moídas. Foi então realizado um pool de no mínimo três caixas por estação para se realizar a extração e a preparação dos extratos brutos. Na preparação dos extratos, amostras de propolis bruta moídas foram maceradas com etanol 70% (v/v) (1:10, massa/volume) e acondicionadas ao abrigo da luz por 24 h. Posteriormente, o macerado foi filtrado a vácuo e o extrato congelado a -20°C, por 24 h. O extrato hidroalcolólico foi centrifugado (10.000 rpm, 10

min), o sobrenadante coletado e então seco em estufa de ventilação forçada à 60°C. Os resíduos foram armazenados a -20°C, ao abrigo da luz, para posterior realização das análises químicas e ensaios das atividades biológicas.

Os conteúdos de fenólicos totais nos extratos de propolis foram determinados através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI JR.; ROSSI J A JR., 1965). Os resultados foram calculados utilizando-se uma curva padrão de ácido gálico (20 a 100 µg/mL) ($y = 0,0105x / r^2 = 0,9757$) e expressos em µg de equivalentes de ácido gálico (Sigma-Aldrich) por mg de extrato (µEqAG/mg).

Os teores de flavonoides totais foram determinados através da reação colorimétrica com cloreto de alumínio, conforme metodologia descrita por POPOVA et al., (2004). Este método baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com flavonoides, acarretando em uma intensificação de sua absorção em um deslocamento para comprimentos de onda maiores (WOLLENWEBER, 1989). Os resultados foram calculados utilizando-se uma curva de calibração de quercetina (Sigma-Aldrich) (10 a 100 µg/mL) ($y = 0,0287x / r^2 = 0,9954$) e os resultados foram expressos em µg de equivalentes de quercetina por mg de extrato (µEqQE/mg).

O potencial antioxidante dos extratos de propolis foi avaliado através do teste do DPPH, conforme descrito por CHOI et al., (2002). A reação foi realizada adicionando-se à 10 µL de amostra, 290 µL da solução diluída de DPPH (Sigma-Aldrich), ajustada através do teste de reatividade para uma absorbância entre 0.50 a 0.60 à 545 nm. Após 30 minutos de incubação à 23°C, ao abrigo da luz, foi realizada a leitura em leitor de microplacas à 545 nm (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH/mg do extrato. A análise da composição fenólica dos extratos de propolis foi realizada via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Alíquotas das amostras (20 µL / 2 mg/mL) solubilizadas em EtOH:H2O (70:30, v/v), foram injetadas em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência em fase reversa (RP-HPLC), equipado com detector DAD (Ultimate 3000, ThermoScientific), acoplado com uma coluna de sílica C18

(4.6 X 250 mm; 5 μ m; 120 Å) (AcclaimTM120, Thermo Scientific[©]). Utilizou-se como fase móvel, metanol PA (A) e água MilliQ pH 2,3 (B) a um fluxo de 1 mL/minuto por 50 minutos a 30°C. A concentração inicial da fase móvel foi 85% de A e 15% de B, tendo sido alterada para 100% de B aos 40 min, e voltando a condição inicial aos 50 min. A detecção dos compostos de interesse foi feita em quatro comprimentos de onda, 240, 260, 280 e 320 nm. A identificação dos compostos fenólicos nas amostras foi feita com base na comparação dos tempos de retenção e perfis UV-Vis (260 nm) obtidos após a injeção de compostos padrões (quercetina, hespiridina, ácido ferúlico, ácido hidrocinnâmico, ácido t-cinâmico) (Sigma-Aldrich). Tais compostos foram quantificados nas amostras com o auxílio de uma curva de calibração externa de quercetina (12,5 a 100 μ g/mL) ($y = 2,0234x / R^2 = 0,9993$). Os valores foram expressos em mg de equivalentes de quercetina por mL (mgEQ/ mL).

A atividade antimicrobiana dos extratos de propolis foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo Muller Hinton (CMH/ Sigma-Aldrich), conforme descrito no Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Os ensaios foram realizados contra a cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e duas linhagens isoladas de leite mastítico.

Após a adição de diluições seriadas dos extratos de propolis (1.120 a 70 μ g/mL) em EtOH:H₂O (8:92, v/v), 10 μ L da suspensão do inóculo, equivalente a uma diluição logarítmica de 10⁵ UFC/mL foi acrescentada. Após 24 h de incubação à 37°C, procedeu-se com a determinação visual da Concentração Inibitória Mínima (CIM), pelo aparecimento de turbidez. Adicionalmente foi realizada a leitura das microplacas em espectrofotômetro (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc) à 600 nm e calculada a porcentagem de inibição do crescimento microbiano como sendo igual a $[1 - (Ac/A0)] \times 100$ (BONIFÁCIO, 2014). Nesta fórmula o termo “Ac” refere-se média das absorbâncias dos tratamentos com inóculo subtraída da média das réplicas com tratamentos sem inóculo, enquanto o termo “A0” corresponde a média das absorbâncias dos poços com CMH com inóculo. O valor obtido representa, portanto, a porcentagem de células microbianas que cada concentração de propolis testada foi capaz de inibir. Os experimentos antimicrobianos foram realizados em triplicata.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com células da linhagem MAC-T, cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/GIBCO), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB/ GIBCO), 4 mM de L-glutamina (Synth), 4,5 g/L de glicose (Sigma Aldrich), 1 mM piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (Vetec), 5 µg/mL de insulina (Himulin® Lilly) e 1 µg/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich). A citotoxicidade foi avaliada acrescentando-se diferentes concentrações dos extratos de propolis (8,75 a 560 µg/mL em DMSO 0,5%) ao meio de cultura contendo as células aderentes. Após 24 h de incubação à 37° C, o MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil; 0,5 mg/mL) foi adicionado, seguido de mais 2 h de incubação (MOSMANN, 1983). A quantidade de formazan formada foi medida por espectrofotometria à 546 nm (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc) e considerada diretamente proporcional ao número de células viáveis. O controle (i.e., meio fresco sem o extrato) foi considerado como 100% de células viáveis.

As células MAC-T foram avaliadas quanto a presença de necrose e apoptose, após o tratamento com diferentes concentrações de propolis de primavera (60, 120 e 240 µg/mL). O ensaio foi realizado marcando-se as células MAC-T com anexina V-FITC e PI e analisando-as para apoptose e necrose por citometria de fluxo de acordo com o protocolo do fabricante (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). As células permaneceram incubadas com diferentes concentrações do extrato de propolis por 24 h. Após este período, procedeu-se com a tripsinização e marcação com anexina V e iodeto de propídio (PI). Células apoptóticas foram identificadas usando um citômetro fluxo BD FACSCalibur e contadas nos quadrantes superior e inferior direito, somando-se as porcentagens de células apoptóticas precoces (anexina V positiva) e tardias (anexina V- e PI-positivas). As células normais foram contadas no quadrante inferior esquerdo (anexina V- e PI- negativas) e as células necróticas contadas no quadrante superior esquerdo (PI positivas).

Os dados foram expressos como média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. Para os conteúdos de fenólicos

e flavonoides totais, porcentagem de inibição de radicais DPPH, conteúdo dos compostos identificados por cromatografia líquida, bem como a porcentagem de viabilidade celular e de indução da apoptose celular foi realizada a análise de variância, ajustada para Tukey com auxílio do software GraphPrism 5.0. Para a porcentagem de inibição microbiana foi usado o modelo MIXED no software SAS. Os efeitos foram considerados estatisticamente significativos para valores de $P < 0,05$. As concentrações inibitórias capazes de reduzir a viabilidade celular em 50% (IC50) foram calculadas a partir de uma regressão não linear dos dados obtidos no ensaio de citotoxicidade celular.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os maiores conteúdos de fenólicos totais foram encontrados nos extratos de propolis de outono foram encontrados os maiores conteúdos de fenólicos totais e os menores nos de inverno (Tabela 1). Nos extratos de outono, foram também encontrados, nos extratos de outono os maiores conteúdos de flavonoides totais assim como nos de verão. Estas mesmas amostras mostraram-se mais eficientes quanto à inibição de radicais DPPH e, portanto, maior atividade antioxidante comparada as do verão e primavera.

Tabela 1. Variação sazonal dos conteúdos* de fenólicos totais (μg de EAG/mg), flavonoides totais (μg QE/mg) e atividade antioxidante (% de inibição de radicais DPPH) dos extratos de propolis de Urupema.

	Fenólicos Totais (μg EAG/mg)	Flavonoides Totais (μg QE/ mg)	% de inibição de radicais DPPH
Primavera	228,3 \pm 18,40 ^b	12,45 \pm 0,82 ^{bc}	46,86 \pm 1,72 ^{ab}
Verão	251,6 \pm 59,80 ^b	14,1 \pm 2,43 ^{ab}	54,31 \pm 12,64 ^{ab}
Outono	314,7 \pm 9,20 ^a	16,54 \pm 1,11 ^a	63,61 \pm 4,42 ^a
Inverno	143,7 \pm 8,60 ^c	10,21 \pm 0,63 ^c	45,72 \pm 5,96 ^b

* Os valores representam a média de três extrações independentes \pm o desvio padrão (DP) da média. Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as amostras de própolis ($P < 0.05$).

Os conteúdos de fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante encontrados no presente estudo são similares aos descritos na literatura para extratos etanólicos de própolis de diferentes origens geográficas (MACHADO et al., 2016a, 2016b; OSÉS et al., 2016). Além disso, em estudo prévio com a própolis de Urupema FIORDALISI et al., (2016) encontraram em amostras do inverno de 2011 conteúdos dos mesmos metabólitos secundários muito similares aos do presente estudo, podendo-se sugerir certa padronização dos extratos, independente do ano de produção. Já o efeito das estações do ano parece ser mais proeminente sobre o conteúdo daqueles compostos na própolis do Sul do Brasil (Tabela 1). Similarmente ZEGGIO (2016) ao avaliar o efeito da sazonalidade sobre a composição química da própolis de Santa Catarina também encontrou uma variação na composição fenólica e atividade antioxidante em função da época de coleta. Este autor também encontrou maiores conteúdos de fenólicos totais nos extratos de própolis outonal de Urupema. Por outro lado, os maiores conteúdos de flavonoides totais foram encontrados nas amostras produzidas no inverno e a atividade antioxidante nas amostras de primavera (88,77 % de inibição de radicais DPPH).

Evidências do efeito da sazonalidade sobre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante de própolis já estão bem documentadas na literatura. (EL-GUENDOZ et al., 2018), por exemplo, comparando extratos de própolis de diferentes municípios brasileiros das regiões sudeste e nordeste do Brasil, encontraram grande variação entre os conteúdos de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante em função do local de produção e época do ano. Os autores encontraram atividade antioxidante variando de 12,5 a 51% de inibição de radicais DPPH, resultado que pode ser atribuído, principalmente, à estação em que as amostras foram coletadas e a origem geográfica, o que por sua vez, tem relação

direta com a flora disponível para produção da resina. No presente estudo, na região de Urupema, predomina a Floresta Ombrófila Mista, com espécies de coníferas como a *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze em associação a outras espécies, em diferentes estágios sucessionais (LEITE; KLEIN, 1990). Esse tipo de vegetação apresenta estrutura variada, com agrupamentos densos de espécies de família Lauraceae e Myrtaceae, Anacardiaceae, Salicaceae, Sapindaceae, Asteraceae e Symplocaceae (MARTINS-RAMOS et al., 2011). Esta variabilidade de fontes vegetais para a produção de propolis deve estar associada às variações nos conteúdos de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante das amostras sazonais estudadas.

Foram identificados 7 compostos fenólicos nas amostras sazonais de propolis de Urupema (Tabela 2). Tais compostos são comumente encontrados em amostras de propolis de diferentes origens tais como turca, chinesa, grega e brasileira (KUJUMGIEV et al., 1999; POPOVA et al., 2005; SILICI; KUTLUCA, 2005; ZHOU et al., 2008; DA SILVA FROZZA et al., 2013a).

Tabela 2. Conteúdo* dos principais compostos fenólicos nos extratos sazonais da propolis de Urupema (SC, Brasil).

	TR min	Primave ra $\mu\text{gEQ}/\text{m}$	Verão ($\mu\text{gEQ}/\text{m}$ g)	Outono ($\mu\text{gEQ}/\text{m}$ g)	Inverno ($\mu\text{gEQ}/\text{m}$ g)
Ácido siríngico	17,8 1	1,5 \pm 0,3 C	4,8 \pm 0,2 A	4,4 \pm 0,6 A	3,6 \pm 0,1 B
Ácido p-cumárico	19,6 4	N.D.	3,2 \pm 0,2 A	2,3 \pm 0,7 A	N.D.
Ácido ferúlico	21,2 3	1,9 \pm 0,2 B	4,7 \pm 0,2 A	5,5 \pm 0,8 A	5,1 \pm 1,7 A
Hesperidina	22,9 1	1,9 \pm 1,4 B	2,5 \pm 0,1 AB	3,2 \pm 0,6 A	2,7 \pm 0,1 AB
N.I.*	26,2 3	34,6 \pm 1,5 A	N.D.	N.D.	2,1 \pm 0,2 B
Quercetina	26,7 1	6,4 \pm 1,1 D	72,2 \pm 3,1 A	47,9 \pm 0,9 B	39,1 \pm 0,0 C
Luteolina	27,7 9	3,4 \pm 0,7 C	8,9 \pm 0,3 A	6,8 \pm 1,9 B	5,4 \pm 0,2 B
3-o-metilquercetina	28,4 2	1,3 \pm 0,5 B	1,5 \pm 0,0 B	1,8 \pm 0,2 B	3,8 \pm 0,1 A
Total		50,9	97,7	72,6	61,8

* Os valores representam a média de três repetições \pm DP. Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas entre os extratos das diferentes estações do ano ($p < 0,05$). N.I.* = composto não identificado. N.D.= Não Detectado

No presente estudo, as amostras mostraram perfil fenólico similar (Tabela 2). Com exceção da propolis de primavera, o flavonoide quercetina foi o composto majoritário em todas elas.

O composto quercetina já havia sido previamente identificado como composto majoritário na propolis outonal coletada de um município vizinho a Urupema (São Joaquim, SC, Brazil) (MENEGHELLI et al., 2013). No extrato primaveril, o composto majoritário não foi identificado com o emprego da CLAE. Tal composto, ausente nas amostras de verão e outono, apareceu como minoritário no extrato de inverno (Tabela 2). Possivelmente este composto químico começou a ser produzido no inverno, com ápice na primavera, estando associado com a coleta de material vegetal típico dessas estações. Naquela região, a espécie *Araucaria angustifolia* está justamente em fase de polinização entre os meses de agosto e outubro, que são os meses do final do inverno e ápice da primavera. Neste período, os cones de pólen (flor masculina) estão maduros e dispõem de uma gota receptora, resinosa e pegajosa, que aparece na superfície dos estróbilos, principalmente, nas reentrâncias das brácteas (SOARES; MOTA, 2004).

A associação do perfil químico dos extratos de propolis à resina incolor proveniente de *Araucaria angustifolia* foi encontrada por ZEGGIO (2016). Desse modo, pode-se sugerir que o composto em questão deve ser resultado da coleta de material vegetal desta planta, o qual ainda não foi identificado.

Todos os extratos causaram inibição de pelo menos 90% do crescimento de microbiano na concentração de 280 µg/mL (Tabela 3). Dentre as amostras estudadas, a de primavera foi a mais eficiente, inibindo 100% o crescimento de *S. aureus*. A CIM foi confirmada através da análise de presença ou não de turbidez. Para os extratos de verão, outono e inverno a CIM foi 280 µg/mL e para o de primavera 140 µg/mL (Tabela 3). Relacionando a atividade antimicrobiana com a composição química das amostras verificamos que no extrato de primavera houve justamente a presença majoritária do composto não identificado, enquanto nos outros extratos era a quercetina.

Tabela 3. Percentual* de inibição (%) do crescimento microbiano de *S. aureus* após exposição aos extratos sazonais de propolis de Urupema (SC, Brasil).

Concentração de Propolis (µg/mL)	Primavera	Verão	Outono	Inverno
70	57,6 ± 7,4 _{Aa}	59,8 ± 7,4 ^{Aa}	73,2 ± 7,4 ^{Aa}	58,1 ± 7,4 _{Aa}
140	80,9 ± 7,4 _{Ba}	63,4 ± 7,4 _{Aa}	78,2 ± 7,8 _{Aa}	74,2 ± 7,4 _{Ba}
280	100 ^{Ca}	87,3 ± 7,4 _{Ba}	97,5 ± 7,8 ^{Aa}	95,3 ± 7,4 _{Ca}
560	100 ^{Ca}	100 ^{Ca}	100 ^{Aa}	100 ^{Ca}
1120	100 ^{Ca}	92,9 ± 7,4 ^{Dab}	82,7 ± 7,4 _{Bb}	100 ^{Ca}

*Média ± DP de uma cepa padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) e duas linhagens isoladas de leite mastítico. Letras minúsculas diferentes nas linhas representam diferenças significativas entre os extratos na mesma concentração. Letras maiúsculas diferentes nas colunas representam diferenças significativas entre as concentrações do mesmo extrato ($p < 0,05$).

A atividade antimicrobiana de extratos de propolis tem sido atribuída a diversas classes de compostos, principalmente a presença de flavonoides (CUSHNIE; LAMB, 2005; MESBAH; SAMIA, 2011), ácidos fenólicos (MUSHTAQ et al., 2016), ésteres (VALENCIA et al., 2012) e terpenoides (BANKOVA et al., 1995), não sendo muitas vezes, atribuída a uma única classe de compostos. FIORDALISI et al. (2016) ao compararem a atividade antimicrobiana de extratos de propolis de diferentes regiões do Estado de Santa Catarina verificaram que o extrato invernal de Urupema, apesar do menor conteúdo de flavonoides,

possuía o mesmo efeito contra *S. aureus* isolados de leite mastítico que os extratos com maiores teores de flavonoides. Naquele estudo, 200 µg/mL do extrato de propolis de Urupema causou redução significativa no crescimento de *S. aureus* e 250 µg/mL reduziu em 2 log 10 o crescimento das bactérias. Resultado este, muito similar ao encontrado, no presente estudo, para a propolis de Urupema (Tabela 3). SANTANA et al., (2012) também encontraram atividade antimicrobiana similar a do presente estudo com extratos de propolis contendo menores teores de flavonoides e fenolicos (2,4 e 7,7 mg/g, respectivamente).

Na literatura, os valores de CIMs de extratos etanólicos de propolis contra *S. aureus* são muito variáveis. Enquanto ALENCAR et al. (2007) encontraram para a propolis vermelha uma CIM inferior a 100 µg/mL, DIAS; PEREIRA; ESTEVINHO (2012) e CAMPOS et al. (2014) encontraram muito superiores, variando de 240 a 3100 µg/mL dependendo da origem. No entanto, valores de CIM para *S. aureus* muito inferiores (0,0004 µg/mL a 9,75 µg/mL) estão também relatados na literatura (KUJUMGIEV et al., 1999; CHOUDHARI et al., 2012). Estes valores tão baixos podem ser explicados pelo uso de amostras com diferentes composições químicas e de frações purificadas de propolis.

No presente estudo, o efeito antimicrobiano foi pouco influenciado pela sazonalidade (Tabela 3). Esses resultados podem ser, em parte, explicados pela presença majoritária do flavonoide quercetina, embora tenha se verificado o efeito sinérgico dos compostos químicos dos extratos. Tal efeito explica, por exemplo, a mesma atividade antimicrobiana para o extrato de primavera comparado aos demais, apesar da quercetina não ter sido o principal composto fenólico encontrado. O efeito antimicrobiano da quercetina tem sido demonstrado frente a *S. aureus*, incluindo cepas multirresistentes (XU; LEE, 2001; DINIZ-SILVA et al., 2017; GOMES et al., 2018). Entretanto, há na literatura, discrepâncias quanto à concentração inibitória mínima deste flavonoide. PARKAR; STEVENSON; SKINNER (2008) encontraram uma CIM de 62,5 µg/mL e Kang et al. (2006) acima de 300 µg/mL.

Em geral, o efeito antimicrobiano dos flavonoides se deve a presença de grupos hidroxilas que possuem afinidade com

proteínas. Deste modo, atuam como inibidores de enzimas bacterianas, interferindo em vias de síntese, comprometendo seu metabolismo (FLAMBÓ, 2013).

Todos os extratos causaram redução significativa na viabilidade celular a partir de 70 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4). Entretanto, o extrato de propolis primavera foi o mais tóxico a este tipo celular, seguido pelo de inverno. O extrato da primavera reduziu a menos da metade as células viáveis na concentração de 140 $\mu\text{g/mL}$. Já na concentração de 280 $\mu\text{g/mL}$ todos os demais extratos apresentaram a mesma toxicidade às células MAC-T, reduzindo a viabilidade em cerca de 50%.

Tabela 4. Porcentagem de viabilidade * das células MAC-T após exposição a diferentes concentrações dos extratos de propolis de Urupema coletados nas diferentes estações do ano.

Concentração de Propolis ($\mu\text{g/mL}$)	Primavera	Verão	Outono	Inverno
0	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}
DMSO 0,5%**	92 \pm 3,4 ^{Aa}	75 \pm 10 ^{Bc}	100 \pm 6,5 ^{Aa}	91 \pm 18,8 ^{Aa}
8,75	92 \pm 8,9 ^{Aa}	95 \pm 13,4 ^{Aa}	100 \pm 5,2 ^{Aa}	97 \pm 21,2 ^{Aa}
17,5	88 \pm 9,8 ^{Ba}	100 \pm 7,5 ^{Aa}	98 \pm 8,8 ^{Aa}	92 \pm 12,8 ^{Aa}
35	86 \pm 6,4 ^{Bab}	88 \pm 7,9 ^{Bb}	93 \pm 7,4 ^{Aa}	95 \pm 13,2 ^{Aa}
70	69 \pm 6,7 ^{Bb}	90 \pm 6,6 ^{Aab}	75 \pm 7,4 ^{Bbc}	70 \pm 14,2 ^{Bb}
140	36 \pm 9,4 ^{Cc}	62 \pm 7,7 ^{Ac}	55 \pm 6,3 ^{Bc}	51 \pm 12,6 ^{Bc}

280	25 ± 9,9 Bcd	36 ± 4,2 Ad	41 ± 4,9 AcD	35 ± 4,4 Ad
560	19 ± 7,4 Bd	33 ± 10 Ad	37 ± 2,3 Ad	34 ± 8,2 ^{Ad}

* média ± DP de três repetições independentes. Letras maiúsculas diferentes nas colunas representam diferenças significativas entre as concentrações do mesmo extrato ($p < 0,05$).

** controle negativo.

Através de uma regressão não linear foi possível determinar a concentração responsável por reduzir em 50% a viabilidade celular. Os valores encontrados estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Concentração Inibitória (IC₅₀) de extratos de propolis de diferentes estações do ano em linhagem de células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T).

Primavera (µg/mL)	Verão (µg/mL)	Outono (µg/mL)	Inverno (µg/mL)
120 ± 2,80	252,6 ± 6,08	236 ± 5,46	188,6 ± 5,70

É interessante ressaltar que o extrato de primavera além de possuir maior efeito tóxico sobre as células MAC-T também obteve maior atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*. A presença do composto não identificado como majoritário na amostra em questão e em menor quantidade na amostra de inverno, provavelmente conferiu a estes extratos tal toxicidade.

Estes resultados são similares aos encontrados por FIORDALISI et al., (2016) que encontraram IC₅₀ de 171,8 µg/mL para a propolis de Urupema em um modelo *in vitro* com explantes da glândula mamária bovina. A corroboração encontrada entre o modelo com explantes da glândula mamária, que é uma cultura primária, e o de células MAC-T tem importante significado na validação dos ensaios *in vitro* no estudo da toxicidade de produtos com potencial uso no tratamento da mastite bovina. Tais modelos *in vitro* podem proporcionar maior

confiabilidade e segurança na indicação de doses de fitoterápicos para aplicação e/ou validação de modelos *in vivo*. Esta é uma abordagem inovadora, uma vez que o uso de células MAC-T para estudos de citotoxicidade de produtos naturais é pouco frequente. Recentemente, WANG et al. (2016) avaliaram a toxicidade de doses da propolis chinesa sobre este tipo celular. Apesar de não terem determinado a IC50 do extrato, os autores concluíram que concentrações abaixo de 15 µg/mL eram seguras para as células MAC-T, uma vez que, atenuavam a perda de viabilidade causada pela exposição ao LPS e as bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Mais frequentes são os estudos do potencial citotóxico de extratos de propolis sobre células tumorais. Neste contexto, é desejado que os extratos tenham IC50 baixos, demonstrando alto potencial citotóxico. Nestes modelos, os valores de IC50 encontrados na literatura variam muito em função do tipo celular estudado e da origem e composição da amostra de propolis. Alguns autores encontraram valores muito inferiores aos aqui relatados. ALENCAR et al. (2007) avaliando o efeito da propolis sobre células tumorais humana HeLa encontraram a IC50 de 7,5 µg/mL. Já DA SILVA FROZZA et al. (2013a) usando também HeLa e uma propolis de outra origem geográfica encontraram valor de IC50 cerca de dez vezes superior (81,40 µg/mL).

Em nosso modelo de estudo, diferentemente dos estudos com células tumorais, é de interesse que os extratos com alto potencial antimicrobiano possuam baixa citotoxicidade às células do úbere, visando menor risco de efeitos danosos à saúde da glândula mamária bovina. No presente estudo, o efeito antimicrobiano foi acompanhado de moderado efeito tóxico as células. Estes resultados sugerem cautela na administração intramamária de extratos de propolis, e está de acordo com relatos de que o uso interno pode causar aumento de CCS e reação pro-inflamatória (TRONCARELLI, et al., 2014). Apesar disso é preciso considerar que *in vivo* outros fatores como a presença de leite e a complexidade celular da glândula mamária podem afetar a liberação do princípio ativo, atenuando esta toxicidade. Além disto, bactérias *S. aureus* tem a capacidade de colonizar e sobreviver dentro das células mamárias, resultando em baixa taxa de cura (BRADLEY, 2002; KLEIN, 2004;

ANDERSON; AZIZOGLU, 2014). Neste sentido, a morte de algumas células poderia ajudar no combate de infecções crônicas, através da liberação de patógenos tornando-os acessíveis aos antimicrobianos.

A análise da citotoxicidade é comumente usada na literatura para descrever danos às células e tecidos (RUFFA et al., 2002; LI et al., 2008; SACOMAN et al., 2008; DA SILVA FROZZA et al., 2013b). De maneira complementar, através de outros ensaios, pode-se identificar o tipo de morte celular. O monitoramento do tipo de morte que ocasiona a perda da viabilidade celular pode ser uma informação importante na avaliação do potencial de um produto para o tratamento da mastite, considerando o agravamento do quadro clínico do animal em casos de indução de necrose. Deste modo, o tipo de dano que causou a perda da viabilidade celular após a incubação com o extrato de própolis primaveril de Urupema, através da marcação das células MAC-T com anexina V/PI foi estudado.

A representação gráfica e a porcentagem de morte celular de células MAC-T após tratamento com as diferentes concentrações do extrato primaveril de propolis estão mostradas na figura 2. Pode-se observar que em nenhuma das concentrações testadas houve diferença significativa no percentual de células necróticas. Portanto, com 120 µg/mL do extrato de própolis, valor próximo a IC50 foram encontrados mínimos danos a membrana celular das células MAC-T. Por outro lado, o aumento nas concentrações de propolis revelou um incremento na porcentagem de células MAC-T em apoptose.

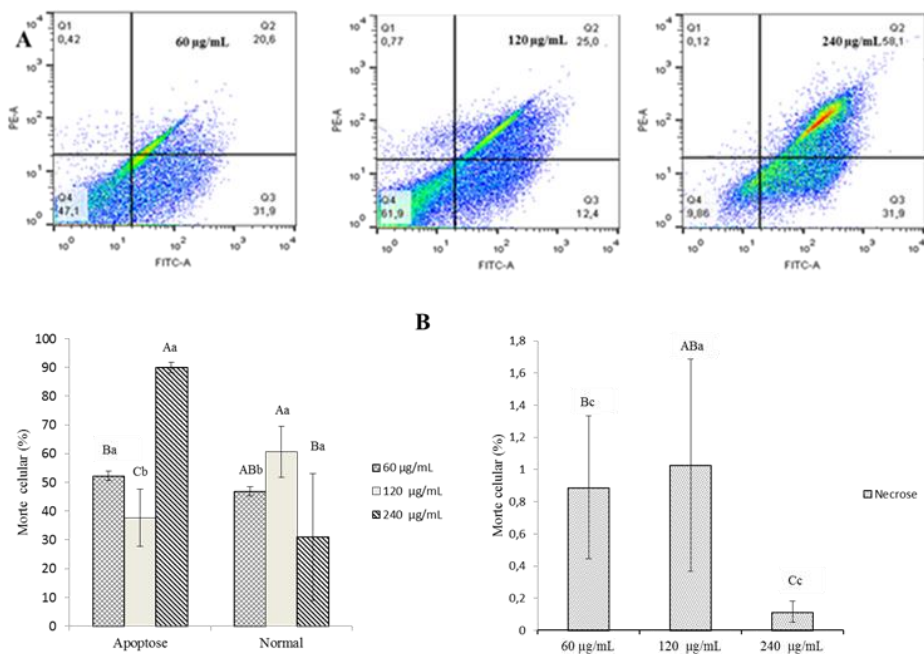


Figura 1. (A) Representação gráfica do percentual de células apoptóticas (quadrante superior e inferior direito), necróticas (quadrante superior esquerdo) e normais (quadrante inferior esquerdo) após tratamento com três diferentes concentrações de extrato primavera de propolis de Urupema. (B) Média de nove réplicas distribuídas em três experimentos independentes \pm DP do percentual de células em necrose, apoptose e sem alteração após 24h de tratamento com 60, 120 e 240 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de propolis primavera de Urupema. Letras maiúsculas representam diferenças no percentual de uma mesma alteração celular em diferentes concentrações testadas; letras minúsculas indicam diferenças significativas no percentual de alterações celulares distintas para uma mesma concentração testada ($p < 0,05$).

Durante apoptose ocorrem diversas alterações na morfologia das células, como condensação da cromatina, a retração da célula e a perda de aderência com a matriz

extracelular e células vizinhas (HÄCKER, 2017). O potencial de indução da apoptose por extratos de própolis já foi previamente estudado visando o seu uso para o tratamento de doenças, tais como infecciosas e neoplásicas (ORŠOLIĆ; ŠARANOVIĆ; BAŠIĆ, 2006; OHTA et al., 2008; BEGNINI et al., 2014). Esta indução ocorre possivelmente pela liberação de citocromo C do interior da mitocôndria para o citoplasma, promovendo o início da cascata de caspase que por sua vez ativam proteínas pró-apoptóticas (SAWICKA et al., 2012).

Ainda que registros na literatura tenham mostrado o aumento da apoptose após o tratamento com propolis, WANG et al. (2016) perceberam um número significativamente menor de células MAC-T apoptóticas após pré-tratamento com propolis chinesa e posterior indução de estresse celular por exposição a bactérias *E. coli* e *S. aureus* inativadas. Diante disto, os autores sugeriram que a propolis possui efeitos moduladores na cascata de apoptose, como o bloqueio da ativação de caspases. Estas proteínas são sinalizadores do processo de apoptose. Ao clivarem a membrana celular levam à condensação e fragmentação nuclear e a externalização de fosfolipídios da membrana, indicando ao macrófago qual célula deve ser fagocitada (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997).

Durante a indução da apoptose celular, ao haver o bloqueio do extravasamento do conteúdo celular, se restringe também o início da reação inflamatória, possibilitando ao patógeno evadir posteriormente as defesas do hospedeiro (BOUTET et al., 2004). Neste processo, há a produção do Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GMCSF) que estimula e afeta a funcionalidade de células de defesa, contribuindo para o atraso do apoptose destes tipos celulares causando acúmulo persistente de neutrófilos e macrófagos na região afetada dificultando a ação dos antimicrobianos (BOUTET et al., 2004). Entretanto, vale considerar que a indução da apoptose também pode representar uma estratégia para as células do hospedeiro na tentativa de se defender contra bactérias patogênicas prevenindo a liberação de bactérias intracelulares e a disseminação das mesmas (CHEN et al., 2017).

No presente estudo, a ação moduladora da propolis sobre células MAC-T poderia explicar o percentual superior de células

normais após o tratamento com 120 µg/mL de propolis de Urupema comparado ao de 60 µg/mL. O aumento do percentual de células apoptóticas em concentrações superiores a 240 µg/mL também não deve representar um dano substancial às células da glândula mamária, uma vez que a morte por apoptose não causa reação tissular.

Como já foi mencionadas, bactérias da espécie *S. aureus* colonizam de maneira intracelular o epitélio mamário e estes patógenos produzem toxinas que destroem as membranas celulares, danificando diretamente o tecido produtor de leite e induzindo a necrose nas glândulas mamárias (JENSEN et al., 2013). Inicialmente, as bactérias danificam o revestimento dos tecidos das cisternas de teto e interior da glândula. Em seguida, invadem o sistema de dutos e estabelecem colônias nos alvéolos formando abscessos. Se a infecção não for eliminada, níveis bacterianos na glândula mamária tendem a se elevar ocasionando danos ao epitélio mamário. Em uma infecção persistente, o número de células somáticas no leite aumenta bem como, o dano tecidual é agravado. Há perda da integridade dos alvéolos na glândula e rompimento da barreira entre o leite e sangue, ocorrendo o extravase do fluido extracelular e contaminação do leite (ZHAO; LACASSE, 2008).

Desta maneira, ao correlacionar os resultados obtidos pela análise da indução da apoptose celular pela própolis de Urupema em MAC-T com sua ação antimicrobiana frente a *S. aureus*, pode-se caracterizar este produto como promissor para o tratamento de mastites causadas por este patógeno. Isto porque, em mastites causadas por *S. aureus*, a perda da viabilidade celular por indução da apoptose após a exposição às concentrações de propolis pode não ser prejudicial ao hospedeiro. Neste processo há retenção do conteúdo celular auxiliando assim na prevenção da disseminação dos patógenos na glândula mamária.

4. CONCLUSÃO

As amostras sazonais de própolis de Urupema tiveram pouca influência sobre a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e a citotoxicidade sobre células MAC-T. A perda de viabilidade

celular provocada pelos extratos ocorreu por indução do apoptose, podendo representar uma estratégia na prevenção à disseminação das bactérias dentro da glândula mamária. Desse modo, pode-se sugerir o potencial dos extratos de própolis de Urupema para o tratamento da mastite bovina causada por *S. aureus* independente da época de produção da resina.

REFERÊNCIAS

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K. S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7286–7292, 2004.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERT, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1994. 1294 p.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, 2007.

ANDERSON, K. L.; AZIZOGLU, R. O. **Detection and Causes of Bovine Mastitis with Emphasis on *Staphylococcus aureus***. In: Encyclopedia of Agriculture and Food Systems. Ed. Elsevier. v. 2. 2014. p.435-440.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; PODOV, S. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Brazilian Propolis. **Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**. v. 50. p.2-7, 1995.

BEGNINI, K. R.; MOURA DE LEON, P. M.; THUROW, H.; SCHULTZE, E.; CAMPOS, V. F.; MARTINS RODRIGUES, F.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; SAVEGNAGO, L.;

ROESCH-ELY, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; COLLARES, T.; PÊGAS HENRIQUES, J. A.; SEIXAS, F. K. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2014/639856>

BONIFÁCIO, B. V. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroetanólicos de Astronium sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados** Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroetanólicos de Astronium sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados. 2014. 140 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2014.

BOUDJELLAB, N.; CHAN-TANG, H. S.; ZHAO, X. Bovine interleukin-1 expression by cultured mammary epithelial cells (MAC-T) and its involvement in the release of MAC-T derived interleukin-8. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 127, n. 2, p. 191–199, 2000.

BOUTET, P.; BOULANGER, D.; GILLET, L.; VANDERPLASSCHEN, A.; CLOSSET, R.; BUREAU, F.; LEKEUX, P. Delayed Neutrophil Apoptosis in Bovine Subclinical Mastitis. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 12, p. 4104–4114, 2004.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: An evolving disease. **Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.

CAMPOS, J. F.; DOS SANTOS, U. P.; MACORINI, L. F. B.; DE MELO, A. M. M. F.; BALESTIERI, J. B. P.; PAREDES-GAMERO, E. J.; CARDOSO, C. A. L.; DE PICOLI SOUZA, K.; DOS SANTOS, E. L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 374–380, 2014.

CHEN, W.; LIU, Y.; ZHANG, L.; GU, X.; LIU, G.; SHAHID, M. *Nocardia cyriacigeogica* from Bovine Mastitis Induced *in vitro* Apoptosis of Bovine Mammary Epithelial Cells via Activation of Mitochondria - Caspase Pathway. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 194, n. 7, p. 1–13, 2017.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, v. 163, p. 1161–1168, 2002.

CHOU DHARI, M. K.; PUNEKAR, S. A.; RANADE, R. V.; PAKNIKAR, K. M. Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 141, n. 1, p. 363–367, 2012.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved standard- tenth edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institut; 2015a.

CLSI. Performance Standarts for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard; 12th Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institut; 2015b.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

DA SILVA FROZZA, C. O.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; DE SOUZA, M. D. O.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A. P.; ROESCHELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 52, p. 137–142, 2013a.

DIAS, L. G.; PEREIRA, A. P.; ESTEVINHO, L. M. Comparative

study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4246–4253, 2012.

DINIZ-SILVA, H. T.; MAGNANI, M.; DE SIQUEIRA, S.; DE SOUZA, E. L.; DE SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Fruit flavonoids as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpresses norA. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 324–326, 2017.

EL-GUENDOZ, S.; AAZZA, S.; LYOUSSI, B.; MAJDOUB, N.; BANKOVA, V.; POPOVA, M.; RAPOSO, S.; ANTUNES, M. D.; MIGUEL, M. G. Effect of poplar-type propolis on oxidative stability and rheological properties of O/W emulsions. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.05.017>.

FIORDALISI, S. A. L.; HONORATO, L. A.; LOIKO, M. R.; AVANCINI, C. A. M.; VELEIRINHO, M. B. R.; FILHO, L. C. P. M.; KUHNEN, S. The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, 2016.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. Atividades biológicas dos flavonoides : atividade antimicrobiana. 2013. 43 f. Tese (doutorado)-Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2013.

GOMES, F.; MARTINS, N.; BARROS, L.; RODRIGUES, M. E.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; HENRIQUES, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Plant phenolic extracts as an effective strategy to control *Staphylococcus aureus*, the dairy industry pathogen. **Industrial Crops and Products**, v. 112, n. December 2017, p. 515–520, 2018.

HÄCKER, G. Apoptosis in infection. **Microbes and Infection**, v.

17, n. 4, p. 1–8, 2017.

HUYNH, H. T.; ROBITAILLE, G.; TURNER, J. D. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): An in vitro model for bovine lactation. **Experimental Cell Research**, v. 197, n. 2, p. 191–199, 1991.

JENSEN, K.; GÜNTHER, J.; TALBOT, R.; PETZL, W.; ZERBE, H.; SCHUBERTH, H. J.; SEYFERT, H. M.; GLASS, E. J. *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-induced mastitis differentially modulate transcriptional responses in neighbouring uninfected bovine mammary gland quarters. **BMC Genomics**, v. 16. 2013. doi: 10.1186/1471-2164-14-36.

JORGE, R.; FURTADO, N. A. J. C.; SOUSA, J. P. B.; DA SILVA FILHO, A. A.; GREGÓRIO JUNIOR, L. E.; MARTINS, C. H. G.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. Brazilian propolis: Seasonal variation of the prenylated p-coumaric acids and antimicrobial activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 12, p. 889–893, 2008.

KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 452–461, 2009.

KLEIN, B. G. Cunningham Tratado De Fisiologia Veterinária. **Tratado De Fisiologia Veterinária. 5th edition.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235–240, 1999.

PIOTROWSKA-TOMALA, K. K.; BAH, M. M.; JANKOWSKA, K.; LUKASIK, K.; WARMOWSKI, P.; GALVAO, A. M.; SKARZYNSKI, D. J. Lipopolysaccharides, cytokines, and nitric oxide affect secretion of prostaglandins and leukotrienes by bovine mammary gland during experimentally

induced mastitis *in vivo* and *in vitro*. **Veterinary Journal**, v. 77, n. 1, p. 90–99, 2014.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. **Cell Host and Microbe**, v. 8, n. 1, p.44-54, 2010.

LEITE, P.F. & KLEIN, R.M. Vegetação. In: IBGE. **Geografia do Brasil: Região Sul**. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. v. 2, p. 113-150. 1990.

LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 5434–5440, 2008.

LIU, M.; SONG, S.; LI, H.; JIANG, X.; YIN, P.; WAN, C.; LIU, X.; LIU, F.; XU, J. The protective effect of caffeic acid against inflammation injury of primary bovine mammary epithelial cells induced by lipopolysaccharide. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 2856–2865, 2014.

LOTTI, C.; FERNANDEZ, M. C.; PICCINELLI, A. L.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNÁNDEZ, I. M.; RASTRELLI, L. Chemical constituents of red Mexican propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2209–2213, 2010.

MACHADO, B. A. S.; SILVA, R. P. D.; BARRETO, G. D. A.; COSTA, S. S.; DA SILVA, D. F.; BRANDÃO, H. N.; DA ROCHA, J. L. C.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A. P.; UMSZA-GUEZ, M. A.; PADILHA, F. F. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLoS ONE**, v.11, n.1 2016a. doi: 10.1371/journal.pone.0145954.

MACHADO, C. S.; MOKOCHINSKI, J. B.; LIRA, T. O. De; DE

OLIVEIRA, F. D. C. E.; CARDOSO, M. V.; FERREIRA, R. G.; SAWAYA, A. C. H. F.; FERREIRA, A. G.; PESSOA, C.; CUESTA-RUBIO, O.; MONTEIRO, M. C.; DE CAMPOS, M. S.; TORRES, Y. R. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016. 2016b. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6057650>

MARTINS-RAMOS, D.; CHAVES, C. L.; BORTOLUZZI, R. L. da C.; MANTOVANI, A. Florística de Floresta Ombrófila Mista Altomontana e de Campos em Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 2, p. 156–166, 2011.

MENEGHELLI, C.; JOAQUIM, L. S. D.; FÉLIX, G. L. Q.; SOMENSI, A.; TOMAZZOLI, M.; DA SILVA, D. A.; BERTI, F. V.; VELEIRINHO, M. B. R.; RECOUVREUX, D. de O. S.; DE MATTOS ZERI, A. C.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: An *in vitro* and *in vivo* study. **Microvascular Research**, v. 88, p. 1-11. 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.03.003>.

MESBAH, L.; SAMIA, A. Bioavailability and pharmacokinetic of the Algerian propolis constituent naringenin in rats after oral administration. **Planta Medica**, v. 77, n. 11. 2011. doi: 10.1055/s-0031-1282207.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63. 1983.

MUSHTAQ, S.; AGA, M. A.; QAZI, P. H.; ALI, M. N.; SHAH, A. M.; LONE, S. A.; SHAH, A.; HUSSAIN, A.; RASOOL, F.; DAR, H.; SHAH, Z. H.; LONE, S. H. Isolation, characterization and HPLC quantification of compounds from *Aquilegia fragrans* Benth: Their *in vitro* antibacterial activities against bovine mastitis pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 9–12, 2016.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: Killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 299–306, 1997.

OHTA, T.; KUNIMASA, K.; KOBAYASHI, T.; SAKAMOTO, M.; KAJI, K. Propolis Suppresses Tumor Angiogenesis by Inducing Apoptosis in Tube-Forming Endothelial Cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, n. 9, p. 2436–2440, 2008.

ORŠOLIĆ, N.; ŠARANOVIC, A. B.; BAŠIĆ, I. Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. **Planta Medica**, v. 72, n. 1, p. 20–27, 2006.

OSÉS, S. M.; PASCUAL-MATÉ, A.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; SANCHO, M. T. Bioactive properties of honey with propolis. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1215–1223, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.050>.

PARKAR, S. G.; STEVENSON, D. E.; SKINNER, M. A. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 295–298, 2008.

PIOTROWSKA-TOMALA, K. K.; BAH, M. M.; JANKOWSKA, K.; LUKASIK, K.; WARMOWSKI, P.; GALVAO, A. M.; SKARZYNSKI, D. J. Lipopolysaccharides, cytokines, and nitric oxide affect secretion of prostaglandins and leukotrienes by bovine mammary gland during experimentally induced mastitis *in vivo* and *in vitro*. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 52, p. 90–99, 2015.

POPOVA, M.; BANKOVA, V.; BUTOVSKA, D.; PETKOV, V.; NIKOLOVA-DAMYANOVA, B.; SABATINI, A. G.; MARCAZZAN, G. L.; BOGDANOV, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-

type propolis. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 4, p. 235–340, 2004.

POPOVA, M.; SILICI, S.; KAFTANOGLU, O.; BANKOVA, V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. **Phytomedicine**, v. 12, n. 3, p. 221–228, 2005.

ZEGGIO, A.R.S. **Própolis catarinense: Influência da sazonalidade e da origem geográfica no perfil de metabólitos secundários**. 2016. 160 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2016.

RUFFA, M. J.; FERRARO, G.; WAGNER, M. L.; CALCAGNO, M. L.; CAMPOS, R. H.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 335–339, 2002.

SACOMAN, J. L.; MONTEIRO, K. M.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G. M.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 5, p. 411–415, 2008.

SANTANA, H. F.; BARBOSA, A. A. T.; FERREIRA, S. O.; MANTOVANI, H. C. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 485–91, 2012.

SAWICKA, D.; CAR, H.; BORAWSKA, M. H.; NIKLIŃSKI, J. The anticancer activity of propolis. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 50, n. 1. p. 25-37. 2012. doi: 10.2478/18693.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 69–73, 2005.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR., J. A.; ROSSI J A JR. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SOARES, T. S.; MOTA, J. Araucária: o pinheiro brasileiro. **Revista científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 2, n. 3, 2004.

TRONCARELLI, M. Z.; LANGONI, H.; B., MELLO, H.; SILVA, A. S., GUIMARÃES; M., S. R.; DONIZETE, B. Safety of a nanopropolis formulation intended for intramammary treatment of bovine mastitis in organic dairy herds. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 5, p. 517–545, 2014.

VALENCIA, D.; ALDAY, E.; ROBLES-ZEPEDA, R.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; GALVEZ-RUIZ, J. C.; SALAS-REYES, M.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; VELAZQUEZ-CONTRERAS, E.; HERNANDEZ, J.; VELAZQUEZ, C. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 645–651, 2012.

WANG, K.; JIN, X. L.; SHEN, X. G.; SUN, L. P.; WU, L. M.; WEI, J. Q.; MARCUCCI, M. C.; HU, F. L.; LIU, J. X. Effects of Chinese Propolis in Protecting Bovine Mammary Epithelial Cells against Mastitis Pathogens-Induced Cell Damage. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, n. 3, p. 1-12. 2016. doi: 10.1155/2016/8028291.

WOLLENWEBER, E. Exkret-Flavonoide bei Blütenpflanzen und Farnen. **Naturwissenschaften**, v. 76, n. 10, p. 458–463, 1989.

XU, H. X.; LEE, S. F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 1, p. 39–43, 2001.

ZHANG, W.; LI, X.; XU, T.; MA, M.; ZHANG, Y.; GAO, M. Q. Inflammatory responses of stromal fibroblasts to inflammatory epithelial cells are involved in the pathogenesis of bovine mastitis. **Experimental Cell Research**, v. 349, n. 1, p. 45–52, 2016.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. **Journal of animal science**, v. 86, n.13, p. 57-65. 2008. doi: 10.2527/jas.2007-0302.

ZHOU, J.; LI, Y.; ZHAO, J.; XUE, X.; WU, L.; CHEN, F. Geographical traceability of propolis by high-performance liquid-chromatography fingerprints. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 749–759, 2008.

CAPITULO III- *Aloe barbadensis* Miller leaf exudate is a potential treatment for bovine mastitis.

Corresponding author: Shirley Kuhnen (shirley.kuhnen@ufsc.br)

Author roles: Fiordalisi SdAL: Conceptualization, Data Curation, Investigation, Methodology, Writing – Original Draft Preparation; Honorato LA: Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing – Original Draft Preparation; Kuhnen S: Conceptualization, Funding Acquisition, Investigation, Methodology, Writing – Original Draft Preparation, Writing – Review & Editing

Competing interests: No competing interests were disclosed.

Grant information: This work was supported by the CNPq (National Council on Scientific and Technological Development; Brasilia, Brazil) (403415/2013-6, Edital 39/2013).

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Copyright: © 2018 Fiordalisi SdAL et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution Licence](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. Data associated with the article are available under the terms of the [Creative Commons Zero "No rights reserved" data waiver](#) (CC0 1.0 Public domain dedication).

How to cite this article: Fiordalisi SdAL, Honorato LA and Kuhnen S. *Aloe barbadensis* Miller leaf exudate is a potential treatment for bovine mastitis [version 1; referees: 1 approved, 1 not approved] *F1000Research* 2018, 7:1285 (doi: [10.12688/f1000research.15671.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.15671.1))

First published: 14 Aug 2018, 7:1285 (doi: [10.12688/f1000research.15671.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.15671.1))

Keywords

phytotherapy, *Staphylococcus aureus*, MAC-T cells

Comments (0)

Introduction

Bovine mastitis, which is characterized by inflammation of the mammary gland, is the most frequent infection found in dairy herds worldwide¹. The treatment recommended for mastitis is the administration of intramammary antimicrobials. However, control of infections caused by *Staphylococcus aureus*, the principal etiological agent of bovine mastitis², is very difficult. In addition to inactivating several antimicrobials, this microorganism can also survive in the intracellular environment after phagocytosis. As a consequence, the cure rate of mastitis caused by *S. aureus* is low, with a high incidence of recurrence³. As such, interest in the search for methods of control and prevention has increased, including the identification of new antimicrobials⁴⁻⁷.

In vivo methods are still commonly used to study bovine mastitis, but *in vitro* testing has been recommended⁸. Based on *in vitro* models, studies have produced a wide range of results, from identifying the prevalence of etiological agents of mastitis to evaluating the direct effects of products on the susceptibility of studied microorganisms^{9,10}. Among these, *in vitro* tests on antimicrobials are some of the most widely used⁸. *In vitro* studies with bovine mammary gland explants or mammary epithelial cells (MEC) are commonly used to assess the different functions of mammary glands, such as the response to initial infection^{11,12}. Recently, primary cultures of mammary explants and MECs were also suggested as adequate models in the search for new therapeutic agents^{5,13}. In the case of mastitis, such *in vitro* methods can help evaluate the toxicity of antimicrobials, enabling the determination of safe doses and minimizing the potential risks during *in vivo* validation.

Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) is a plant widely used and recognized for its antimicrobial, anti-inflammatory, wound-healing, antitumor, and antioxidant pharmacological properties¹⁴. Yet, until now, few studies have reported on its potential as a treatment for bovine mastitis. Most research on the pharmaceutical potential of *Aloe vera* has studied the mucilaginous gel, commonly known as aloe vera gel, that is rich in complex carbohydrates, particularly acemannans^{15,16}. However, along with the gel, a yellow exudate with a strong odor and bitter taste, known as leaf exudate (LE), can also be extracted from the leaves¹⁷. Its release occurs as soon as the leaves are cut and it can be found within the phloem vessels^{18,19}. Despite being composed of large amounts of 1,8-dihydroxyanthraquinone derivatives and their glycosides, the industry that uses aloe vera gel as a raw material considers LE a residue. Among the anthraquinones found in LE, the major compounds are a mixture of two readily oxidizable diastereomers, aloin A and aloin B, which are sometimes undesirable because of their toxic and cathartic potential. However, these compounds may be of therapeutic interest in the control of antimicrobial and tumor cell proliferation^{20,21}.

Thus, the current study seeks to investigate the potential of LE from Aloe vera leaves in the control of bovine mastitis through *in vitro* models that evaluate the antimicrobial effects against *S. aureus* and cytotoxicity to MAC-T cells.

Methods

Sampling and extraction of leaf exudate

A total of 30 plant samples were collected from 3-year-old Aloe vera (*Aloe barbadensis*) at random from a commercial grower (Naturama Sucos Integrais do Brasil Ltda®; Paulo Lopes, SC, Brazil) in March, June, September and December of 2015, and one leaf was taken from the mid-position of each plant. Thus, 30 leaves in total were collected for each month, representing each season. Leaves were cut at the base and maintained vertically for 3 h in a beaker to collect the LE at room temperature. Subsequently, the LE was lyophilized and stored at -20°C. LEs of six plants were combined for a total of five repetitions for each season of the year.

Chemical profile of leaf exudate

Total phenolics. The total phenolic content was determined using the colorimetric method of Folin-Ciocalteu¹⁴ and an external standard curve of gallic acid (10–100 µg/ml) ($y = 0.0197x / r^2 = 0.987$). The results were expressed in µg of gallic acid equivalents (GAE)/mg of extract (µg of GAE/mg). All tests were performed in triplicate.

Aloin. The aloin content in LE was obtained on an UHPLC Thermo Scientific UltiMate 3000 RS Dual System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA), using a Thermo Scientific C18 reverse-phase column (4.6 x 250 mm; 5 µm; 120Å (Acclaim™120, Thermo Scientific®) at 40°C, operating at 240, 260, 280 and 320 nm. The mobile phase was eluted at 1 ml/min flow rate, using a methanol/water (70/30, v/v) mixture²². The identification of aloin was based on a comparison of the chromatographic profile and retention time with the commercial standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA/ B6906). After the addition of the standard, samples were co-chromatographed to confirm identification of the compound. Aloin content was determined through an external standard curve of barbaloin ($y = 302.73x / r^2 = 0.9822$) and the result expressed in µg of aloin per mg of the sample (µg/mg).

Antimicrobial activity

Antimicrobial activity was evaluated using a broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute Manual²³. We tested six different concentrations of LE (4000 to 125 µg/ml) against the standard strain of *S. aureus* ATCC 25923 (Collection of Reference Microorganisms on Health Surveillance, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brazil) and seven strains of mastitic milk isolates. Milk samples from cows were submitted to the California Mastitis Test (CMT). CMT-positive milk samples were plated on blood agar supplemented with 5% sterile ovine blood and incubated for 24–48 h at 37°C. Gram-positive, catalase-positive, and rabbit plasma coagulase-positive samples were biochemically confirmed as *Staphylococcus aureus*²⁴. Each strain was considered one repetition of the experiment with five replicates/repetition. As such, we conducted eight repetitions for each LE sample.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined through visual analysis of turbidity after 24 hours of incubation on plates at 37°C in addition to spectrophotometric reading at

600 nm to determine the percentage of inhibition of bacterial growth, using a previously described method²³.

Because LE is an exudate with a yellow color that easily oxidizes to a dark coloration¹⁴, we confirmed the MIC through a colorimetric method. We added 50 μ l of resazurin dye (100 μ g/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to each well after reading the plates by spectrophotometer (600 nm). The plates were left to incubate at 37°C for an additional 30 minutes²⁵.

Cytotoxicity of leaf exudate to MAC-T cells

Mammary epithelial cells of the MAC-T (Mammary Alveolar Cells-T) lineage were maintained in culture, as indicated by the supplier (Banco de Células do Rio de Janeiro, Brazil). Briefly, MAC-T cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and supplemented with 100 U/ml of penicillin, 100 μ g/ml of streptomycin, 20% (V/V) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, CA, USA), 4 mM L-glutamine (Synth), 4.5 g/L glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 mM of sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1.5 g/L sodium bicarbonate (Vetec™ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5 μ g/ml insulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 1 μ g/ml hydrocortisone (Sigma –Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37°C and 5% CO₂ in a humidified incubator. We changed the medium every 48 h. After reaching confluence, the cells were treated with 0.25% trypsin with 1 mM EDTA (Gibco, CA, USA) to prepare the cellular suspension (10⁵ cells/ml). The suspension was transferred a 96-well microplate (100 μ l/well), followed by incubation (24 h) in culture conditions for adherence. Subsequently, varying concentrations (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8 and 3.9 μ g/ml) of LE from the summer samples were added for 24 h, and cytotoxicity was determined based on the MTT method (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)²⁶. The formed formazan was dissolved with dimethyl sulfoxide (DMSO) to give a purple color with characteristic absorption at 540 nm. Intensity of purple color is directly proportional to the cell number, thus indicating cell viability. The experiments were performed in triplicate.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD), of at least three independent experiments. We analyzed the data using analysis of variance with a Tukey adjustment (GraphPad Prism 5.0). We considered the effects statistically significant for P<0.05. The inhibitory concentrations capable of reducing cellular viability by 50% (IC₅₀) were calculated using a nonlinear regression of data obtained from the cellular viability tests with GraphPad Prism 5.0 software. The average accumulated precipitation (mm) in the study region was calculated using available data²⁷.

Results and discussion

Leaf exudate chemical profile

The total phenolic and aloin content of LE from the aloe vera leaves varied based on the season during which the samples were collected. The highest levels were found in the samples taken during the summer and the lowest levels from the spring

samples (P<0.05). The accumulation of total phenolics in the summer LE seems to be associated with the climatic conditions during the collection period (Figure 1a, b). Precipitation indices were lower during the summer months (January to March)²⁷ (Figure 1a), possibly causing hydric stress in the plants. In the spring, the lower total phenolic content of LE coincides with a period of greatest precipitation that year. Aloe is a plant comprised of 96% water; thus, its chemical composition is heavily influenced by precipitation levels²⁸, as well as other factors, such as the period of flowering²⁹.

The husk of *Aloe* leaves has greater levels of total phenolics compared to the leaf interior and internal parenchyma. In the literature, these values range from 12.06 to 20.86 μ g GAE/mg leaf, depending on the species¹⁴. Among the various phenolic compounds in the leaves of *Aloe*, anthraquinones are noteworthy, particularly aloin. Anthraquinones are free in phloem vessels directly below the leaf epidermis, and aloin, in particular, is distributed throughout the plant as part of its defense mechanism³⁰. In the present study, we found the highest levels of aloin in the summer samples and the lowest in the spring samples (Figure 1 b, c). These results are correlated with the total phenolic content found in the studied samples (Figure 1). Previous studies have also suggested the effect of seasonality on aloin content, and its synthesis is strongly influenced by precipitation levels. Dry periods have been correlated with greater content of aloin in the analysis of aloe vera leaves^{15,31,32}. However, other factors can influence aloin content of aloe vera leaves, including cultivation conditions, age, and plant health³³. For example, higher levels of barbaloin, isobarbaloin, and aloin in *Aloe* sp. plants were found during periods of the year with higher temperatures³².

Antimicrobial activity

Despite significant differences in the levels of total phenolics and aloin in the LE samples (Figure 1b, c), these levels did not influence antimicrobial activity against *S. aureus*. For all LE samples, the MIC was 1,000 μ g/ml, as confirmed by resazurin oxidation. The lowest tested concentration of 500 μ g/ml was incapable of reducing bacterial growth to values greater than 80%. The effect of other concentrations between 500 and 1,000 μ g/ml was not included in the study (Figure 2).

The effectiveness of LE from aloe vera leaves as an antimicrobial agent has been demonstrated for a wide variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *S. aureus* and others^{34,35}. In the literature, the MIC of aloe vera extracts against *S. aureus* varies. Previous studies have shown lower (195 μ g/ml), similar (1560 μ g/ml), and higher (5,000 μ g/ml) MIC values compared to those in the present study³⁶⁻³⁸. This variation may be related to diverse factors, such as the *Aloe* species studied, the part of the aloe leaf used in the tests, and the type of extraction and resuspension vehicle used. In the current study, the LE samples were collected directly from the cut leaf without any type of posterior extraction of the compounds of interest. Some solvents are capable of extracting certain compounds that may possess greater antimicrobial activity than others³⁹; however, resuspension in water may be the easiest way to use aloe vera leaf subproducts, making it accessible, even to the producer.

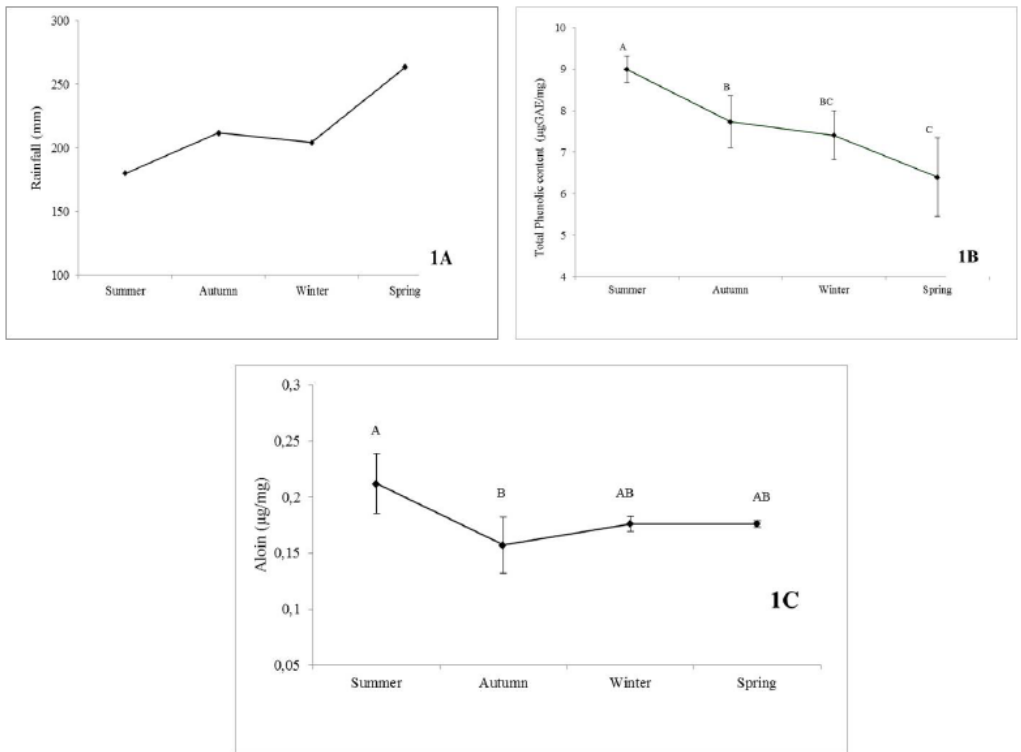


Figure 1. Seasonal differences in rainfall, phenolic content and aloin content. (A) Average accumulated precipitation (mm) in the study region (Paulo Lopes, SC, Brazil) during 2015; Source: INMET²⁶. (B) Total phenolic content (µg GAE/mg) of Aloe vera leaf LE from different seasons of the year (average of five repetitions \pm SD) ($P < 0.05$). (C) Average content (µg/mg) of aloin (average of three independent injections \pm SD) in samples of LE collected from Aloe vera leaves during different seasons of the year. Data points with the same letter above them are not significantly different from each other ($P < 0.05$ indicates a significant difference).

An interesting aspect to consider in the present study is that the concentration of total phenolics and aloin in the LE samples does not seem to affect antimicrobial activity. By contrast³⁶, the antimicrobial and anti-inflammatory activity of aloe vera LE has been associated with the concentration of phenolic and aloin compounds, suggesting that older leaves have higher levels of these compounds, and as such, have greater biological activity and defense against microorganisms and herbivores.

For Fabry *et al.*⁴⁰, the potentially useful activity defined for crude plant extracts with organic solvents is considered good when MIC values are < 8000 µg/ml, while Gibbons⁴¹ suggests that phytochemical isolates must have MIC values $< 1,000$ µg/ml. As such, the antimicrobial action of the LE samples in the present study can be considered good, even though neither extraction nor isolation of the principal components took place.

Cytotoxicity of leaf exudate

The LE showed high toxicity to MAC-T lineage cells, causing significant reduction in cellular viability at concentrations greater than 7.8 µg/ml (Figure 3). At higher concentrations, such as 500 µg/ml, the reduction in the percentage of viable cells was greater than 80%. The IC_{50} was 91.89 µg/ml. It is worth noting that the MIC of *S. aureus* growth was 1,000 µg/ml (Figure 2), a concentration that had a strong effect on the viability of mammary epithelial cells (Figure 3). This result is significant because it suggests that caution must be exercised when considering the intramammary use of LE in order to avoid inflammation, owing to the death of epithelial cells.

In an *in vivo* situation, the administration of a toxic product to bovine mammary glands can result in the development of inflammation⁴², which is more severe than that caused by the

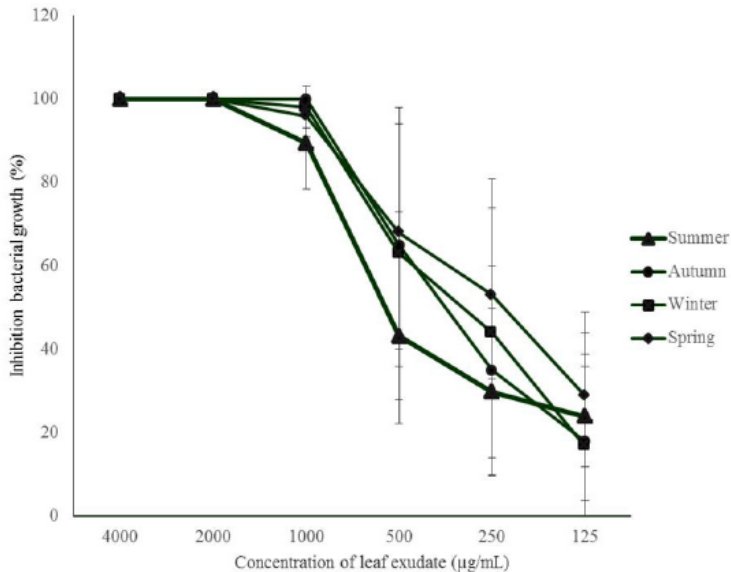


Figure 2. Percentage of inhibition (mean \pm SD) of the standard strain of *S. aureus* ATCC (25923) and seven strains of mastitic milk isolates by different concentrations of LE samples taken during different seasons of 2015.

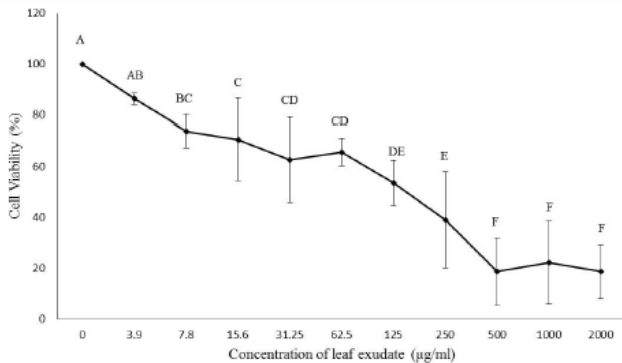


Figure 3. Percent of cellular viability (mean \pm SD) of the MAC-T lineage after exposure to different concentrations of LE samples in the summer of 2015. Data shown are an average of three independent experiments. Data points with the same letter above them are not significantly different from each other ($P < 0.05$ indicates a significant difference).

infection of pathogens⁴². In these cases, the attempt to combat inflammation leads to the formation of connective tissue at the affected site, which can diminish the alveolar area responsible for the synthesis of milk and, consequently, reduce milk production. In more severe cases, the loss of complete mammary glandular function, or even death of the animal, can occur^{43,44}.

The MAC-T cellular lineage⁴⁵ is an established model that has been frequently used in the investigation of mammary glandular functions and mediators of inflammatory processes⁴⁶.

Nonetheless, studies reporting on the effects of *Aloe* sp. extract, or fractions on this type of cell, are scarce. The toxic effects of aloe vera LE on other types of cells are discussed in the literature and have been associated with the presence of aloin and aloe emodin⁴⁷. These anthraquinones induce the apoptosis of cells caused by a reduction in the proportion of cells in the mitotic phase⁴⁸. Another hypothesis is that disruptions to the cell cycle and cellular differentiation, stimulation of the immune system, and antioxidant activity also have an anti-proliferative effect⁴⁹.

While the results found for MAC-T cells show that aloe vera LE has a high toxic potential for bovine mammary glands, the topical use of this product on the external area of the udder, for example pre- and post-dipping, or on instruments used during the management of milking, can be recommended. In this case, its potential as a disinfectant should be investigated.

Furthermore, it is important to highlight that the compounds present in the *Aloe vera* LE liquid oxidize easily in the presence of light, oxygen, and at room temperature⁵⁰. As such, very high concentrations are required in order to achieve antimicrobial efficacy against *S. aureus*, concentrations that would be toxic to mammary epithelial cells. Thus, we suggest the standardization of a methodology that can preserve and conserve these oxidative compounds, such as nanoencapsulation, which can maintain the desired antimicrobial activity and diminish the toxic effects.

Dataset 1. Raw data concerning the phytochemical characteristics of leaf exudate and its antimicrobial/cytotoxicity activity

<http://dx.doi.org/10.5256/f1000research.15671.d213901>

Conclusion

Although seasonality interferes with the chemical composition of aloe vera LE, the seasonal samples we evaluated did not

differ in relation to antimicrobial activity with a MIC of 1,000 µg/ml found for all samples. At this concentration, aloe vera LE shows strong toxic effects on bovine mammary epithelial cells of the MAC-T lineage. Despite the demonstrated antimicrobial activity of aloe vera LE, we suggest caution in recommending its intramammary use to treat bovine mastitis; instead, the topical use of this product on an external area, such as the udder, may be both efficacious and safe.

Data availability

Dataset 1. Raw data concerning the phytochemical characteristics of leaf exudate and its antimicrobial/cytotoxicity activity.
DOI: <https://doi.org/10.5256/f1000research.15671.d213901>.

Competing interests

No competing interests were disclosed.

Grant information

This work was supported by the CNPq (National Council on Scientific and Technological Development; Brasilia, Brazil) (403415/2013-6, Edital 39/2013).

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Bradley A: Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J*. 2002; **164**(2): 116–128. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Watts JL: Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol*. 1988; **16**(1): 41–66. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Anderson KL, Azizoglu RO: Detection and Causes of Bovine Mastitis with Emphasis on *Staphylococcus aureus*. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. Elsevier Ltd.; 2014; **2**: 435–440. [Publisher Full Text](#)
- Mushtaq S, Shah AM, Shah A, et al.: Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microb Pathog*. 2018; **114**: 357–361. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Fiordalisi SAL, Honorato LA, Loiko MR, et al.: The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. *J Dairy Sci*. 2016; **99**(3): 2308–2318. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Barlow J: Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011; **16**(4): 383–407. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Collado R, Prenafteta A, González-González L, et al.: Probing vaccine antigens against bovine mastitis caused by *Streptococcus uberis*. *Vaccine*. 2016; **34**(33): 3848–3854. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Basso KM, Bracarense APFRL: Explantes teciduais: Um modelo redescoberto na experimentação animal. *Semin Agrar*. 2013; **34**(6Sup2): 3951–3958. [Publisher Full Text](#)
- De Medeiros ES, Veiga M, Wilton J, et al.: Avaliação *In vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus spp.* isoladas de mastite bovina. *Pesq Vet Bras*. 2009; **29**(1): 71–75. [Publisher Full Text](#)
- Diaz MAN, Rossi CC, Mendonça VR, et al.: Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Rev Bras Farmacogn*. 2010; **20**(5): 724–728. [Publisher Full Text](#)
- Rabot A, Wellnitz O, Meyer HH, et al.: Use and relevance of a bovine mammary gland explant model to study infection responses in bovine mammary tissue. *J Dairy Res*. 2007; **74**(1): 93–99. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Boudjellab N, Chan-Tang HS, Zhao X: Bovine interleukin-1 expression by cultured mammary epithelial cells (MAC-T) and its involvement in the release of MAC-T derived interleukin-8. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2000; **127**(2): 191–199. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Wang K, Jin XL, Liu J, et al.: Potential of dietary propolis in protecting bovine mammary epithelial cells against mastitis pathogens using *In vitro* models. *J Nutr Intermed Metab*. 2016; **4**: 39. [Publisher Full Text](#)
- Lucini L, Pellizzoni M, Pellegrino R, et al.: Phytochemical constituents and *In vitro* radical scavenging activity of different *Aloe* species. *Food Chem*. 2013; **170**: 501–507. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Rodríguez-González VM, Femenia A, González-Laredo RF, et al.: Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Millier. *Carbohydr Polym*. 2011; **86**(4): 1675–1683. [Publisher Full Text](#)
- Ray A, Gupta SD, Ghosh S: Evaluation of anti-oxidative activity and UV absorption potential of the extracts of *Aloe vera* L. gel from different growth periods of plants. *Ind Crops Prod*. 2013; **49**: 712–719. [Publisher Full Text](#)
- Sánchez-Machado NI, López-Cervantes J, Sendón R, et al.: *Aloe vera*: Ancient knowledge with new frontiers. *Trends Food Sci Technol*. 2017; **61**: 94–102. [Publisher Full Text](#)
- Fanali S, Aturki Z, D'Orazio G, et al.: Analysis of Aloe-based phytotherapeutic

- products by using nano-LC-MS. *J Sep Sci*. 2010; **33**(17–18): 2663–2670.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
19. Chinchilla N, Carrera C, Durán AG, et al.: *Aloe barbadensis*: How a miraculous plant becomes reality. *Phytochem Rev*. 2013; **12**(4): 581–602.
[Publisher Full Text](#)
 20. Hamman JH: Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. *Molecules*. 2008; **13**(8): 1599–1616.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 21. Duval J, Pecher V, Poujol M, et al.: Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Ind Crops Prod*. 2016; **94**: 812–833.
[Publisher Full Text](#)
 22. Mandrioli R, Mercolini L, Ferranti A, et al.: Determination of aloe emodin in *Aloe vera* extracts and commercial formulations by HPLC with tandem UV absorption and fluorescence detection. *Food Chem*. 2011; **126**(1): 387–393.
[Publisher Full Text](#)
 23. CLSI: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. Approved Standard-Tenth Edition. CLSI document M07-A10. 2015; **35**(2): 1–87.
[Reference Source](#)
 24. CLSI: *Abbreviated Identification of Bacteria and Yeast: Approved Guideline*. CLSI document M35A. 2002; **22**(18): 1–19.
[Reference Source](#)
 25. Bauer J, Siala W, Tulkens PM, et al.: A combined pharmacodynamic quantitative and qualitative model reveals the potent activity of daptomycin and delafloxacin against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; **57**(6): 2726–2737.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 26. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; **65**(1–2): 55–63.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 27. INMET-Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: Acesso em: janeiro de 2017.
[Reference Source](#)
 28. Patel K, Patel DK: Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of hispidulin: A concise report. *J Tradit Complement Med*. 2016; **7**(3): 360–366.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 29. Koshioka (Née Nishimura) M, Koshioka M, Takino Y, et al.: Studies on the evaluation of *Aloe arborescens* Mill. Var. *Natalensis* berger and aloe extract (JP IX). *Pharm Biol*. 1982; **20**(2): 53–59.
[Publisher Full Text](#)
 30. Wintola OA, Afolayan AJ: The foliar anatomy and micromorphology of *Aloe ferox* Mill. (Asphodelaceae). *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2014; **11**(2): 350–357.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
 31. Gutterman Y, Chausser-Volfson E: Peripheral defence strategy: Variation of barbaloin content in the succulent leaf parts of *Aloe arborescens* Miller (Liliaceae). *Bot J Linn Soc*. 2000; **132**(4): 385–395.
[Publisher Full Text](#)
 32. Beppu H, Kawai K, Shimpo K, et al.: Studies on the components of *Aloe arborescens* from Japan - Monthly variation and differences due to part and position of the leaf. *Biochem Syst Ecol*. 2004; **32**(9): 783–795.
[Publisher Full Text](#)
 33. Azaroual L, Liazid A, Barbero GF, et al.: Improved Chromatographic Methods for Determination of Bioactive Compounds from *Aloe vera* Leaves. *ISRN Chromatogr*. 2012; 609095, 7.
[Publisher Full Text](#)
 34. Habeeb F, Shakir E, Bradbury F, et al.: Screening methods used to determine the anti-microbial properties of *Aloe vera* inner gel. *Methods*. 2007; **42**(4): 315–320.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 35. Pellizzoni M, Ruzickova G, Kalhotka L, et al.: Antimicrobial activity of different *Aloe barbadensis* Mill. and *Aloe arborescens* Mill. leaf fractions. *J Med Plants Res*. 2012; **6**(10): 1975–1982.
[Reference Source](#)
 36. Ndhiala AR, Amoo SO, Stafford GI, et al.: Antimicrobial, anti-inflammatory and mutagenic investigation of the South African tree aloe (*Aloe barberae*). *J Ethnopharmacol*. 2009; **124**(3): 404–408.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 37. Cardoso FL, Murakami C, Mayworm MAS, et al.: Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. *Brazilian J Pharmacogn*. 2010; **20**(1): 35–40.
[Publisher Full Text](#)
 38. Soyvel OT, Masika PJ: Traditional remedies used for the treatment of cattle wounds and myiasis in Amatola Basin, Eastern Cape Province, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res*. 2009; **76**(4): 393–397.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 39. Amoo SO, Aremu AO, Van Staden J: Unraveling the medicinal potential of South African *Aloe* species. *J Ethnopharmacol*. 2014; **153**(1): 19–41.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 40. Fabry W, Okemo PO, Ansong R: Antibacterial activity of East African medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 1998; **60**(1): 79–84.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 41. Gibbons S: Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Rep*. 2004; **21**(2): 263–277.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 42. Troncarelli MZ, Langoni H, Brandão HM, et al.: Safety of a nanoproplis formulation intended for intramammary treatment of bovine mastitis in organic dairy herds. *Rev Bras Hig e Sanidade Anim*. 2014; **8**(5): 517–45.
[Reference Source](#)
 43. Cunningham BK: *Fisiologia Veterinária*. Elsevier Saunders. 2009; 718.
[Reference Source](#)
 44. Dyce KM, Sack WO, Wensing C/JG: *Tratado de Anatomia Veterinária*. Tratado de Anatomia Veterinária. 2004; 519–522.
 45. Huynh HT, Robitaille G, Turner JD: Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): An *in vitro* model for bovine lactation. *Exp Cell Res*. 1991; **197**(2): 191–9.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 46. Lahouassa H, Moussay E, Rainard P, et al.: Lipopolysaccharides, cytokines, and nitric oxide affect secretion of prostaglandins and leukotrienes by bovine mammary gland during experimentally induced mastitis *In Vivo* and *In Vitro*. *Vet J*. 2014; **77**(1): 90–99.
 47. Coran SA, Barlolucci G, Bambagiotti-Alberti M: Selective determination of aloin in different matrices by HPLC densitometry in fluorescence mode. *J Pharm Biomed Anal*. 2011; **54**(2): 422–425.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 48. Esmat AY, Tomasetto C, Rio MC: Cytotoxicity of a natural anthraquinone (Aloin) against human breast cancer cell lines with and without ErbB-2: topoisomerase Ialpha coamplification. *Cancer Biol Ther*. 2006; **5**(1): 97–103.
[PubMed Abstract](#)
 49. Tomasin R, Gomes-Marcondes MC: Oral administration of *Aloe vera* and honey reduces Walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue. *Phyther Res*. 2011; **25**(4): 619–623.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
 50. Freitas VS, Rodrigues RAF, Gaspi FOG: Propriedades farmacológicas da *Aloe vera* (L.) Burm. f. *Rev Bras Plantas Med*. 2014; **16**(2): 299–307.
[Publisher Full Text](#)
 51. Fioridalisi SdAL, Honorato LA, Kuhnen S: Dataset 1 in: *Aloe barbadensis* Miller leaf exudate is a potential treatment for bovine mastitis. *F1000Research*. 2018. <http://www.doi.org/10.52556/f1000research.15671.d213901>

CAPITULO IV- Efeito da origem geográfica e do método de extração sobre o potencial *in vitro* de extratos de *Achyrocline satureioides* (LAM.) D. C. (“macela”) no controle da mastite bovina.

RESUMO

A macela (*Achyrocline satureioides*) é uma erva medicinal muito utilizada na América do Sul para o tratamento de injúrias digestivas. Seu efeito antimicrobiano contra diversos patógenos, incluindo *Staphylococcus aureus*, também tem sido demonstrado. Diante disto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial *in vitro* de inflorescências de macela no controle da mastite bovina, considerando a sua origem geográfica e o método de extração utilizado. Os perfis fenólicos e flavonoídicos dos extratos hidroalcoólicos e aquosos de macela dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina foram determinados via espectrofotometria UV-Vis e cromatografia líquida de alta eficiência. A atividade antimicrobiana foi avaliada contra *S. aureus* através da técnica de microdiluição em caldo. A citotoxicidade e indução de apoptose em células epiteliais mamárias bovinas da linhagem MAC-T foram avaliadas através dos métodos de MTT e reação com corante Anexina/PI, respectivamente. Em relação à caracterização fitoquímica, verificou-se que o método de extração interferiu no conteúdo de fenólicos totais das amostras. Sendo o método de decocção mais eficiente em extrair compostos desta classe, independente da origem geográfica. Similarmente, a origem não influenciou na composição química das amostras, sendo o flavonoide quercetina o composto majoritário em todos os extratos avaliados. Quanto à atividade antimicrobiana, a extração hidroalcoólica foi mais eficiente em inibir o crescimento de *S. aureus* nas amostras de SC, o extrato hidroalcoólico apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 250 µg/mL, enquanto o decocto da mesma origem foi 2000 µg/mL. Já ambas amostras do RS mostraram mesma ação inibitória com CIM= 500 µg/mL. Nos ensaios com as células MAC-T foram encontrados valores de IC₅₀s superiores

aos de CIM para todos os extratos. Destacam-se em especial os extratos hidroalcoólicos de RS (IC₅₀= 517,1 µg/mL) e SC (IC₅₀= 541,7 µg/mL), e o decocto do RS (IC₅₀= 2066 µg/mL) que mostraram baixa citotoxicidade às células do úbere, podendo-se sugerir o seu uso intramamário. Na análise da indução da apoptose celular, não houve aumento significativo ($p < 0.05$) na porcentagem de células em apoptose e necróticas após o aumento das concentrações de macela testadas. Portanto, de maneira geral, a macela destacou-se como um produto natural promissor a ser empregado no tratamento da mastite bovina, uma vez que possui elevada atividade antimicrobiana sobre bactérias causadoras de mastite e baixa toxicidade as células da glândula mamária. Além disto, a origem geográfica não interferiu na composição química e nas propriedades biológicas dos extratos. Entretanto, a método de extração é relevante na análise do potencial uso da macela para o controle da mastite bovina.

Palavras-chave: macela, *Achyrocline satureioides*, mastite bovina, *Staphylococcus aureus*, células MAC-T.

1. INTRODUÇÃO

A “Macela” (*Achyrocline satureioides*) é uma erva aromática anual, nativa da América do Sul, amplamente utilizada na medicina tradicional (SPEROTTO et al., 2012; BALDISSERA et al., 2014). No Brasil, é uma das plantas medicinais mais utilizadas, sendo considerada planta medicinal símbolo do estado do Rio Grande do Sul (RUFFA et al., 2002). Até a 2ª edição da Farmacopéia Brasileira (RETTA et al., 2012), esta espécie foi descrita como fitoterápico promissor. Entretanto foi retirada da terceira edição compêndi o mesmo após o lançamento da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pelo Ministério da Saúde em 2006 e o incentivo no sistema público de saúde, pelo uso destas terapêuticas alternativas.

O principal uso dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das inflorescências de macela têm sido para o tratamento de distúrbios digestivos, espasmódicos e em casos de infecções respiratórias superiores. A essa planta tem sido atribuída propriedades hepatoprotetora, analgésica e antioxidante. Além dessas, alguns estudos tem demonstrado que os extratos de

macela tem também ação antimicrobiana (SIMÕES et al., 1988; SABINI et al., 2011, 2013; RIVERA et al., 2012; SPEROTTO et al., 2012; CARIDDI et al., 2015).

No que diz respeito à composição química das inflorescências da macela tem-se encontrado alto conteúdo de compostos fenólicos, sendo a maioria deles da classe dos flavonoides (CAMPAGNOL et al., 2011), aos quais tem se normalmente atribuído as atividades biológicas da planta (POLYDORO et al., 2004).

Os flavonoides constituem a maior classe de compostos dentro do grupo dos fenólicos. Estes estão presentes em várias espécies vegetais e produtos de origem vegetal (SCHROETER et al., 2006), sendo capazes de prevenir danos oxidativos através do sequestro de radicais livres, agindo como quelantes de íons metálicos e inibindo a atividade de várias enzimas oxidativas, entre elas fosfolipase, xantino-oxidase e proteína quinase (ARREDONDO et al., 2004). BEZERRA et al. (2008) sugerem que a coleta das plantas de macela seja realizada no período de floração onde há maior biomassa do componente bioativo. Entretanto, este período de colheita precisa ser melhor investigado, havendo poucos estudos a esse respeito.

Devido às atividades biológicas descritas acima, o uso da macela no controle da mastite bovina foi previamente investigado (MOTA; CARVALHO; WIEST, 2011; RIVERA et al., 2012; SPEROTTO et al., 2012). A elevada atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos aquosos desta planta sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, padronizadas e isoladas de leite mastítico foi encontrada por MOTA; CARVALHO; WIEST (2011), RIVERA et al. (2012) e SPEROTTO et al. (2012). Entretanto, aqueles autores sugeriram a necessidade de se investigar o tempo necessário para inativação das bactérias, assim como a forma de preparo dos extratos. SPEROTTO et al. (2012), por exemplo, não observaram efeito na primeira hora de contato do decocto da planta com os inóculos, porém, encontraram a inativação em 24 horas.

Outra questão a ser considerada, quando se avalia o potencial de um produto para o tratamento da mastite bovina, com a intenção de usá-lo de forma interna, é a avaliação do seu

efeito citotóxico às células da glândula mamária, especialmente as epiteliais. Danos à essas células induzem a formação de tecido conjuntivo que interfere na produção de leite. A administração de produtos antimicrobianos na glândula mamária bovina, sem o conhecimento prévio de seus efeitos tóxicos às células, pode ter efeito pró-inflamatório, agravando o quadro clínico do animal. Deste modo, destaca-se a utilização de modelos *in vitro*, com células ou tecidos da glândula mamária, previamente aos testes *in vivo* (FIORDALISI et al., 2016).

Com células humanas alguns estudos de avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* de extratos de macela estão descritos na literatura, não tendo sido verificados efeitos deletérios sobre os tipos celulares utilizados. Contudo, até o presente momento não foram realizadas investigações de possíveis efeitos citotóxicos da macela sobre células alveolares bovinas visando o seu uso no controle da mastite (ARREDONDO et al., 2004; SABINI et al., 2013). Nesse sentido, são promissores os testes com a linhagem celular MAC-T (Mammary Alveolar Cell), isolada pela primeira vez na década de noventa (HUYNH; ROBITAILLE; TURNER, 1991). Desde então, esta tem sido amplamente utilizada como modelo em estudos *in vitro* para investigação das funções regulatórias e resposta inflamatória da glândula mamária bovina. Mais recentemente, este tipo celular foi descrito como adequado para avaliação da citotoxicidade de produtos naturais com potencial ação no tratamento da mastite bovina (WANG et al., 2016a).

Levando em consideração o potencial antimicrobiano e as evidências de baixa citotoxicidade da macela, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do decocto e de extratos hidroalcoólicos de inflorescências de macela de diferentes origens geográficas contra bactérias *S. aureus*, bem como determinar seu efeito sobre a viabilidade e indução da apoptose em células epiteliais mamárias bovina da linhagem MAC-T.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e Extração de macela

Amostras de macela (*Achyrocline satureoides*) foram obtidas no município de Bom Retiro (SC) e em Porto Alegre (RS), entre abril e maio de 2015 e 2016. Em Bom Retiro, o pedúnculo floral foi coletado de indivíduos encontrados em um campo natural e identificadas como exemplares desta espécie pela equipe herbário Flor da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR 64101). Depois da retirada dos ramos, os capítulos florais foram secos em estufa com circulação forçada de ar ($<50^{\circ}\text{C}$), por três dias, e posteriormente armazenadas à -20°C . Já as amostras provenientes de Porto Alegre, foram obtidas já separadas dos ramos, em uma feira de produtos agroecológico.

Para a extração dos compostos de interesse foram utilizados dois métodos: um deles consistiu na maceração dos capítulos com etanol 80% (80:20, v/v) e o outro da decocção a partir da adição de 15 mL de H_2O à 0,1 gramas de capítulos florais, por 15 minutos. Os extratos e o decocto foram filtrados a vácuo, secos em centrífuga speed vácuo e armazenados à -80°C . As extrações foram realizadas em triplicatas.

2.2 Caracterização química

2.2.1 Fenólicos Totais

Os conteúdos de fenólicos totais nos extratos de macela foram determinados através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI JR.; ROSSI J A JR., 1965), utilizando-se uma curva padrão de ácido gálico (20 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($y = 0,0076x / r^2 = 0,993$). Para isso, foram adicionados à 45 μL de amostra, 150 μL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:10, v/v) e 120 μL de Na_2CO_3 (7,5%, p/v). Após 30 minutos de incubação ao abrigo da luz, as absorbâncias foram lidas a 765 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em μg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg de amostra (EAG/mg).

2.2.2 Flavonoides

Os teores de flavonoides foram determinados através da reação colorimétrica com cloreto de alumínio, conforme metodologia descrita por POPOVA et al. (2004). Este método baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com flavonoides, acarretando em uma intensificação de suas absorções e em um deslocamento para maiores comprimentos de onda (WOLLENWEBER, 1989). Para realizar a reação, foram adicionados à 43 µL de amostra, 43 µL de $AlCl_3$ (2%, p/v) e 215 µL de EtOH. Após um período de incubação de 30 minutos ao abrigo da luz, foram realizadas as leituras à 425 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em µg de equivalentes de quercetina por mg de amostra (EQ/mg) calculados com o auxílio de uma curva padrão de quercetina (0 a 100 µg/mL) ($y = 0,1316x / R^2 = 0,9772$).

2.3 Atividade Antimicrobiana

Através da técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2015) determinou-se a atividade antimicrobiana dos extratos de macela contra à cepa padrão de *S. aureus* 25923 e 7 isolados de mesma espécie oriundos de amostras de leite mastítico, coletadas no oeste de Santa Catarina, no primeiro semestre de 2016.

Os testes foram realizados em placas de 96 poços, tendo sido adicionado a cada um dos poços 100 µL de caldo BHI (Brain Heart Infusion, Aquimedia®) seguido de 100 µL das diluições seriadas dos extratos de macela (4000 a 125 µg/mL). Posteriormente, 10 µL do inóculo inicialmente padronizado para uma densidade populacional de 1 a 2×10^8 UFC/mL, ajustada através da comparação com a solução padrão McFarland de 0,5, foi acrescentado em cada um dos poço após diluição logarítmica para obtenção de uma densidade de 10^5 UFC/mL. Após 24 h à 37°C, a concentração inibitória mínima (CIM), foi determinada a partir da adição de 50 µL do revelador resazurina (100 µg/mL) em cada um dos poços, seguido da incubação das placas à 37 °C por 30 minutos. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) é um corante azul, redutível a resorufina, substancia de cor

rosa com altíssima fluorescência na presença de respiração aeróbica. Portanto, a presença de cor azul nos poços representa ausência de crescimento e de cor rosa, a presença de crescimento bacteriano. Desse modo, a CIM foi considerada a concentração imediata ao aparecimento da cor rosa.

Além disto, foi realizada, previamente a adição da resazurina, a leitura das absorbâncias dos poços de teste à 600 nm. A partir das leituras das absorbâncias procedeu-se com o cálculo da viabilidade microbiana através da seguinte equação (BONIFÁCIO, 2014):

$$\% \text{ INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO} = [1 - (AC/A0)] \times 100$$

onde:

Ac representa a média das absorbâncias por concentração de substância testada, já subtraída do média das absorbâncias da respectiva concentração sem o inóculo e A0 representa a média das absorbâncias do controle de crescimento microbiano (inóculo sem a substância testada).

Portanto, através desse cálculo, tem-se a porcentagem de células microbianas que a substância testada foi capaz de inibir.

Relaciona-se os resultados da revelação por resazurina com o cálculo da inibição do crescimento microbiano através da presença de coloração azul, após a reação com o corante, como sendo o correspondente a um percentual de inibição maior ou igual a 90%.

2.4 Citotoxicidade

O efeito dos extratos de macela sobre a viabilidade de células MAC-T foi avaliado através do método do MTT (MOSMANN, 1983). Para isso, as células da linhagem MAC-T foram cultivadas em garrafas de cultivo de 25 cm² com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 4 mM de L-glutamina, 4,5 g/L de glicose, 1 mM piruvato de sódio, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 5 µg/mL de insulina e 1 µg/mL de hidrocortisona.

Quando as células atingiam confluência, foram tratadas com 0,25% de tripsina com 1 mM de EDTA, contadas em câmara de Neubauer e transferidas para microplacas de 96 poços (100µL por poço da suspensão celular a uma densidade de 10^5 células/mL). As células permaneceram em condições de cultivo por 24 h para aderência nas placas e após este período, o meio de cultura foi substituído por outro contendo as diferentes concentrações dos extratos de macela (2000 a 62,5 µg/mL).

Após 24 h de incubação, o meio foi removido e os poços lavados duas vezes com PBS (100 µL/poço). O MTT dissolvido em meio (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil; 0,5 mg/mL) foi adicionado e as placas novamente incubadas por cerca de 2 horas. Posteriormente, a absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de microplacas à 546 nm (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc) e considerada diretamente proporcional ao número de células viáveis. A absorbância do controle (i.e. meio fresco sem o extrato) foi considerado como 100% de células viáveis. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5 Análise da indução da apoptose celular

As células MAC-T foram avaliadas quanto à presença de necrose e apoptose, após o tratamento com diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de macela (250, 1000 e 2000 µg/mL). O ensaio foi realizado marcando-se as células MAC-T com anexina V-FITC e PI e analisando-as para apoptose e necrose por citometria de fluxo de acordo com o protocolo do fabricante (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). As células permaneceram incubadas com diferentes concentrações do extrato de macela por 24 h. Após este período, procedeu-se com a tripsinização e marcação com anexina V e iodeto de propídio (PI). Células apoptóticas foram identificadas usando um citômetro fluxo BD FACSCalibur e contadas nos quadrantes superior e inferior direito, somando-se as porcentagens de células apoptóticas precoces (anexina V positiva) e tardias (anexina V- e PI-positivas). As células normais foram contadas no quadrante inferior esquerdo (anexina V- e PI- negativas) e as células necróticas contadas no quadrante superior esquerdo (PI positivas).

2.6 Análise Estatística

O conteúdo de fenólicos totais e flavonoides presentes nas preparações de macela, assim como a porcentagem de inibição da atividade microbiana, a viabilidade celular e a porcentagem de morte celular foram analisadas por estatística descritiva expressas em média +/- desvio padrão da média, seguidas da análise de variância e análise de regressão dentro dos tratamentos. Entre os tratamentos foi realizada a análise de variância, com ajustamento para Tukey. Os efeitos foram considerados estatisticamente significativos para valores de $P < 0,05$. As concentrações inibitórias capazes de reduzir a viabilidade celular em 50% (IC50) foram calculadas a partir de uma regressão não linear dos dados obtidos no ensaio de viabilidade celular. A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram testadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fenólicos e Flavonoides Totais

Os conteúdos de fenólicos e flavonoides totais não diferiram quanto à origem geográfica das amostras. Entretanto, os conteúdos de compostos fenólicos foram maiores nas amostras submetidas à decocção (Figura 6).

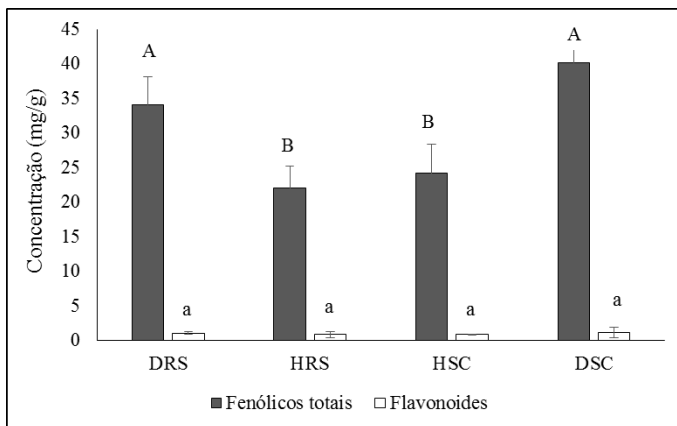


Figura 2. Conteúdo* de fenólicos (μg EAG/ mg) totais nos extratos de macela coletados em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, de acordo com o método de extração empregado ($P < 0,05$). *(média \pm desvio padrão). As letras diferentes representam diferenças estatística entre os extratos para uma mesma classe de compostos analisada.

A temperatura no processo de extração tem sido apontada por alguns autores como uma variável determinante para o incremento de compostos de fenólicos em extratos de macela (TABARAKI et al., 2012; GUERRA et al., 2016). Corroborando com nossos resultados, onde a decocção realizada a 100 °C resultou em extratos com maior concentração destes compostos quando comparados à extração hidroalcolólica. Isto ocorre porque o calor torna a parede celular mais permeável, aumentando a solubilidade dos compostos e a difusão do solvente (TABARAKI et al., 2012).

Os valores encontrados no presente estudo estão de acordo com os encontrados por (ABREU, 2013) que encontrou 30 μg de EAG/mg de extrato em infusões de macela coletada no Rio Grande do Sul. Já LIMA (2013) encontrou conteúdos de fenólicos próximos a 100 μg de EAG/mg de extrato para amostras de macela coletadas no estado de São Paulo. Estes resultados corroboram com o efeito da origem geográfica sobre o acúmulo destes compostos na planta. Os extratos das inflorescências da macela têm sido reconhecidos pelo alto conteúdo de compostos fenólicos, sendo a maioria deles, segundo alguns autores, da classe dos flavonoides (CAMPAGNOL et al.,

2011). Nossos resultados demonstraram uma baixa concentração destes compostos quando comparados aos valores de fenólicos totais, a qual representou cerca de 3% do conteúdo total, não alterada pelo método de extração ou origem. De maneira semelhante BOEIRA et al., (2018) verificaram um baixo percentual de flavonoides em relação ao conteúdo de fenólicos totais (em torno de 5%) após diferentes métodos de extração de amostras de macela. Além disto, os autores também não encontraram variação significativa nos conteúdos desta classe de compostos embora os tratamentos tenham interferido nas concentrações de fenólicos totais. Em termos de perfil químico, diferentes estudos têm mostrado que quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina são os principais flavonoides nas inflorescências da macela, podendo ser também encontrado ácido cafeico, clorogênico e isoclorogênico, como os principais ácidos fenólicos (POLYDORO et al., 2004; JORAY; PALACIOS; CARPINELLA, 2013).

3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A partir da análise via cromatografia líquida de alta eficiência foi possível determinar os conteúdos dos flavonoides quercetina, luteolina e 3- θ -metilquercetina. A representação gráfica das concentrações de tais compostos pode ser observada na figura 7.

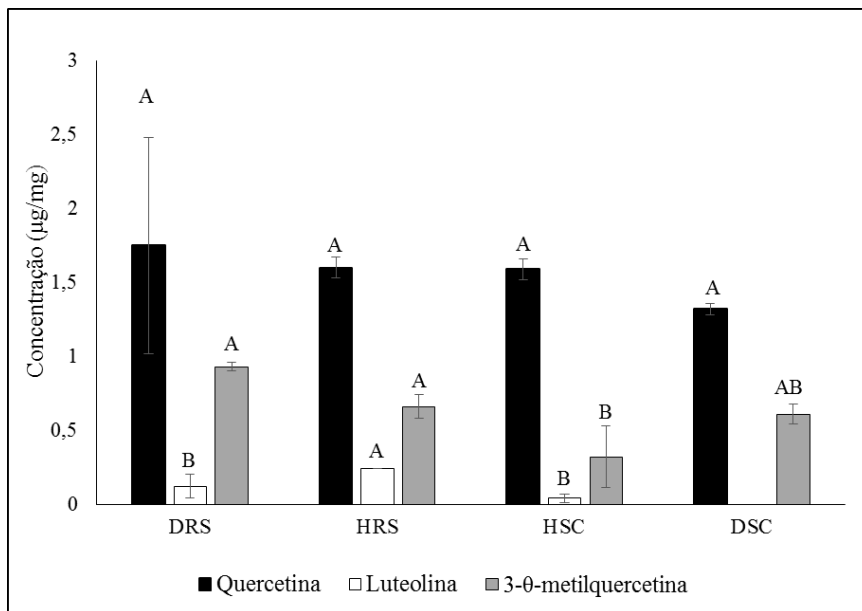


Figura 3. Concentração ($\mu\text{g} / \text{mg}$) de quercetina, luteolina e 3- θ - metilquercetina nos extratos de macela coletados em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, de acordo com o método de extração empregado ($P < 0,05$). *(média \pm desvio padrão). As letras diferentes representam diferenças na concentração de um mesmo composto em relação ao método de extração e origem.

todos os extratos analisados, não apresentaram conteúdo independente da origem ou método de extração. Contudo, a origem e o método de extração influenciaram na presença e no conteúdo dos demais compostos identificados. A amostra coletada no RS apresentou maiores teores de 3- θ -metilquercetina e luteolina. Na amostra de SC, as quantidades deste último composto foram bastante discretas no extrato hidroalcoólico, não sendo detectado no perfil cromatográfico do extrato aquoso das inflorescências catarinenses. Muito possivelmente, os conteúdos destes flavonoides são mais significativos nos extratos que empregam etanol como solvente de extração devido à polaridade e afinidade molecular entre o solvente e o soluto em questão (SIMÕES et al., 1988; RIVERA et al., 2004; GOLTZ et al., 2018).

Já aos extratos aquosos de macela relacionam-se suas propriedades terapêuticas com a presença majoritária de quercetina e ácido caféico (VARGAS et al., 1990). Embora não tenha sido quantificado, a presença de um ácido fenólico como composto principal de extratos aquosos de macela podem explicar nossos resultados apresentarem um teor maior de fenólicos totais nos decoctos de macela quando comparados aos extratos hidroalcoólico desta planta.

Além disto, a macela, por ser uma planta de ampla disseminação pela América do sul é adaptável a diferentes ecossistemas. Há relatos na literatura que o habitat de onde são coletadas as plantas confere às plantas diferenças fitoquímicas e edáficas relacionadas ao seu local de origem (FERRARO et al., 2008). Todavia, a quercetina é comumente descrita como composto em maior conteúdo em extratos de macela independente do método de extração ou da origem geográfica (ARREDONDO et al., 2004; RIVERA et al., 2012; SABINI et al., 2013; SOUZA et al., 2013; CARIDDI et al., 2015; GOLTZ et al., 2018). A este composto são atribuídas muitas das propriedades terapêuticas da macela, uma vez que a quercetina é reconhecidamente eficiente no tratamento de diversas doenças (WANG et al., 2016b).

3.3 Atividade Antimicrobiana

A macela é uma planta tradicionalmente usada no preparo de chás usualmente indicados no tratamento de problemas digestivos e inflamatórios (FACHINETTO et al., 2007). Contudo, alguns estudos tem mostrado que essa planta também possui efeito antimicrobiano (SPEROTTO et al., 2012). Na tabela 6 estão apresentados os resultados da atividade antimicrobiana, de diferentes concentrações das preparações da macela, de diferentes origens, sobre o crescimento de *S. aureus*.

Tabela 6. Percentual de inibição* (%) da cepa padrão de *S. aureus* ATCC (25923) e de sete isolados de leite mastítico frente às diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos hidroalcoólicos

e decoctos de Macela oriundos dos estados de Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	DRS	HRS	HSC	DSC
4000	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}
2000	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}
1000	99 \pm 5 _{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	77 \pm 26 ^{Bab}
500	82 \pm 19 _{Aab}	97 \pm 15 ^{Aa}	100 ^{Aa}	57 \pm 26 ^{Bbc}
250	65 \pm 18 _{Bbc}	86 \pm 18 ^{Aab}	94 \pm 13 ^{Aa}	39 \pm 17 ^{Cc}
125	49 \pm 18 _{Bc}	63 \pm 31 ^{Ab}	79 \pm 22 ^{Ab}	28 \pm 26 ^{Bc}

*(média \pm desvio padrão). Letras maiúscula diferentes representam diferenças significativas entre as concentrações considerando o mesmo extrato, enquanto as letras minúscula diferentes representam diferenças significativas entre os extratos considerando a mesma concentração ($P < 0,05$).

A despeito dos resultados de fenólicos e flavonoides totais, o método de extração empregado e a origem geográfica interferiram na atividade antimicrobiana das preparações frente ao crescimento de *S. aureus*. Para as amostras do Rio Grande do Sul, a extração com etanol e o decocto não diferiram quanto à concentração inibitória mínima, sendo cerca de 500 $\mu\text{g/mL}$. Já para as amostras de Santa Catarina, a CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$ do extrato hidroalcolico foi bem inferior à do decocto (2000 $\mu\text{g/mL}$).

Em relação à origem geográfica, os extratos hidroalcolicos de SC e do RS mostraram atividade antimicrobiana similar na inibição do crescimento de *S. aureus*. Estes resultados do controle do crescimento bacteriano foram confirmados pelo uso do revelador resazurina (100 $\mu\text{g/mL}$) que indica através da mudança de cor do meio a presença de crescimento bacteriano.

Efeitos controversos quanto à eficácia de extratos de macela frente a bactérias *S. aureus* já foram relatados na

literatura. Estas diferenças tem sido, na maioria das vezes, atribuídas a presença ou ausência de determinados compostos flavonoídicos, bem como a solubilidade destes compostos em determinados solventes e as condições em que os ensaios foram realizados (CUSHNIE; LAMB, 2005; WU et al., 2008). Já JORAY; PALACIOS; CARPINELLA (2013), acreditam que a ação antibacteriana dos extratos de macela deve-se a presença de uma atuação conjunta entre os diversos metabólitos ativos nestas plantas. Estes autores, após avaliarem a atividade antibacteriana isolada e combinada dos três flavonóis majoritários (2-metil-6- θ -desmetilauricepirona, quercetina e 3- θ -metilquercetina) extraídos pós-fracionamento encontraram, para bactérias *S. aureus*, CIMs variando de 160 a 3 vezes superiores para os compostos combinados em comparação aos mesmos isoladamente. Quando os flavonóis foram aplicados em conjunto mesmo em concentrações abaixo da sua CIMs, um efeito sinérgico contra *S. aureus* foi observado. Os autores ainda ressaltam que outros compostos, mesmo que em baixas concentrações, devam contribuir para esta atividade biológica. BOEIRA et al., (2018) também verificaram que mesmo extratos com baixos percentuais de flavonoides em relação aos fenólicos totais possuíam elevada atividade antioxidante e significativa atividade antimicrobiana sobre bactérias *S. aureus*. Corroborando com as evidências apresentadas por JORAY; PALACIOS; CARPINELLA, (2013), SPINELLA (2002) apoia a teoria de que, quando se estuda o mecanismo farmacológico de um produto de origem vegetal, a interações entre os componentes pode explicar suas ações biológicas que são muitas vezes ausentes quando a substância isolada é testada individualmente ou atribuída a apenas uma classe de compostos.

No presente estudo, os resultados fitoquímicos associados a inibição microbiana sugerem que a origem botânica assim como o método de extração tem influência sobre a atividade antimicrobiana da macela frente a bactérias *S. aureus*. Isto porque as diferenças na composição química das amostras se refletem na solubilidade dos compostos majoritários e, por sua vez, na disponibilidade destes em função do solvente e método de extração empregado. A extração aquosa de macela de SC foi

incapaz de liberar na solução o flavonoide luteolina, que se apresenta de forma minoritária em ambas as amostras, ao passo que, esta preparação também apresentou pior eficiência antimicrobiana quando comparadas as do RS.

3.4 Citotoxicidade

Considerando os resultados dos ensaios antimicrobianos procedeu-se com a avaliação do efeito dos mesmos extratos sobre as células da linhagem MAC-T. Para tanto, os diferentes extratos de macela foram submetidos ao ensaio de viabilidade celular do MTT em linhagem de células alveolares mamárias. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Percentual de viabilidade celular em linhagem MAC-T * (%) após exposição à diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos hidroalcoólicos e decoctos de macela coletados nos estados de Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS).

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)					
	2000	1000	500	250	125	62.5
DRS	$53,5 \pm 11,8$ Ad	$66 \pm 13,2$ Acd	$77 \pm 11,6$ Abc	$90 \pm 3,8$ Aab	$95 \pm 4,5$ ^{Aab}	$98,3 \pm 2$ ^{Aa}
HRS	$29 \pm 1,4$ Bd	$37,9 \pm 7,8$ Bcd	$50,9 \pm 10,5$ Bbc	$61 \pm 1,5$ Bab	$80,2 \pm 16$ ^{Aa}	$78,7 \pm 16,6$ ^{Ba}
HSC	$33,6 \pm 2,1$ Bc	$35,4 \pm 1,4$ Bc	$49 \pm 4,4$ ^{Bbc}	$60,7 \pm 8,3$ Bb	$83,6 \pm 14,3$ ^{Aa}	$88,8 \pm 10,6$ ^{Aba}
DSC	$45,1 \pm 6$ ABc	$72,3 \pm 6$ Ab	$83,8 \pm 9,4$ Aab	$91 \pm 4,7$ Aab	$96,7 \pm 2,9$ Aa	$99,3 \pm 1,1$ ^{Aa}

*(média \pm desvio padrão). As letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatística entre os extratos de diferentes origens, dentro de uma mesma concentração, enquanto as letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre as concentrações dentro do mesmo extrato.

De maneira geral, os extratos hidroalcoólicos foram mais citotóxicos as células MAC-T que o decocto. Enquanto para o extrato hidroalcoólico uma redução de 50% da viabilidade

celular foi encontrada a partir de 500 ug/mL, para o decocto isso só ocorreu a partir de 2000 ug/mL. De fato, ao calcularmos o IC50, através de uma análise de regressão não linear verificamos que os decoctos foram cerca de quatro vezes menos citotóxicos que os extratos hidroalcoólicos (Tabela 8). Para WU et al. (2008), o solvente de extração tem relação direta sobre os compostos que estão sendo liberados na preparação, sendo os solventes orgânicos mais eficazes na extração do que a água.

Tabela 8. Concentração Inibitória ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos, hidroalcoólico e decocto de macela de RS e SC, capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular em linhagem de células epiteliais mamária bovina da linhagem MAC-T.

IC50 ($\mu\text{g/mL}$)			
DRS	HRS	HSC	DSC
2066 \pm 31,89	517,1 \pm 11,47	541,7 \pm 9,92	1940 \pm 25,56

Relacionando os resultados de IC50 dos extratos de macela com os resultados antimicrobianos das mesmas preparações fica evidenciado o quão promissor esta espécie é para o tratamento da mastite bovina. Para todos os extratos avaliados, a CIM foi inferior aos valores da IC50, garantindo maior segurança na indicação intramamária destes produtos. Cabe ainda destacar os resultados encontrados para os decocto do RS, que apresentou CIM cerca de 10 vezes inferior a sua IC50. Além disto, a decocção é o método mais usual e simples de preparação de extratos de macela, podendo ser facilmente produzido na propriedade rural sem a necessidade de técnicas sofisticadas. Estudos de citotoxicidade de macela têm mostrado que os extratos aquosos possuem baixa toxicidade em linhagens celulares de macacos e humanas, não sendo encontrados efeitos genotóxicos ou indução de apoptose (SABINI et al., 2011, 2013). ARREDONDO et al. (2004), relataram, inclusive, o efeito

citoprotetor de infusões de macela sobre células PC12. Surpreendentemente, esses efeitos foram observados com infusões preparadas de acordo com o uso tradicional. Testando isoladamente os flavonoides livres, a quercetina e luteolina, que estão presentes na macela, os autores notaram que estes compostos não possuíam ação citoprotetora. Deste modo, levantaram a hipótese de que as agliconas (glicosídeos de flavonoides) poderiam ser os principais componentes responsáveis pela atividade citoprotetora da macela.

Os mecanismos envolvidos na citoproteção exercida pelos derivados da macela ainda não estão estabelecidos. Todavia, esta não é a única atividade biológica atribuída aos compostos presentes nessa espécie, tendo sido já relatados efeitos em várias etapas de sinalização intracelular, capacidade de prevenir a morte celular após estresse oxidativo e seus efeitos sobre a função mitocondrial (CASADESUS; SHUKITT-HALE; JOSEPH, 2002). BALDISSERA et al. (2014) acreditam que as propriedades antioxidantes e citoprotetoras da macela poderiam ser utilizadas para no tratamento de doenças, particularmente ajudando a reduzir os efeitos tóxicos da quimioterapia e modulando o estresse oxidativo, já bem descritos para esta doença.

Por outro lado e apesar de todos os registros já mencionados, o efeito citotóxico da macela foi descrito por POLYDORO et al. (2004). Neste estudo, os autores compararam as propriedades antioxidantes de cinco diferentes extratos de macela. Todos os extratos apresentaram potencial antioxidante significativo e a citotoxicidade das amostras foi determinada em cultura de células de Sertoli. As amostras com maior concentração de flavonoides se mostraram altamente tóxicas na maioria das concentrações testadas. Estes extratos induziram um aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica naquele tipo celular. Os autores sugeriram que extratos de macela com concentrações elevadas de flavonoides possuem maior ação antioxidante, entretanto, nem sempre podem produzir efeito protetor às células.

Portanto, no presente estudo, pode-se sugerir que o decocto de macela utilizados nos ensaios deve possuir uma mistura de flavonoides e seus derivados, além de outros compostos fenólicos que em sinergismo podem contribuir para

uma atividade citoprotetora em células MAC-T de glândula mamária bovina. Estas descobertas abrem possibilidade de novas estratégias terapêuticas em patologias associadas ao estresse oxidativo induzido os danos celulares como é o caso da mastite bovina.

Além disto, é possível afirmar que os extratos hidroalcoólicos de macela do RS e SC, e o decocto do RS se mostraram bastante promissores para o controle da mastite bovina, por ter efetivo efeito antimicrobiano frente a bactérias *S. aureus* causadoras desta enfermidade e baixa toxicidade às células epiteliais da glândula mamária. Os valores de IC50s destes extratos são superiores a concentração mínima inibitória (CIM) dos mesmos. Nossos achados mostram a importância da avaliação de produtos com comprovada ação antimicrobiana sobre a viabilidade das células da glândula mamária antes de se propor o seu uso interno.

3.5 Indução da apoptose em células MAC-T

Tão importante quanto o efeito tóxico dos extratos de macela sobre as células da glândula mamária bovina é a determinação do potencial dano que as amostras estudadas causam nas células em questão. Deste modo, submeteu-se as células MAC-T ao ensaio de indução de apoptose celular, através da exposição destas células a diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de SC. Esta amostra foi escolhida para o teste por ser considerada a mais promissora no controle da mastite bovina causada por bactérias *S. aureus*, isto porque este extrato foi o mais eficiente em inibir o crescimento destas bactérias e ao mesmo tempo não causou toxicidade exacerbada às células da glândula mamária.

Os resultados do ensaio de indução da apoptose celular podem ser observados na figura 8.

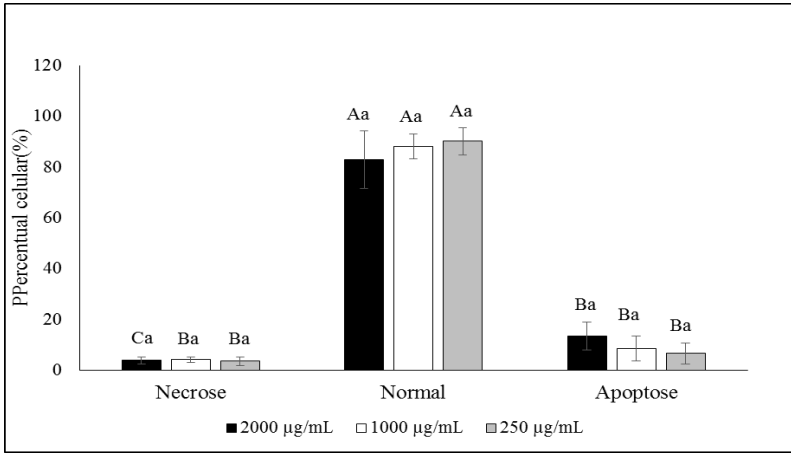


Figura 4. Média de nove réplicas distribuídas em três experimentos independentes \pm DP do percentual de células em necrose, apoptose e sem alteração após 24h de tratamento com 250, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de hidroalcoólico de macela de Santa Catarina. Letras maiúsculas representam diferenças no percentual de uma mesma alteração celular em diferentes concentrações testadas; letras minúsculas indicam diferenças significativas no percentual de alterações celulares distintas para uma mesma concentração testada ($P < 0,05$).

estado normal. É possível observar uma tendência ao aumento da indução da apoptose com o aumento da concentração testada, entretanto, não foi significativo.

O efeito citoprotetor de extratos de *A. saturoioides* já foi descrito anteriormente, após observações *in vivo* e *in vitro*, sendo relacionada esta propriedade aos mecanismos antiapoptóticos (ARREDONDO et al., 2004; SABINI et al., 2013). A este efeito citoprotetor também podem ser atribuídas as propriedades analgésicas, relaxantes e atividade antiespasmódico da macela (LORENZI; MATOS, 2002) De acordo com SABINI et al. (2013) extratos hidroalcoólicos de macela não foram capazes de induzir apoptose celular em linhagem Vero, célula modificada utilizada para produção de vacina, não sendo observada fragmentação do DNA.

Por outro lado, SOUZA et al. (2018), testando o efeito de flavonoides isolados (quercetina, luteolina e 3-*O*-metilquercetina) e os extratos de *A. saturoioides*, perceberam que as frações de flavonoides reduziram a proliferação e a sobrevivência clonogênica, além de induziu apoptose de linhagem de glioma cerebral. Os flavonoides de *A. saturoioides* potencializaram o efeito citotóxico e indução de apoptose pela temozolomida quimioterápica (TMZ). Peculiarmente, os flavonoides de macela foram menos citotóxicos para astrócitos e neurônios normais quando comparados aos gliomas.

A atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de macela de SC associada à baixa toxicidade e a manutenção da integridade celular mesmo em altas concentrações sugerem que há um sinergismo entre os compostos desta amostra, possivelmente se trata de um extrato seguro para indicação e administração interna na glândula mamária.

4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados indicaram o potencial uso de extratos hidroalcoólicos de macela de SC e RS, além do extrato aquoso do RS no controle da mastite bovina. Estas amostras apresentaram eficácia antimicrobiana contra *S. aureus* ao mesmo tempo que mostraram baixa toxicidade as células epiteliais de glândula mamária bovina. Estes efeitos provavelmente estão relacionados ao sinergismo de compostos fenólicos, flavonóides e derivados de flavonoides presentes nas plantas de macela.

5. REFERENCIAS

ABREU, L. De. **Estudo do poder antioxidante em infusões de ervas utilizadas como chás**. 2013. 88f - Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Maria. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Santa Maria-RS. 2013.

ARREDONDO, M. F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MORQUIO, A.; FERREIRA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; LAFON, L.; DAJAS, F. Cytoprotection by Achyrocline satureioides (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 13–20, 2004.

BALDISSERA, M. D.; OLIVEIRA, C. B.; RECH, V. C.; REZER, J. F. P.; SAGRILLO, M. R.; ALVES, M. P.; DA SILVA, A. P. T.; LEAL, D. B. R.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; DA SILVA, A. S.; MENDES, R. E.; MONTEIRO, S. G. Treatment with essential oil of Achyrocline satureioides in rats infected with Trypanosoma evansi: Relationship between protective effect and tissue damage. **Pathology Research and Practice**, v. 210, n. 12, p. 1068–1074, 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2014.06.008>.

BEZERRA, A. M. E.; MEDEIROS FILHO, S.; OLIVEIRA, L. D. M. De; SILVEIRA, E. R. Produção e composição química da macela em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 26–29, 2008.

BONIFÁCIO, B. V. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroetanólicos de Astronium sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados**. 2014. 140 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2014.

CAMPAGNOL, P. C. B.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N.; SANTOS, B. A. dos; FURTADO, A. S.; TONETO, E. R. L.; CAMPOS, R. M. L. De. The influence of achyrocline satureioides (“Marcela”) extract on the lipid oxidation of salami. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n.1, 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612011000100013>.

CARIDDI, L. N.; SABINI, M. C.; ESCOBAR, F. M.; BACCHETTI, R.; MONTIRONI, I.; MERCKIS, C.; REINOSO, E. B.; NÚÑEZ MONTOYA, S.; ZANON, S. M.; COMINI, L. R.;

SABINI, L. I. In Vitro and In Vivo Cytogenotoxic Effects of Hot Aqueous Extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **BioMed Research International**, v. 2015. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/270973>.

CASADESUS, G.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Qualitative versus quantitative caloric intake: Are they equivalent paths to successful aging? **Neurobiology of Aging**, v. 23, n.5, p. 747-649. 2002.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved standard- tenth edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institut**; 2015.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

FACHINETTO, J. M.; BAGATINI, M. D.; DURIGON, J.; DA SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.1. 2007. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100011>.

FERRARO, G.; ANESINI, C.; OUVINA, A.; RETTA, D.; FILIP, R.; GATTUSO, M.; GATTUSO, S.; HNATYSZYN, O.; BANDONI, A. Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Achyrocline satureioides* flowers from different zones in Argentina. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.4, p. 626-628. 2008.

FIORDALISI, S. A. L.; HONORATO, L. A.; LOIKO, M. R.; AVANCINI, C. A. M.; VELEIRINHO, M. B. R.; FILHO, L. C. P. M.; KUHNEN, S. The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 3,

p. 2308–18, 2016. doi:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030215009418>>.

GOLTZ, C.; ÁVILA, S.; BARBIERI, J. B.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Macela (*Achyrocline satureioides*) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 115, n. December 2017, p. 227–234. 2018. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.013>.

HUYNH, H. T.; ROBITAILLE, G.; TURNER, J. D. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): An *in vitro* model for bovine lactation. **Experimental Cell Research**, v. 197, n. 2, p. 191–199, 1991.

JORAY, M. B.; PALACIOS, S. M.; CARPINELLA, M. C. Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity. **Phytomedicine**, v. 20, n. 3–4, p. 258–261, 2013. doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2012.10.015>.

LIMA, F. O. **Estudo comparativo da bioatividade de compostos fenólicos em plantas medicinais**. 2013. 145 f. Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria- RS. 2013.

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

MOTA, F. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. C. Atividade antibacteriana *in vitro* de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae (“macela”, “marcela”) sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 3, p. 298–304, 2011.

POLYDORO, M.; DE SOUZA, K. C. B.; ANDRADES, M. E.; DA SILVA, E. G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOL, F.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L.;

MOREIRA, J. C. F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sciences**, v. 74, n. 23, p. 2815–2826, 2004.

POPOVA, M.; BANKOVA, V.; BUTOVSKA, D.; PETKOV, V.; NIKOLOVA-DAMYANOVA, B.; SABATINI, A. G.; MARCAZZAN, G. L.; BOGDANOV, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 4, p. 235–340, 2004.

RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S. A.; BANDONI, A. L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 38, n. 1, p. 27–38, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.006>.

RIVERA, F.; GERVAZ, E.; SERE, C.; DAJAS, F. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2–3, p. 359–362, 2004.

RUFFA, M. J.; FERRARO, G.; WAGNER, M. L.; CALCAGNO, M. L.; CAMPOS, R. H.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 335–339, 2002.

SABINI, M. C.; CARIDDI, L. N.; ESCOBAR, F. M.; BACHETTI, R. A.; SUTIL, S. B.; CONTIGIANI, M. S.; ZANON, S. M.; SABINI, L. I. Evaluation of cytogenotoxic effects of cold aqueous extract from *Achyrocline satureioides* by *Allium cepa* L test. **Natural Product Communications**, v. 6, n.7, p. 995-998. 2011.

SABINI, M. C.; CARIDDI, L. N.; ESCOBAR, F. M.; MAÑAS, F.; COMINI, L.; REINOSO, E.; SUTIL, S. B.; ACOSTA, A. C.; NÚÑEZ MONTOYA, S.; CONTIGIANI, M. S.; ZANON, S. M.; SABINI, L. I. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and

apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 463–470, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.005>.

SCHROETER, H.; HEISS, C.; BALZER, J.; KLEINBONGARD, P.; KEEN, C. L.; HOLLENBERG, N. K.; SIES, H.; KWIK-URIBE, C.; SCHMITZ, H. H.; KELM, M. (-)Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n.4, p. 1024-1029. 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 281–293, 1988.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR., J. A.; ROSSI J A JR. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SOUZA, P. O. de; BIANCHI, S. E.; FIGUEIRÓ, F.; HEIMFARTH, L.; MORESCO, K. S.; GONÇALVES, R. M.; HOPPE, J. B.; KLEIN, C. P.; SALBEGO, C. G.; GELAIN, D. P.; BASSANI, V. L.; ZANOTTO FILHO, A.; MOREIRA, J. C. F. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 51, n. April, p. 23–33, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.04.013>.

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

SPINELLA, M. The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines. **Alternative Medicine Review**, v. 7, n. 2, p. 130-137. 2002.

VARGAS, V. M. F.; MOTTA, V. E. P.; LEITÃO, A. C.; HENRIQUES, J. A. P. Mutagenic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Achyrocline satureoides* in prokaryotic organisms. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 240, n.1, p. 13-18. 1990.

WANG, J.; GUO, C.; WEI, Z.; HE, X.; KOU, J.; ZHOU, E.; YANG, Z.; FU, Y. Morin suppresses inflammatory cytokine expression by downregulation of nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated primary bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 3016–3022, 2016a.

WANG, W.; SUN, C.; MAO, L.; MA, P.; LIU, F.; YANG, J.; GAO, Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 56, p. 21-38. 2016b.

WOLLENWEBER, E. Exkret-Flavonoide bei Blütenpflanzen und Farnen. **Naturwissenschaften**, v. 76, n. 10, p. 458–463, 1989.

WU, D.; KONG, Y.; HAN, C.; CHEN, J.; HU, L.; JIANG, H.; SHEN, X. d-Alanine:d-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 5, p. 421-426. 2008. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.06.010.

CAPITULO V- Considerações Finais

Dentre os produtos avaliados, no presente estudo, os extratos de própolis de Urupema e a macela destacaram-se para o controle da mastite bovina. Com base nos resultados obtidos, recomenda-se a realização de futuros estudos *in vivo* para a verificação da sua eficácia durante a lactação ou no período de secagem dos animais. Quanto ao exsudato das folhas de babosa, devido a elevada toxicidade às células epiteliais de glândula mamária, a sua administração interna requer cautela. No entanto, devido a sua ação antimicrobiana contra *S. aureus*, sugere-se a investigação do seu potencial como desinfetante de superfícies, por exemplo. Outra alternativa seria tentar reduzir a toxicidade do exsudato através da formulação de nanoemulsões. Neste caso, os compostos ativos estariam protegidos nas nanopartículas e a sua liberação mais lenta poderia oportunizar maior viabilidade celular.

Diante da atual dificuldade no controle da mastite bovina através dos métodos convencionais, com o uso de antibióticos comerciais, e do frequente risco de indução de resistência microbiana pela adoção deste tipo de terapia, nossos resultados evidenciam que os produtos naturais se configuram como uma alternativa possível para o tratamento desta doença. Entretanto, o uso destes produtos possui algumas restrições, principalmente relacionadas a estabilidade dos compostos bioativos. Estes são, em sua maioria, termo e fotossensíveis sendo facilmente oxidados. Estas características limitam o uso e o armazenamento dos extratos das plantas medicinais. Como estratégia para reduzir a rápida oxidação dos princípios ativos, são necessários futuros estudos que possam investigar o efeito da adição de substâncias antioxidantes aos extratos, ou da sua encapsulação em nanopartículas. Em ambas os casos, estudos prévios através de testes *in vitro* com células e patógenos para verificação da manutenção da atividade antimicrobiana e citotoxicidade celular são requeridos.

De maneira geral, o emprego de produtos naturais no controle da mastite bovina possui uma série de vantagens entre elas podemos citar a facilidade no acesso e manipulação destes produtos, principalmente por pequenos produtores; o sinergismo na ação dos compostos responsáveis pelas propriedades

terapêuticas dos produtos naturais, diminuindo o risco de resistência microbiana; o seu uso como alternativa a uma produção diferenciada de leite, como no caso do leite agroecológico, na qual há restrições ao uso dos antimicrobianos convencionais.