

UNIVERSIDADE PAULISTA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS DE PLANTAS BRASILEIRAS SOBRE *ESCHERICHIA COLI*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

LIVIA ROBERTA PIEDADE CAMARGO

**São Paulo
2014**

UNIVERSIDADE PAULISTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS
VEGETAIS DE PLANTAS BRASILEIRAS SOBRE *ESCHERICHIA
COLI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da
Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título
de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

LIVIA ROBERTA PIEDADE CAMARGO

**São Paulo
2014**

Camargo, Livia Roberta Piedade.

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais de plantas brasileiras sobre *Escherichia coli* / Livia Roberta Piedade Camargo. - 2014.
60 f.: il. color. + CD-ROM.

Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado) apresentado ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista, São Paulo, 2013.

Área de Concentração: Modelos Experimentais em Patologia e Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr.^a Ivana Barbosa Suffredini.

1. Extratos vegetais. 2. *Escherichia coli*. 3. Antibacteriano.

4. Cromatografia. 5. Ressonância magnética nuclear. I. Título. II. Suffredini, Ivana Barbosa. (orientador).

LIVIA ROBERTA PIEDADE CAMARGO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS VEGETAIS DE PLANTAS BRASILEIRAS
SOBRE *ESCHERICHIA COLI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/____/____
Prof^a. Dr^a. Helena Onishi Ferraz
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

_____/____/____
Prof^a. Dr^a. Maria Anete Lallo
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____
Prof^a. Dr^a. Ivana Barbosa Suffredini
Universidade Paulista UNIP

SUMÁRIO

Apresentação.....	01
Artigo 1: Visão geral do impacto causado por <i>Escherichia coli</i> na produção de animais de corte no Brasil e o papel dos produtos naturais como medicamentos veterinários alternativos	
Resumo.....	02
Abstract.....	03
Introdução.....	03
<i>E. coli</i> e animais de produção.....	04
Avicultura.....	05
Suinocultura.....	07
Bovinocultura.....	07
A biodiversidade brasileira caminha ao encontro da produção de animais de corte.....	08
Conclusão.....	10
Referências.....	11
Situação do artigo em relação à revista.....	17
Artigo 2: Atividade anti-<i>Escherichia coli</i> de extratos de plantas brasileiras. Novas tendências em pesquisa veterinária	
Resumo.....	18
Abstract.....	19
Material e método.....	20
Resultados.....	21
Referências.....	23
Situação do artigo em relação à revista.....	25

Artigo 3: Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato vegetal de *Microplumeria anomala* (Müll. Arg.) Ducke contra cepas de *Escherichia coli*

Resumo.....	26
Abstract.....	27
Introdução.....	28
Materiais e métodos.....	30
Resultados.....	37
Discussão.....	43
Conclusão.....	45
Referências.....	46
Situação do artigo em relação à revista.....	49
Anexos.....	50

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade de estar com saúde para desenvolver este estudo.

Gostaria de agradecer a todos meus familiares, por me auxiliarem nesta etapa da minha vida, pois todos sabem que não foi fácil.

Agradeço aos meus pais e meus irmãos por compartilharem comigo minhas dificuldades e as realizações dos meus sonhos.

Agradeço ao meu noivo, por compreender a minha ausência nos momentos em que me distanciava para escrever artigos, fazer minha viagem e meus experimentos no laboratório.

Agradeço a minha querida Vó Alzira, falecida em outubro, por tudo que você me ensinou. Com certeza, se a senhora ainda estivesse por aqui fisicamente, estaria sentada na primeira fileira de cadeiras na apresentação da minha defesa, pois sempre esteve presente nos momentos importantes da minha vida, mas como a senhora é muito “danada”, tenho certeza de que vai dar um jeitinho de estar lá, mesmo que eu não a veja.

Sou muito grata a minha Orientadora Ivana, que a princípio me aceitou como sua aluna de Iniciação Científica no período da minha graduação. Hoje, me aceita como sua orientanda do mestrado e se Deus quiser, continuaremos trabalhando juntas no doutorado.

Agradeço a Professora Doutora Ingrid Díaz, pois sua ajuda foi fundamental para em algumas etapas do meu trabalho.

Agradeço ao Sergio e ao Mateus, pois foram muito dedicados e pacientes em me orientar na viagem feita para a realização da coleta de algumas plantas.

Agradeço a todos os funcionários do Laboratório de Extração, localizado na Paulista, por me auxiliarem durante os procedimentos realizados.

Agradeço ao Diretor Wilson Malavazi, Doutor Drazio Varella e novamente a Professora Ivana, pois estes foram responsáveis pela a realização de um sonho, no qual fui contemplada com uma viagem para o coração da Floresta Amazônica como parte integrante da equipe de coleta da UNIP.

APRESENTAÇÃO

O Brasil possui a maior diversidade biológica terrestre, e a maior parte das espécies vegetais presentes na Amazônia e na Mata Atlântica não são conhecidas do ponto-de-vista farmacológico, biológico, toxicológico e químico. Por esse motivo, programas de triagem em grande escala de extratos vegetais obtidos de plantas brasileiras têm sido implementados, entre eles, o do Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade da UNIP.

As pesquisas ocorrem em função da necessidade de se introduzir novos agentes antibacterianos no mercado, em particular que possam ser utilizados em medicamentos de uso veterinário. Dos diversos micro-organismos constantemente estudados, encontra-se *Escherichia coli*, que se destaca por se tratar de uma bactéria Gram negativa cotidianamente presente na maioria dos animais de sangue quente, incluindo humanos, animais de companhia e de produção, por fazer parte de sua microbiota intestinal. Por consequência, algumas cepas patogênicas têm gerado preocupação na saúde pública e na produção animal, gerando prejuízos econômicos na suinocultura, avicultura e pecuária. O primeiro manuscrito apresentado neste trabalho oferece uma visão geral do impacto de *E. coli* em animais de produção e trás à luz a iminente importância dos produtos naturais como alternativa terapêutica.

Considerando os fatos expostos nesse estudo, fica evidente a importância de se pesquisar novos antibióticos, por isso, o segundo manuscrito apresentado, aprovado para ser publicado no jornal Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Qualis A2) e financiado pela Fapesp (2010/09694-7), relata a triagem de mais de 1.700 extratos vegetais orgânicos e aquosos da Extratoteca UNIP contra uma cepa de *E. coli*.

O último manuscrito deste trabalho relata o estudo químico biodirecionado de um dos quatro extratos selecionados, cujos resultados encontram-se no segundo manuscrito.

Visão geral do impacto causado por *Escherichia coli* na produção de animais de corte no Brasil e o papel dos produtos naturais como medicamentos veterinários alternativos

A bird's-eye-view of the impact caused by colibacillosis in livestock in Brazil and the role of natural products as alternative veterinarian medicines

Título abreviado: *E. coli* em veterinária de grande porte e medicamentos naturais..

Running title: *E. coli* in animal production and natural medicine.

Camargo, L.R.P.¹; Suffredini, I.B.^{1,2*}.

¹Programa de Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP. R. Dr. Bacelar, 1212, Vila Clementino, 04026-002, São Paulo, SP, Brasil; ²Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade da Universidade Paulista – UNIP. Av. Paulista, 900, 1º andar, Bela Vista, São Paulo, SP, Brasil, 01310-100.

ibsuffredini@yahoo.com.br

Resumo

O Brasil é um dos maiores exportadores de produtos de origem animal. Porém, sua produção sofre impacto causado pela bactéria *Escherichia coli*, que é capaz de acarretar prejuízos econômicos inestimáveis e gerar preocupação à saúde pública, na bovinocultura, avicultura e suinocultura. A utilização indiscriminada de antimicrobianos tanto no tratamento como aditivos melhoradores de desempenho zootécnico gera o aparecimento de resistência bacteriana. Por conta disso, há a necessidade de se introduzir novos medicamentos que sejam eficazes e estejam dentro dos limites máximos de resíduo estabelecidos nacional e internacionalmente pelo mercado consumidor. Diante deste fato, é imprescindível que haja a busca racional de novos antimicrobianos que apresentem eficácia e um baixo índice residual. Os compostos de

origem natural são apontados como alternativas para serem usados na prática veterinária.

Palavras-chave: agropecuária, *Escherichia coli*, impacto econômico, produtos naturais.

Abstract

Brazil is one of the biggest exporters of animal products. However, its production is constantly being threatened by the bacterium *Escherichia coli* which can cause economic losses and generate invaluable public health concern in cattle, poultry, and swine culture. The indiscriminate use of antimicrobials in the treatment of farm animals and their use as growth promoters lead to the appearance of bacterial resistance, but the presence of drug residues is still a concern related to meat exportation. For that reason, it is essential to rationally seek new antimicrobials of natural origin to be used in veterinary practice.

Keywords: livestock, *Escherichia coli*, economic impact, natural product

Em pleno o século XXI, problemas de infecções causadas por bactérias são constantes no cotidiano das grandes cidades e da vida no campo. *Escherichia coli*, uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, encontra-se na forma de bastonetes Gram negativos e apresenta membrana externa composta de lipopolissacarídeos (LPS). Não forma esporos, pode ser móvel ou imóvel, com metabolismo respiratório facultativo. Tem como habitat natural o trato intestinal da maioria dos animais de sangue quente, incluindo os humanos e, por esse motivo, é encontrada nos dejetos fecais. Apresenta a função de impedir a colonização de outros micro-organismos patogênicos. Durante um longo período, *E. coli* foi considerada uma bactéria não-

patogênica, porém, com o aprofundamento do conhecimento de sua estrutura genética, verificou-se mecanismos de aquisição de genes de virulência e resistência, o que passou a ser motivo de preocupação e foco de pesquisas no que diz respeito a infecções diarreio gênicas e extraintestinais. As diarreio gênicas são sublocadas em grupos que se formaram de acordo com os sinais clínicos, como as ETEC (*enterotoxigenic E. coli*), as AEEC (*attaching and effacing E. coli*) e as STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*). A classificação das cepas que causam infecções extraintestinais (denominadas ExPEC, de modo geral) pode ser feita, segundo alguns autores, como UPEC (causam infecção urinária), SEPEC (causam septicemia) e APEC (causam infecções em aves). Informações mais detalhadas da classificação podem ser encontradas em outras publicações (QUINN, et al., 2005; KAWAKAMI, et al., 2009; MARIETTO-GONÇALVES, et al., 2007).

Então, a necessidade de se identificar e diferenciar as cepas comensais das patogênicas passou a ser uma condição importante para o diagnóstico e tratamento de doenças causadas pela Enterobacteriaceae, com ênfase em animais.

Este trabalho tem como objetivo abordar, de modo geral, o impacto causado por *E. coli* em animais de produção no Brasil e trazer à luz a necessidade de se introduzir novos métodos terapêuticos, enfatizando os fitoterápicos e produtos naturais, visto que, além de grande exportador de produtos animais, o Brasil é considerado um celeiro de potenciais medicamentos de origem vegetal.

***E. coli* e animais de produção**

Nas criações de suínos, bovinos e aves, os antibióticos são comumente utilizados como aditivos melhoradores de desempenho zootécnico, por aumentarem a conversão alimentar e o desempenho no ganho de peso do animal. Como consequência, o controle

dos resíduos dos medicamentos nos produtos finais, como carne, leite e ovos deve ser controlado, segundo as normas dos países importadores. Na União Europeia, o uso de antibióticos como promotores de crescimento foi banido em 2006 (CASTANON, 2007; EUROPEAN UNION, 2005). Além disso, cepas de *E.coli* que apresentam resistência adquirida a medicamentos têm sido isoladas e identificadas em porcos (Boerlin et al., 2005), aves (Gyles, 2008) e no gado (Cristancho, 2008). No Brasil é possível avaliar, de modo geral, o impacto causado por *E.coli* nos diferentes animais de produção.

Avicultura

O setor da avicultura industrial brasileira considera *E. coli* um importante agente infeccioso, capaz de provocar inestimáveis prejuízos econômicos. Atualmente, o Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango e o terceiro maior produtor, com 12,2 milhões de toneladas produzidas em 2010, movimentando aproximadamente US\$1.782 por tonelada. Diante destes dados, é evidente a importância e preocupação em impedir que a colibacilose afete as granjas e provoque queda na produção de ovos, perda da qualidade de aves de corte (menor ganho de peso e crescimento afetado) e aumento nos custos do tratamento (OLIVEIRA, 2011). *E. coli* do grupo das APEC, subgrupos O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119 e O152 são prevalentes no território brasileiro (GUASTALLI, et al., 2010). A colibacilose aviária é uma infecção extra intestinal que acomete galinhas, perus e patos, mas eventualmente podem contaminar gansos, pássaros domésticos e selvagens (OLIVEIRA, 2011). Aves jovens, entre 4 a 9 semanas, são mais susceptíveis a desenvolver problemas respiratórios, enquanto as adultas geralmente apresentam o quadro de salpingite e/ou septicemia (CARDOSO, et al., 2002). Os poros da casca do ovo são outra via de transmissão, por ocorrer a penetração do micro-organismo, infectando os pintinhos. Caso o embrião sobreviva nos primeiros dias, pode apresentar septicemia ou crescimento deficiente. Estudos recentes mostram que a letalidade embrionária

geralmente ocorre devido à contaminação por cepas que possuem mais que dois fatores de virulência (MACHADO, et al., 2013). Em aves de postura infectadas pode haver transmissão vertical, por conta da proximidade das membranas do saco aéreo com o oviduto, ou de forma ascendente, na qual a bactéria migra a partir da cloaca (GUASTALLI, et al., 2010). A bactéria tem como principal porta de entrada as vias aéreas superiores, a qual pode colonizar e disseminar-se primeiramente na traqueia, migrando para os sacos aéreos e os demais tecidos ao redor (ZANATTA, et al., 2004). Aves acometidas por outros micro-organismos destruidores do epitélio respiratório, tais como vírus da bronquite infecciosa, *Mycoplasmasp.*, *Pasteurella sp.*, *Haemophilus sp.*, *Pneumovírus sp.*, tornam-se as mais susceptíveis (CARDOSO, et al., 2002).

A colibacilose aviária apresenta alta morbidade e a bactéria alastra-se rapidamente pelo corpo, ocasionando frequentemente quadros de septicemia, levando as aves a óbito (CARDOSO, et al., 2002). O fator ambiental facilita a disseminação bacteriana quando encontra um habitat propício ao seu desenvolvimento, como em granjas que não apresentam desinfecção adequada, alta densidade populacional de aves, temperatura ambiental elevada, ventilação deficiente e alta concentração de amônia, que leva a destruição do epitélio ciliar da traqueia permitindo a colonização na mucosa do trato respiratório (OLIVEIRA, 2011).

O tratamento da colibacilose tradicionalmente é feito com antimicrobianos tais como ampicilina/eritromicina, espectonomicina, quinolonas, cefalexina, piperacilina, clorofenicol, neomicina, tetraciclina/furazolidona e trimetropima/sulfametoxazol. Além da administração dos antibióticos, há necessidade de se corrigir o manejo da granja visando às boas práticas de higiene e criação, com o intuito de reduzir o estresse e prevenir novas infecções (MORAILLON, et al., 2013).

Suinocultura

No Brasil, estima-se que 15 a 20% dos leitões vêm a óbito antes do período de desmame, por consequência da diarreia causada pela enterobactéria. O principal agente causador dessa enfermidade é a *E. coli* do grupo ETEC (RIBEIRO, et al., 2005), que apresenta alta capacidade de desenvolver resistência na espécie suína, geralmente causando sua morte (BACCARO, et al., 2002). Os leitões são mais susceptíveis, devido à baixa imunidade e à ausência de barreira gástrica, o que possibilita a transmissão materna e ambiental (GRENDENE & ROSSATO, 2011). A colibacilose acomete os leitões no período neonatal e após o desmame, causando evolução rápida dos sintomas caracterizados por diarreia severa que evolui para hemo-concentração, acidose metabólica e óbito (BACCARO, et al., 2002). O animal pode falecer entre 4 a 24 horas após a contaminação. Há diversos protocolos de tratamentos antimicrobianos, tais como cefalosporinas, aminoglicosídeos, aminociclitéis, polimixina, quinolonas e sulfas associadas à trimetopina (SATO, 2013), mas existem alguns trabalhos que relatam a utilização de produtos naturais como agentes imunoestimulantes naturais oferecidos à mãe lactante em sua alimentação, como algas (LEONARD, et al., 2011), que apresenta a função de transmitir para o leitão os anticorpos maternos e diminuir a susceptibilidade a infecções no desmame.

Bovinocultura

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de carne bovina, e sua produção de leite e derivados é significativa. A mastite ocasionada por *E. coli* causa eventuais impactos negativos na economia do gado leiteiro, decorrentes da redução na produção, perda da qualidade do leite, altos custos dos serviços veterinários e medicamentos, queda no rendimento industrial e descarte precoce ou morte dos animais

(LANGONI, et al., 2011). Pesquisas realizadas nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, influentes na produção leiteira, estimaram as perdas pela doença em aproximadamente US\$ 317,93/vaca/ano e os prejuízos em US\$20.611,32/propriedade/ano (MARTINS, et al., 2010). O investimento em programas de controle e profilaxia da mastite, bem como de introdução de novos medicamentos, são de fundamental importância (MARTINS, et al., 2010), e novas terapias são necessárias. Além disso, produtos de origem animal – em particular seus restos, como carcaças - têm sido submetidos a análise de controle de qualidade microbiano, visando ao controle de qualidade dos processos iniciais de abate e, recentemente, verificou-se a presença de *E. coli* em meias carcaças de bovinos de exportação (CASAGRANDE, et al., 2013).

A biodiversidade brasileira caminha ao encontro da produção de animais de corte

Importantes grupos de pesquisa brasileiros estudam *E. coli* sob aspectos clínicos (COGGAN, et al., 2008), microbiológicos (KREWER, et al., 2012; VICENTE, et al., 2005), e de alimentos (SILVA, et al., 2001; ALEIXO e AVER, 1996), mas poucos estudam a utilização de produtos naturais como alternativas à terapêutica veterinária de grande porte.

A partir do quadro exposto, a necessidade de se introduzir novos agentes antimicrobianos e imunomoduladores na prática veterinária é uma realidade. O Brasil é um país único no mundo, por ser aquele que apresenta a maior diversidade terrestre, além de ser o um dos maiores exportadores de produtos agropecuários. A busca pelo equilíbrio entre manter a floresta em pé e aumentar a eficácia produtiva agropecuária é o desafio natural e atual. Medicamentos fitoterápicos e homeopáticos, além dos produtos naturais incorporados em medicamentos alopáticos como seu princípio ativo já estão

sendo usados para animais de companhia e selvagens, bem como pesquisas começam a ser feitas com animais de produção (BORATTO, et al., 2004). A procura por medicamentos de origem vegetal, tanto fitoterápicos, como produtos naturais isolados, tem recebido atenção de pesquisadores, recentemente. Em uma pesquisa prospectiva com mais de 1.700 extratos vegetais, foram identificados quatro, destes obtidos de plantas amazônicas capazes de inibir o crescimento de *E. coli*, *in vitro* (CAMARGO, et al., *in press*). Esses extratos estão sendo estudados quanto à sua composição química. Em outro estudo, extratos vegetais de alho, cravo, canela, pimenta, tomilho e os compostos cinamaldeído e eugenol incorporados na ração na concentração de 500 ppm foram submetidos a estudos sobre os mecanismos de ação relacionados à estimulação da digestão, às alterações da microbiota intestinal e à imunomodulação em leitões (UTIYAMA, et al., 2006). Embora os autores não tenham identificado melhora na frequência de diarreia nos leitões, não é possível verificar no artigo como os extratos vegetais foram obtidos, nem a proporção de cada extrato na formulação, nem determinar quantidade dos produtos isolados cinamaldeído e eugenol presentes na formulação, além de terem escolhido uma maneira de administrar que interferiu no paladar dos animais, visto que os produtos escolhidos são altamente ricos em compostos aromáticos de origem terpenoides e fenilpropanoides.

Setenta e nove amostras de *E. coli* isoladas de fezes de aves e bovinos foram analisadas frente a diversos antibacterianos e óleos essenciais obtidos comercialmente. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas em microdiluição em caldo e verificou-se que o óleo essencial de orégano foi o mais eficaz ($831,4 \mu\text{g ml}^{-1}$) (SANTURIO, et al., 2011); futuras pesquisas incorporando os óleos na alimentação dos animais devem ser feitas, segundo os autores. Produtos naturais têm sido usados promotores de crescimento de frangos e suínos. O extrato vegetal *Citrus maxima*

(pomelo), associado à ração de frangos de corte, demonstrou melhora no desempenho alimentar e na conversão alimentar, maximizando o desempenho dos frangos de corte (GABRIEL JUNIOR, et al., 2009). Uma fórmula baseada em medicamentos vegetais da medicina chinesa, denominada de Xiang-Qi-Tang foi usada no tratamento de aves com colibacilose induzida por *E. coli* do grupo das APEC. Segundo os autores, houve o aparecimento de efeitos protetores relacionados a mecanismos anti-inflamatórios e anti-trombóticos (He, et al., 2011). Em aves, um composto derivado de alho (*Allium sativum*) denominado propil-propano-tiosulfonato foi administrado a frangos de corte para avaliar a diminuição de enteropatógenos em seu intestino, e observou-se que houve a diminuição dos patógenos (PEINADO, et al., 2012).

Embora haja esforços em se utilizar medicamentos à base de plantas como alternativa aos antibióticos tradicionais em Veterinária de grande porte, as pesquisas são ainda escassas, tanto no Brasil como no exterior.

Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo abordar, de modo geral, a importância de *Escherichia coli*, bactéria cuja patogenia apresenta alto impacto na pecuária, setor da economia que suporta a balança comercial do Brasil há anos, e ao mesmo tempo ressaltar a importância dos produtos naturais antibacterianos extraídos de plantas brasileiras como celeiro de novas descobertas na Veterinária de grande porte. O Brasil é o único país no mundo onde é possível que haja a formação de uma interface gerada por dois potentes setores, o da pecuária e o da biodiversidade, de onde pode resultar no aprimoramento da criação de animais de corte, ao mesmo tempo em que se busca conhecer e contribuir para a preservação da biodiversidade brasileira.

Referências

ALEIXO, J. A. & AVER, G. P., Prevalence of enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* in foods of animal origin in southern Brazil. **Ciência Rural**, v. 26, n. 2, p. 247-250, 1996. ISSN 0103-8478. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781996000200013&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 29 jan. 2014. DOI: 10.1590/S0103-84781996000200013.

BACCARO, M.R., et al., Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.15-18, abr./jun. 2002. Disponível em: <http://200.144.6.109/docs/arq/V69_2/baccaro.pdf>. Acesso em: 11 mai. 2013.

BOERLIN, P., et al., Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6753-61, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1287655/pdf/0568-05.pdf>>. Acesso em 29 jan. 2014.

BORATTO, A. J., et al. Uso de antibiótico, de probiótico e de homeopatia em frangos de corte criados em ambiente de conforto, inoculados ou não com *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.33, no.6, p.1477-1485, 2004. ISSN 1516-3598. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982004000600014&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 29 jan. 2014. DOI: 10.1590/S1516-35982004000600014.

CARDOSO, A.L.S.P., et al. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.1-5, abr./jun.2002. Disponível em: <http://200.144.6.109/docs/arq/V69_2/cardoso.pdf>. Acesso em: 13 mai. 2013.

CAMARGO, L.R.P., SUFFREDINI, I. B. Anti-*Escherichia coli* activity of Brazilian plant extracts. New trends in Veterinary research. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. *In press*.

CASAGRANDE, L., et al. Ocorrência de *Escherichia coli* em meias carcaças de bovinos abatidos em estabelecimento habilitado para exportação. **Ciência Rural**, vol.43, no.6, p.1025-1030, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782013000600013&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 29 jan. 2014. DOI: 10.1590/S0103-84782013005000070.

CASTANON, J.I. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science** . v.86, n.11, p. 2466-71, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmed.org>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

COGGAN, J. A. et al. Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol.39, no.3, p.477-483, 2008. ISSN 1517-8382. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822008000300012&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 28 jan. 2014. DOI: 10.1590/S1517-83822008000300012.

CRISTANCHO, L., et al. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* in white veal calves. **Veterinary Microbiology**, v.126, p. 200-9, 2008. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0378113507003148/1-s2.0-S0378113507003148-main.pdf?_tid=5ea78440-88ea-11e3-bfe8-00000aab0f6b&acdnat=1391002774_1d4a19e02bec_7bd4aa_47511e3dfbc513> . Acesso em: 29 jan. 2014.

EUROPEAN UNION. European Comission. IP/05/1687 22/12/2005. Ban on antibiotics as growth promoters in animal feeds enters into effect. Disponível em: <http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_en.htm>. Acesso em 29 jan. 2014.

GABRIEL JUNIOR, C., et al. Extrato de pomelo (*Citrus maxima*) como aditivo em rações para frangos de corte. *Ars veterinaria*, v.25, n.2, 084-089, 2009. Disponível em: <<http://www.arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/view/276>>. Acesso em: 29 jan. 2014.

GRENDENE, J.; ROSSATO, C.K. Colibacilose septicêmica neonatal em leitões-Revisão. **Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade de Cruz Alta**, Out.2011. Disponível em: <<http://www.unicruz.edu.br/seminario/artigos/saude/COLIBACILOSE%20SEPTICEMICA%20NEONATAL%20EM%20LEIT%C3%95ES%20%E>

[2%80%93%20REVIS%C3%83O%20BIBLIOGR%C3%81FICA.pdf>. Acesso em: 13 mai. 2013.](#)

GUASTALLI, E.A.L., et al. Índice de patogenicidade, produção de hemolisina e sorogrupo de amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves de postura comercial. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p.153-157, jan./mar.2010. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_1/guastalli.pdf>. Acesso em: 13 mai. 2013.

GYLES, C.L., Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 149-58, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> . Acesso em: 28 jan. 2014.

HE, C. L. et al., Xiang-qi-tang increases avian pathogenic *Escherichia coli*-induced survival rate and regulates serum levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 and soluble endothelial protein C receptor in chicken. **Biological and Pharmaceutical Bulletin.**, v. 34, n. 3, p. 379-382, 2011. Disponível em:< <https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/34/3/343379/article>> . Acesso em: 28 jan. 2014. DOI: 10.1248/bpp.34.379.

KAWAKAMI, A.P., et al., *In vitro* growth of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from a snow leopard treated with homeopathic and isopathic remedies: a pilot study. **International Journal of High Dilution Research**, v8, n.27, p. 41-44, 2009. Disponível em:<<http://www.feg.unesp.br/~ojs/index.php/ijhdr/article/view/341/394>>. Acesso em: 05 fev.2014.

KREWER, C. C. et al. Suscetibilidade a desinfetantes e perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.11, p.1116-1120, 2012. ISSN 0100-736X. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012001100007&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 28 jan. 2014. DOI: 10.1590/S0100-736X2012001100007.

LANGONI, H., et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p.1059-1065, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v31n12/04.pdf>>. Acesso em: 11 mai.2013. DOI: 10.1590/S0100-736X2011001200002.

LEONARD, S. G., et al. Effect of maternal seaweed extract supplementation on suckling piglet growth, humoral immunity, selected microflora, and immune response after an ex vivo lypopolysaccharide challenge. **Journal of Animal Science**, v.90, p. 505-14, 2011. Disponível em: <<http://www.journalofanimalscience.org/content/90/2/505>>. Acesso em: 28 jan. 2014. DOI: 10.2527/jas.2010-3243.

MACHADO, L.S., et al. PCR na detecção de gene *fel a* de *Escherichia coli* em frangos, de corte condenados por aerossaculite pela inspeção sanitária federal. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.80, n.2, p.145-149, abr./jun. 2013. Disponível em:< http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v80_2/machado.pdf >. Acesso em: 17 out. 2013. doi: 10.1590/S1808-16572013000200002.

MARIETTO-GONÇALVES, G.A., et al. Colisepticemia em Papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, São Paulo, v.8, n.1, p.56-60, 2007. ISSN 1519 9940. Disponível em:< <http://www.rbspa1.ufba.br/printarticle.php?id=252&layout=html>>. Acesso em: 05 fev.2014.

MARTINS, R.P., et al. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.11, n.1, p.181-187, jan./mar. 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/5085/6552>>. Acesso em: 12 mai. 2013.

MORAILLON, R., et al. Manual Elsevier de veterinária: diagnóstico e tratamento de cães, gatos e animais exóticos. In: DAGLI, C., GUERRA, J.M., FERNANDES, N.C.C.A., OLORIS, S.C.S., HERNANDES, T.D. **Aves: Doenças Infecciosas**, 2013, p. 781-852.

OLIVEIRA, A.L., **Análise da presença de genes do sistema de secreção tipo 6 em cepas de *Escherichia coli* patogênicas aviárias (APEC) isoladas de colisepticemia em frangos de corte do Rio Grande do Sul**. 2011. 43f.Monografia (Trabalho de conclusão de curso) - Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <<https://www.repositorioceme.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/49222/000828515.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 08 mai. 2013.

PEINADO, M. J., et al. Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens *in vivo*. **Poultry Science**. v.91, n. 9, p. 2148-57, 2012. Disponível em: <<http://ps.fass.org/content/91/9/2148.full.pdf+html>>. Acessado em: 27 jan. 2014. DOI: 0.3382/ps.2012-02280.

QUINN, P.J., et al. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. In: Weiss, L. H. N., Weiss, R. D. N. **Artmed**, Porto Alegre, 2005, p. 512.

RIBEIRO, A.M.L., et al. Uso de gemas de ovos de aves hiperimunizadas contra *Escherichia coli* suína no controle da diarreia neonatal de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, São Paulo, v.34, n.4, p.1234-1239, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v34n4/26394.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2013. doi: 10.1590/S1516-35982005000400019

SANTURIO, D. F. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, v.41, n.6, p.1051-1056, 2011. ISSN 0103-8478. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000600021&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 28 de jan. de 2014. DOI: 10.1590/S0103-84782011005000067.

SATO, J.P.H. **Frequência e associação de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões desmamados**. 2013. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Sanidade Suína) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SILVA, Z. N. et al. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.35, n.4, p.375-379, 2001. ISSN 0034-8910. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102001000400007&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 28 jan. 2014. DOI: 10.1590/S0034-89102001000400007.

UTIYAMA, C.E., et al. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarreia e o desempenho de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, São Paulo, v.35, n.6, p. 2359-2367, 2006.

Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbz/v35n6/23.pdf>>. Acesso em 10 mai. 2013.
doi : 10.1590/S1516-35982006000800023

VICENTE, H. I.G., ETA I. Shigatoxigenic *Escherichia coli* serogroups O157, O111 and O113 in feces, water and milk samples from dairy farms. Brazilian Journal of Microbiology, vol.36, no.3, p.217-222, 2005. ISSN 1517-8382. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=S1517-83822005000300003&lng=pt&nrm=isso>>. Acesso em 28 jan. 2014. DOI: 10.1590/S1517-83822005000300003

ZANATTA, G.F., et al. Susceptibilidade de mostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.3, p.283-286 jul./set. 2004. Disponível em:<http://200.144.6.109/docs/arq/V71_3/zanatta.PDF>. Acesso em: 12 mai. 2013.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (processo 2008/58706-8) e à CAPES-PROSUP.

Fontes de Aquisição

Foram consultadas as seguintes fontes de busca: www.scielo.org

Situação do artigo em relação à revista

O artigo **“Visão geral do impacto causado por *Escherichia coli* na produção de animais de corte no Brasil e o papel dos produtos naturais como medicamentos veterinários alternativos”**, parte integrante desse trabalho, foi submetido à apreciação da Revista Ciência Rural e de acordo com as sugestões dos autores da revista foi modificado e será reenviado para nova análise.

Todas as sugestões foram aceitas pelos autores

Tipo de manuscrito: Comunicação

Anti-*Escherichia coli* activity of Brazilian plant extracts. New trends in Veterinary research

Atividade anti-*Escherichia coli* de extratos de plantas brasileiras. Novas tendências em pesquisa veterinária

Camargo, L.R.P.¹; Suffredini, I.B.^{1*}

¹Graduation Program in Veterinary and Centre for Research in Biodiversity, Paulista University-UNIP, Av. Paulista, 900, 1º andar, Bela Vista, São Paulo, SP, 01310-100.
Fone: (11) 3170-3776, FAX: (11) 3170-3978. Email: liviarpcam@uol.com.br

Resumo

Escherichia coli é uma bactéria presente no trato intestinal de animais de sangue quente, entretanto, a perda do equilíbrio em sua relação com o hospedeiro pode causar doenças que levam a perdas econômicas, quando se trata de animais de produção e perdas incalculáveis, quando se trata de animais silvestres. O presente estudo testou diversos extratos aquosos e orgânicos, obtidos de plantas da Amazônia brasileira, contra *Escherichia coli* (ATCC 25922). Usando o ensaio de disco difusão em ágar Mueller-Hinton (DDA), foram testados 1791 extratos quanto à sua atividade antibacteriana. Os extratos que mostraram halo de inibição de crescimento bacteriano foram testados no modelo da microdiluição em caldo (MDB) contra uma suspensão bacteriana preparada na escala de 0,5 McFarland para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Dois extratos orgânicos (EB 127 e EB725) e dois extratos aquosos (EB 272 e EB 934) testados inibiram o crescimento bacteriano no modelo DDA. O extrato orgânico EB127, obtido de *Microplumeria* sp., apresentou CIM e CBM \geq 700mg/mL; o extrato aquoso EB272, obtido de *Casearia* sp., apresentou CIM=CBM=600mg/mL; o extrato orgânico EB725, obtido de *Buchenavia* sp., apresentou CIM=CBM \leq 400mg/mL; e o extrato aquoso EB934, obtido de *Caryocar* sp., apresentou 400mg/mL<MIC<700mg/mL. Os extratos ativos apresentaram potencial para serem utilizados como antibióticos de uso veterinário, em animais acometidos por

* Corresponding author: I.B.S. Nucleo de Pesquisas em Biodiversidade, Laboratorio de Extracao, Universidade Paulista – UNIP, Av. Paulista, 900, 1º andar, Bela Vista, São Paulo, SP, Brazil, 01310-100. Phone: +55 11 3170-3776; FAX: +55 11 3170-3978. Email: ibsuffredini@yahoo.com.br

infecções causadas por *E. coli*. Embora um passo importante tenha sido dado para o desenvolvimento de novos fármacos de uso veterinário, é fundamental que estudos referentes à atividade farmacológica, toxicológica e a composição química destas espécies sejam executados em um futuro próximo.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, extratos vegetais, patogenicidade

Abstract

Escherichia coli is a bacteria present in the intestinal tract of warm-blooded animals, however, loss of balance with the host, may lead to illnesses that can cause economic losses, particularly in farm animals, and a inestimable loss when related to wild animals. This study aims to test thousands of aqueous and organic plant extracts obtained from Amazonian Brazilian plants against *Escherichia coli* (ATCC 25922). Using the disk diffusion assay, in Mueller-Hinton Agar (DDA), more than 1700 extracts were tested for their antibacterial activity. The extracts that showed a growth inhibition zone, which indicated a selective anti-*Escherichia* activity, were tested in microdilution broth assay (MDB) against bacterial suspension at 0.5 McFarland in order to determine their minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC). Two organic (EB 127 and EB725) and two aqueous (EB 272 and EB 934) out of 1791 plant extracts were inhibited bacteria growth in DDA. EB127, obtained from *Microplumeria* sp., showed MIC and $MBC \geq 700\text{mg/mL}$; EB272, obtained from *Casearia* sp., showed $MIC = MBC = 600\text{mg/mL}$; EB725, obtained from *Buchenavia* sp., showed $MIC = MBC \leq 400\text{mg/mL}$; and EB934, obtained from *Caryocar* sp. presented $400\text{mg/mL} < MIC < 700\text{mg/mL}$. The active extracts showed potential to be used as drugs against veterinarian diseases, especially those related to production animals, wild animals or pets that are caused by *E. coli*. Although a large step has been reached, it is fundamental that further analyses related to their toxicity, pharmacology and chemistry is made in the near future.

Keywords: *Escherichia coli*, plant extracts, pathogenicity.

Escherichia coli is a widely known infective Gram negative bacteria found in the intestine of hot blood animals. Most *E. coli* strains are low-virulent, however they

may cause opportunistic infections in individuals, particularly in immunosuppressed, malnourished, new-born and elderly ones, when they are exposed to a focus of infection (Markey *et al.*, 2005). Livestock, wild animals and pets are constantly exposed to *E. coli*, causing emotional disorder and economic loss to the owners (Carlton and McGavin, 1998). Moreover, *E. coli* strains showing resistance to commonly used antibiotics were isolated from wild animals (Carvalho *et al.*, 2012), and demonstrate the impact of chemicals in the nature. An up-to-date issue highlights the use of plants in substitution to wide-used antibiotics (Wiest *et al.*, 2009; Avancini *et al.*, 2000).

Research aiming the identification of new antibiotics from nature is traditionally developed around the world and a wide range of chemicals have been isolated, identified and approved by important organs as Food and Drug Administration-USA (Newman and Cragg, 2012). Brazil is a rich country, in terms of its biodiversity (Azevedo, 2003). For that reason, a program aiming the identification of plant extracts that may provide new chemical compounds to be used as antibiotics to animals was established. So, 1791 plant extracts were tested for their antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922, using classical antibacterial assays, as microdilution broth and disk diffusion assays.

Plants were collected in the Amazon rain forest¹ and were dried in air-circulating incubator, ground in a hammer-mill and 24h macerated with a mixture of dichloromethane and methanol (1:1), followed by a 24h maceration with water. Solvents were removed under vacuum and storage at -20°C until use, so, an organic extract and a aqueous extract were obtained from each plant material. Dry extracts were resuspended in dimethylsulfoxide 50% and aqueous extracts, in distilled water, at a concentration of 200 mg/mL (Suffredini *et al.*, 2006a). Antibacterial assays were done in sterile conditions, described as follows.

Disk diffusion assay (DDA) was performed to identify antibacterial extracts. Mueller Hinton Agar (MHA) was prepared according to the manufacturer, and was used to bacteria growth and maintenance. *Escherichia coli* ATCC 25922, obtained from fresh colonies, were surface-inoculated to MHA Petri dishes at a concentration of 0.5 McFarland (Suffredini *et al.*, 2004). Sterile paper discs measuring 6 mm diameter were equally distributed on the agar surface, and 10 µL of each extract were added to a single

¹ Under license of Brazilian Government (12a/2008), IBAMA/MMA and CGEN/MMA.

paper disc. Chlorhexidine (CHX) 0.12%, 1% and 2% were used as standard drugs. Petri dishes were taken to incubator at 36°C, for 24h. After that period, the presence of growth inhibition zone was observed. The active extracts were re-tested in triplicate, in order to confirm antibacterial activity, and growth inhibition zones were measured with a caliper rule. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test were used to analyze differences among means ($p < 0.05$), in DDA (GraphPad Prism 5.0).

The selected active extracts were tested in microdilution assay (MDC), in order to have their minimal inhibitory and minimal bactericidal concentrations (MIC's and MBC's) determined. Mueller-Hinton broth (MHB) medium was prepared according to the manufacturer, in sterile conditions. Fresh colonies of the same *E. coli* were used to prepare a bacterial suspension having 0.5 McFarland. So, 190 μ L of the suspension were distributed in the wells of a round-bottom 96 well-microplate. Ten μ L of different concentrations of extracts/standard drugs were added to the wells in duplicates, and the microplates were incubated at 37 °C, for 24h. Chlorhexidine 0.12%, 1% and 2% were used as standard drugs. After that period, the presence or absence of turbidity was observed for each well. All wells were subcultured in order to have MIC's (lowest concentrations shown a lack of turbidity, but bacteria growth in subculture) and MBC's established (lowest concentrations shown a lack of turbidity, and no bacteria growth in subculture) (Suffredini *et al.*, 2006b).

Four out of 1791 plant extracts showed a significant anti-*Escherichia coli* activity in DDA (Tab.1): EB 127 (obtained from *Microplumeria anomala*, Apocynaceae), EB 272 (obtained from *Casearia spruceana*, Flacourtiaceae), EB 725 (obtained from *Buchenavia* sp., Combretaceae) and EB934 (obtained from *Caryocar* var. *microcarpum*, Caryocaraceae). Differences among growth inhibition zones (Tab. 2) originated from four extracts (EB 127, EB 272, EB 725, EB 934) and three standard drugs (CHX 0.12%, CHX 1% and CHX 2%) are significant ($F_{(6,41)}=330.1$; $X^2=0.9826$; $p < 0.0001$). EB 127, EB 272 and EB 725 showed to be less active than CHX 1% and 2%, but showed a significant activity when compared to CHX 0.12% ($p < 0.001$). Extract EB 934 showed an extremely significant activity in relation to CHX 0.12% and 1% ($p < 0.001$), and a similar activity if compared to CHX 2% ($p > 0.05$).

Table 1. Botanical information relative to the plant extracts that showed significant antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922.

Collection number	Family	Species	Extract number
PSC 136	Apocynaceae	<i>Microplumeria anômala</i>	EB 127
AAO 3330	Flacourtiaceae	<i>Casearia spruceana</i>	EB 272
AAO 3379	Combretaceae	<i>Buchenavia</i> sp.	EB 725
AAO 3505	Caryocaraceae	<i>Caryocar</i> cf. <i>microcarpum</i>	EB 934

Table 2. Results obtained from the disk diffusion assay done with for extracts (EB 127, EB 272, EB 725 and EB 934) and three standard drugs (CHX 0.12%, CHX 1% and CHX 2%) against *Escherichia coli* ATCC 25922. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test were used to analyze differences among means ($p < 0.05$).

	EB 127	EB 272	EB 725	EB 934	CHX0.12%	CHX1%	CHX2%
Minimum	7.000	7.000	7.000	13.85	0.0	11.00	12.35
25% Percentile	7.263	7.225	7.300	13.85	0.0	11.30	12.61
Median	7.975	7.600	7.650	13.95	0.0	11.88	13.00
75% Percentile	8.750	8.000	8.438	14.08	0.0	12.25	14.96
Maximum	8.900	8.000	8.550	14.30	0.0	13.00	15.00
Mean	7.983	7.583	7.775	13.98	0.0	11.86	13.50
Std. Deviation	0.7380	0.4355	0.5973	0.1693	0.0	0.6785	1.167
Std. Error	0.3013	0.1778	0.2438	0.06912	0.0	0.2770	0.4766
Lower 95% CI	7.209	7.126	7.148	13.81	0.0	11.15	12.27
Upper 95% CI	8.758	8.040	8.402	14.16	0.0	12.57	14.73

MIC's and MBC's related to the four extracts were assessed. EB 127, obtained from *Microplumeria* sp. showed MIC and $MBC \geq 700 \text{ mg/mL}$; EB 272, obtained from *Casearia* sp., showed $MIC = MBC = 600 \text{ mg/mL}$; EB 725, obtained from *Buchenavia* sp., showed $MIC = MBC \leq 400 \text{ mg/mL}$; and EB 934, obtained from *Caryocar* sp. presented $400 \text{ mg/mL} < MIC < 700 \text{ mg/mL}$.

In the present report, it was observed that most of our plants did not show antibacterial activity, but only four out of 1791 plant extracts. According to our experience, plants are more likely to be effective against Gram positive bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* or *Streptococcus* spp, than against Gram negative ones, such as *E. coli*. Results show that all four extracts are likely to be tested in further antibacterial and toxicological assays, and are going to be chemically studied, in order to track for major active compounds. Both DDA and MDBA results show that EB 934 is the most promising extract, while the other three extracts showed a similar

level of activity, barely compared to those observed for CHX1% and CHX2%. Further work is being carried out in this direction.

The present study showed the first steps into the discovery of new chemicals to fight animals' infectious diseases, obtained from the Brazilian Amazon rain forest. The four active extracts here identified as showing activity against *E. coli* were never studied before, in terms of its biological or chemical profiles. The present results will support our future work aiming the evaluation of the anti-*E. coli* activity of the four active plant extracts against clinical isolate *E. coli* strains, obtained from wild animals.

Acknowledgements

The authors want to thank FAPESP for support (grants # 2008/58706-8 and 2010/09694-7).

References

- AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; MINDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p. 230-234, 2000.
- AZEVEDO, C.M.A. Bioprospecção: Coleta de Material Biológico com a Finalidade de Expor os Recursos Genéticos. Reserva da Biodiversidade da Mata Atlântica-MAB-UNESCO. 2ed. São Paulo, cad. 17, mar.2003, p.35. Available at: <<http://www.semarnh.pb.gov.br/comites/rbma/pdf/cad17.pdf>>. Accessed in: 02/25/2010.
- CARLTON, W.W., McGAVIN, M. D. Patologia Veterinária Especial de Thomson. 2ed. 1998, Porto Alegre: Artmed, 67p.
- MARKEY, B.K. CARTER, M.E., DONNELLY, W.J. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas, 2005, Porto Alegre: Artmed, p. 512.
- CARVALHO, V.M., OSUGUI, L., SETZER, A.P. *et al.* 2012. Characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from captive wild felids with bacteremia. *J. Vet. Diag. Invest.*, *in press*, 2012.

- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, v.75, p.311-35. 2012
- SUFFREDINI, I.B., PACIENCIA, M.L.B., VARELLA, A.D., YOUNES, R.N. *In vitro* prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. *Pharmazie*, v.61, 722-24, 2006a.
- SUFFREDINI, I.B., PACIENCIA, M.L.B., VARELLA, A.D., YOUNES, R.N. Antibacterial activity of Brazilian Amazon plant extracts. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.10, p.400-402, 2006b.
- SUFFREDINI, I.B., SADER, H.S., GONÇALVES, A.G. *et al.* Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.37, p.379-384, 2004.
- WIEST, J.M.; CARVALHO, H.H.C.; AVANCINI, C.A.M.; GONÇALVES, A.R. Inibição e inativação *in vitro* de *Salmonella* spp. Com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, p. 119-127, 2009.

Situação do artigo em relação a revista

Em Segunda-feira, 20 de Janeiro de 2014 15:55, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia ? ABMVZ - Publicações Online <abmvz@abmvz.org.br> escreveu:

[PORTUGUÊS]

Esta é uma mensagem automática. Guarde este e-mail para referência. Não responda a este e-mail. Para contato use abmvz.artigo@abmvz.org.br

Prezado(a) Senhor(a),

Informamos que o status do manuscrito "Atividade anti-Escherichia coli de extratos de plantas brasileiras. Novas tendências em pesquisa veterinária / Anti-Escherichia coli activity of Brazilian plant extracts. New trends in Veterinary research" mudou para: Aprovado

Acesse <http://www.abmvz.org.br> para acompanhar a tramitação do seu trabalho.

Atenciosamente

Editor do ABMVZ

[ENGLISH]

This is an automatic message. Keep this e-mail as a reference. Please do not reply to it. For any contact with the ABMVZ use abmvz.artigo@abmvz.org.br

Dear author,

We inform you that the status of the manuscript "Atividade anti-Escherichia coli de extratos de plantas brasileiras. Novas tendências em pesquisa veterinária / Anti-Escherichia coli activity of Brazilian plant extracts. New trends in Veterinary research" changed to: Accepted for publication

Access <http://www.abmvz.org.br> to view manuscript details.

Sincerely yours

Editor - ABMVZ

Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato vegetal de *Microplumeria anomala* (Müll. Arg.) Ducke contra cepas de *Escherichia coli*

Camargo, L.R.P.¹; Diaz, I.E.C.²; Carvalho, V.M¹; Suffredini, I.B.^{1,2}

¹Graduate Program in Environmental and Experimental Pathology, Graduate and Research Vice-Dean Office, Paulista University, São Paulo, SP, Brazil

²Center for Research in Biodiversity, Paulista University, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence to: Ivana B. Suffredini, Laboratório de Extração, Núcleo de Pesquisas em biodiversidade, Universidade paulista, Av. Paulista, 900, 1 andar, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brazil, 01310-100. ibsuffredini@yahoo.com.br

Resumo

Escherichia coli é um dos principais patógenos envolvidos em doenças animais. A necessidade de se introduzir novas ferramentas para enfrentar as doenças – em particular aquelas causadas por patógenos multirresistentes – causadas por *Escherichia coli* em animais de produção, de companhia e selvagens é grande, em Medicina Veterinária. O Brasil tem um papel importante na busca por novos fármacos antimicrobianos de origem natural. O extrato bruto obtido de *Microplumeria anomala* mostrou atividade contra diferentes cepas de *E. coli* e foi fracionado com a finalidade de se identificar o composto ativo. EB127 e suas frações e compostos isolados foram testados no ensaio da disco difusão em agar (DDA) e na microdiluição em caldo (MDA). . EB127 se mostrou eficaz contra cepa 31/1A e 35A de *E. coli* no ensaio da DDA, quanto comparado com a cepa ATCC25922, mas se mostrou menos efetivo contra a cepa 51A. Além disso, as frações HexResCHCl₃ e 10%ACNResH₂O parecem estar diretamente envolvidas com a atividade antibacteriana de EB127. A fração HexResCHCl₃ mostrou-se a única ativa contra *E. coli* 35A, 10%ACNResH₂O mostrou-se ativa contra *E. coli* 51A e ambas as frações parecem estar envolvidas com a atividade antibacteriana contra *E. coli* 31/1A. Trabalhos ainda devem ser feitos, de modo a se identificar outros compostos presentes em EB127. O Lupeol, que foi isolado das frações apolares de EB127, parece não ter envolvimento na ação antibacteriana de EB127 contra a cepa de *E. coli* ATCC 25922.

Palavra chave: *Escherichia coli*, *Microplumeria anomala*, antimicrobianos

Abstract

Escherichia coli is one of the main pathogens involved in animal diseases. The introduction of new weapons to fight infections – in particularly those involving resistance - caused by *E. coli* in livestock, as well as pets and wild animals is urgent in Veterinary. Brazil is playing an important role in the search for new natural antibacterial antibiotics. The crude extract obtained from *Microplumeria anomala* showed activity against different strains of *E. coli* and was fractionated in order to identify active compounds. EB127 and its fractions and isolated compounds were tested in the disk diffusion assay (DDA) and in microdilution broth assay (MDA). EB127 showed the same efficacy against *E. coli* strains 31/1A and 35A in DDA, when compared to ATCC25922, but to be less effective against 51A. Also, fractions HexResCHCl₃ and 10%ACNResH₂O seem to be involved in the antibacterial activity of EB127. Fraction. HexResCHCl₃ was the only one showing antibacterial activity against *E. coli* 35A, 10%ACNResH₂O showed activity against *E. coli* 51A and both fractions seem to play a significant role in the antibacterial activity related to *E. coli* 31/1A. Further work involving the chemical profile of EB127 is needed so far. Lupeol, which has been isolated from apolar fractions, did not show activity against *E. coli* ATCC 25922.

Key words; *Escherichia coli*, *Microplumeria anomala* , antimicrobial

1 Introdução

A biodiversidade brasileira é mundialmente reconhecida por possuir um vasto acervo biológico. De acordo com a *Conservation International*, no Brasil encontra-se 20% da totalidade de espécies do mundo, sendo que apenas a Floresta Tropical Amazônica detém 17% da biodiversidade do país (Suffredini et al., 2006; Azevedo, 2003). Diante desta riqueza biológica, pesquisadores se empenham em descobrir e estudar novas espécies da fauna e flora. Atualmente, os extratos vegetais vem sendo cobiçados pela indústria farmacêutica, pois a procura de novos princípios ativos torna-se cada vez mais necessária, em função do aparecimento de resistência microbiana (Dolejská et al., 2008). *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa encontrada na microbiota intestinal da maioria dos animais de sangue quente. Muitas linhagens de *E. coli* são consideradas de baixa virulência, porém infecções oportunistas podem se desenvolver em indivíduos imunossuprimidos, desnutridos, neonatos e idosos, quando expostos à grande quantidade de patógenos, o que acaba por provocar o seu desequilíbrio no organismo, podendo acarretar doenças entéricas ou extra intestinais irreversíveis (Quinn, et al, 2005). Essa bactéria tem se destacado por ocasionar prejuízos econômicos inestimáveis na produção animal, provocando queda da produção, aumento dos gastos com tratamento, levando animais a óbito e até à condenação do lote (Langoni et al., 2011). Os animais selvagens e de companhia também podem ser acometidos por doenças provocadas por *E. coli*, que eventualmente causam rapidamente o óbito do animal, sem apresentar sinais clínicos (Carlton e McGavin 1998; Knobl, et al, 2008; Lara et al., 2008).

Perante os fatos, estudos referentes à identificação de novos agentes antimicrobianos de origem natural podem gerar a descoberta de novas moléculas a serem usadas no tratamento de doenças infectocontagiosas que tenham *E. coli* como agente patogênico. Sendo assim, 1791 extratos vegetais foram testados contra *E. coli*. Desses, quatro extratos brutos ativos apresentaram-se potencialmente ativos (Camargo e Suffredini 2013, *in press*), porém, como pouco se conhece sobre a farmacologia e a química desses extratos, pesquisas mais aprofundadas que identifiquem os compostos ativos, são necessárias. Dentre os extratos, destaca-se a espécie *Microplumeria anomala*, também conhecida como *Aspidosperma anomalum* (Müll. Arg.) e *Cylindrosperma anomalum* (Müll. Arg.) Ducke, pertencente à família Apocynaceae. Diversas espécies são conhecidas popularmente por “guatambu” ou “peroba”, entre *Aspidosperma*, (Gonçalves, 2006). Em algumas regiões da Amazônia os nativos utilizam a casca de uma determinada espécie de *Aspidosperma* para tratar malária (Azevedo et al., 2012). Ainda há poucos estudos referentes a *M. anomala*, mas já se sabe que há a presença de glicosídeos, triterpenos e alcaloides (Pinto e Ferreira, 2012; Suffredini et al., 2002; Cordell, 1998). Pesquisas realizadas por Cordell (1998) mostram a presença de alcaloides indólicos, extraídos da casca de *M. anomala* coletada às margens do Rio Negro, identificados como anomalina, 12-O-methylanomalina e demethoxylanomalina.

O presente estudo teve como objetivo o aprofundamento das análises químicas do extrato bruto de *M. anomala*, bem como avaliar a atividade antibacteriana do extrato e suas frações contra quatro cepas de *E. coli*.

2 Materiais e Métodos

2.1. Coleta de material botânico, produção e estocagem de extratos.

A coleta de material botânico foi feita na região Amazônica, sob licença do IBAMA/CGen/MMA. Uma exsicata do material encontra-se depositada no Herbário UNIP [PSC, 136, (UNIP)]. O extrato foi obtido por maceração de 24 horas, utilizado primeiramente a mistura de solventes compostos por metanol e diclorometano (1:1) (Merck) e água estéril (Milli-Q, Millipore). Por se tratar de um extrato orgânico, foi evaporado à pressão reduzida (Buchii) (Younes et al, 2007).

2.1.1. Preparo das amostras e substâncias de referência.

Para ser empregados nos experimentos, o extrato, suas frações e o composto isolado foram diluídos em dimetilsulfóxido 50% (DMSO50) em várias concentrações, a fim de se obter as concentrações inibitórias mínimas e concentrações bactericidas mínimas. Para a análise de disco difusão em ágar, as amostras foram testadas na concentração que foram preparadas, e para o ensaio da microdiluição em caldo, as amostras foram diluídas 20 vezes durante o experimento, por conta dos procedimentos. Foram usados doxiciclina, ampicilina, tetraciclina e enrofloxacin, obtidos de medicamentos veterinários encontrados no mercado, como compostos padrão. O gradiente de diluição empregado para todas as amostras foi de $\frac{1}{2}$.

2.2. Preparação dos meios de cultura

Meio Müller–Hinton agar (MHA) e Müller-Hinton caldo (MHC) foram preparados conforme instruções do fabricante, em condições estéreis.

2.2.3. Cepas bacterianas

Foram utilizadas bactérias pertencentes à espécie *Escherichia coli* ATCC 25922, obtidas de culturas frescas de 24 horas, cepas de *Escherichia coli* 31/1A, 35A e 51A obtidas da cloaca de aves marinhas (gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Vania Maria de Carvalho), as quais apresentavam os genes de virulência e resistência bacteriana, demonstrados na tabela 1.

Tabela1: Características genéticas relevantes das três cepas de *Escherichia coli*, coletadas de cloaca de aves marinhas.

Genes de Virulência	Nº Cepa		
	31/1A	35A	51A
<i>papC</i>	+	+	-
<i>fyuA</i>	+	+	-
<i>iucD</i>	+	+	-
<i>ibeA</i>	+	-	-
<i>malX</i>	+	+	-
<i>traT</i>	+	+	-
<i>colV</i>	+	+	-
<i>iroN</i>	+	+	-
<i>Ompt</i>	+	+	-
<i>hlyF</i>	+	+	-
<i>ISS</i>	+	+	-
<i>iutA</i>	+	+	-
Resistência a antibióticos	Amp., Am., Cef.	X	Amp., Am., Tet., Fluorq., Sulfa. + Trim

Legenda: Am. = amoxicilina; Cef = cefalexina; Amp.= Ampicilina; Tet.= tetracilina; Fluor. Fluorquinolona; Sulfa.=sulfametoxazol; Trim.= trimetoprim; ATBC =antibiótico; + =há a presença do gene de virulência; - = não há a presença do gene de virulência; X= sensível a antibióticos.

2.2.4 Ensaio da disco difusão em agar

Culturas frescas de cada uma das cepas de *E. coli* foram cultivadas em meio MHA. Para cada cepa foram preparadas suspensões bacterianas a 0,5 Mc Farland em soro fisiológico, que foram usadas para a análise de disco difusão, empregando-se *swabs* estéreis para se fazer a semeadura em

superfície de placas de Petri de 120 mm de diâmetro (Suffredini et al., 2004). Discos estéreis de papel filtro de 6 mm de diâmetro (Cefar) foram distribuídos sobre a placa de Petri. As amostras foram analisadas em triplicata. Para isso, foram colocados 10 µL sobre cada um dos três discos. As placas foram colocadas em uma estufa a uma temperatura 36°C, por 18-24 horas. Após este período, foi avaliada a atividade antibacteriana pela formação de um halo de inibição ao redor do disco, que foram medidos com auxílio de um paquímetro (Caliper Rule).

2.3. Ensaio da microdiluição em caldo

As amostras que apresentaram atividade no ensaio da disco difusão em agar foram submetidas ao teste da microdiluição em Mueller-Hinton caldo (MDC). Colônias frescas de *E. coli* foram obtidas e utilizadas para o preparo da suspensão bacteriana a 0,5 Mac Farland, preparadas em MHC. Foram adicionados 190 µL da suspensão feita em soro fisiológico em cada poço da microplaca de 96 poços e adicionados 10 µL de diferentes concentrações das amostras em cada poço, em duplicata. Por medida de controle experimental, alguns poços foram reservados para controle positivo (meio inoculado sem tratamento) e controle negativo (meio sem inóculo e sem tratamento).

Para os ensaios, as amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido 50%. Após este procedimento, as placas foram identificadas, tampadas e colocadas em estufa a 36 °C, por 24 horas. Como amostra padrão, foram utilizados antimicrobianos frequentemente utilizados no mercado *pet*, tendo sido testados em MDC para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). Cada antibiótico foi diluído de acordo com sua concentração descrito na bula, usando o diluente do fabricante, como

segue: a doxiciclina foi diluída a partir de 46mg/mL, ampicilina a partir de 20mg/mL, tetraciclina a partir de 50mg/mL e enrofloxacina a partir de 100mg/mL. Nos ensaios de MDC, os antibióticos foram diluídos 20 vezes.

Os resultados foram avaliados através da realização de sub-cultura em placas de Petri preparadas com meio Müller-Hinton agar, de modo que quadrados delimitantes foram desenhados no lado de fora da placa e identificados. Em cada quadrado identificado foi feito o espalhamento do caldo contido nos poços em análise. Após este procedimento, as placas foram tampadas e colocadas em uma estufa a 36°C, por 24h. Por meio deste método, foi possível confirmar a eficácia da atividade antibacteriana das amostras e se determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as concentrações bactericidas mínimas (CBM) para cada uma.

2.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas para o ensaio da disco difusão em agar foram realizadas por análise de variância Anova de uma entrada, com teste posterior de Tukey (GraphPadPrism). Os resultados foram considerados significativos se $p < 0.05$.

2.5. Fracionamento do extrato.

O extrato orgânico EB127 foi submetido à partição líquido-líquido (figura 2) para obter os resíduos clorofórmico (CHCl_3), butanólico (BuOH) e aquoso (H_2O). O extrato foi ressuspenso em metanol (MeOH) 90%, para ser submetidos à extração sucessiva com CHCl_3 e BuOH . As fases clorofórmica e butanólica resultantes foram evaporadas à temperatura ambiente na capela e a fase aquosa foi congelada e posteriormente liofilizada para remoção da água, obtendo-se os respectivos resíduos. O resíduo clorofórmio do extrato foi

submetido à cromatografia em coluna (CC) usando como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel os solventes hexano (Hex), diclorometano (DCM) e metanol (MeOH), visando à obtenção de 3 novas frações de diferente polaridade como esta representado na figura 2. Os resíduos BuOH e aquoso foram submetidos à cromatografia em coluna usando como fase estacionária sílica de fase reversa C-18 e como fase móvel a mistura de solvente acetonitrila (ACN):água (H₂O) 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA), na proporção de 10%, 50% e finalmente MeOH100%, obtendo-se três novas frações para cada resíduo (BuOH e aquoso); no final foram obtidas nove frações do extrato, para serem avaliadas biologicamente (Castilho et al., 2013).

O fracionamento das frações Hex e DCM foi feito por cromatografia em coluna (CC) usando como fase estacionaria sílica gel fase normal e como fase móvel a mistura de Hex, acetato de etila (AcOEt) e MeOH de polaridade crescente, após esse fracionamento. As frações obtidas serão cromatografadas em camada delgada analítica (CCD) e reveladas com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 20% seguido de aquecimento, com o intuito de reunir as frações similares. As frações reunidas que apresentarem uma mancha só serão consideradas como isoladas e as frações que apresentarem duas ou mais manchas serão submetidos à CCD preparativa, para o isolamento de cada mancha presente na fração, uma vez obtidos estes resultados as amostras que por CCD apresentem uma mancha só serão enviadas para análises por ressonância magnética nuclear (RMN) para a elucidação ou identificação da molécula correspondente (Castilho et al., 2013).

2.6. Obtenção do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da fração MeOH de CHCl_3 , das frações do resíduo BuOH e aquoso (anexos 1a 14).

As frações mais polares foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), já que amostras muito polares só podem ser trabalhadas em sílica de fase reversa, do contrario perderíamos amostra, por essa razão foi realizado o perfil cromatográfico em CLAE. As amostras foram pesadas (1mg), solubilizadas em MeOH (2 mL) (com poucas mudanças) e filtradas com filtros MillexTM JBR13LCR1 da Millipore (0,45 μM). O sistema de eluentes foi A: água 0,1% de TFA, B: acetronitrila de grau HPLC, filtrado com filtro Phenex Filter Membranes (AFO-0504) de Nylon (0,45 μM) de 47 mm de diâmetro, a corrida cromatográfica foi em sistema gradiente: $T_{0 \rightarrow 5} = 5\%$ de B, $T_{5 \rightarrow 35} = 5\%$ de B até 100% B, $T_{35 \rightarrow 40} = 100\%$ de B, $T_{40 \rightarrow 50} = 100\%$ de B até 5% de B, $T_{50 \rightarrow 55} = 5\%$ de B, no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da Agilent, com detector UV (254 nm) e detector DAD, volume de injeção foi de 20 μL .

2.7 Ressonância magnética nuclear

Lupeol (figura 2) foi isolado como um sólido esbranquiçado, amorfo das frações hexano e diclorometano, e levado à análise em ressonância magnética nuclear (Bruker) de hidrogênio (500 MHz) e de C^{13} (125 MHz), diluído em clorofórmio deuterado (Tedia Brasil) (anexo 15).

Lupeol - White powder (210.4 mg). ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.77 (Me-24, s), 0.79 (Me-28, s), 0.84 (Me-25, s), 0.96 (Me-27, s), 0.98 (Me-23, s), 1.04 (Me-26, s), 1.69 (Me-30, s), 2.39 (H-19, *ddd* $J=11.16, 11.16, 5.71$), 3.20 (H-3 α , *dd* $J=11.42, 4.67$), 4.58 (H-29a, *m*), 4.70 (H-29b, *m*). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 14.55 (C-27), 15.36 (C-24), 15.98 (C-26), 16.11 (C-25), 18.01 (C-28), 18.32 (C-6), 19.31

(C-30), 20.94 (C-11), 25.16 (C-12), 27.43 (C-2, 15), 27.99 (C-23), 29.86 (C-21), 34.29 (C-7), 35.59 (C-16), 37.18 (C-10), 38.07 (C-13), 38.72 (C-1), 38.86 (C-4), 40.01 (C-22), 40.85 (C-8), 42.84 (C-14), 43.00 (C-17), 47.99 (C-19), 48.32 (C-18), 50.46 (C-9), 55.31 (C-5), 79.02 (C-3), 109.31 (C-29), 150.98 (C-20) (Mahato et al., 1994).

Resultados

Na figura 1 estão representados os resultados referentes à atividade antimicrobiana de EB127 contra as quatro cepas de *E. coli* estudadas. EB127 mostrou-se tão eficaz contra as cepas 31/1A e 51A quanto para a cepa ATCC25922 ($p>0.05$), mas mostrou-se menos eficaz contra a cepa 35A ($p<0.01$).

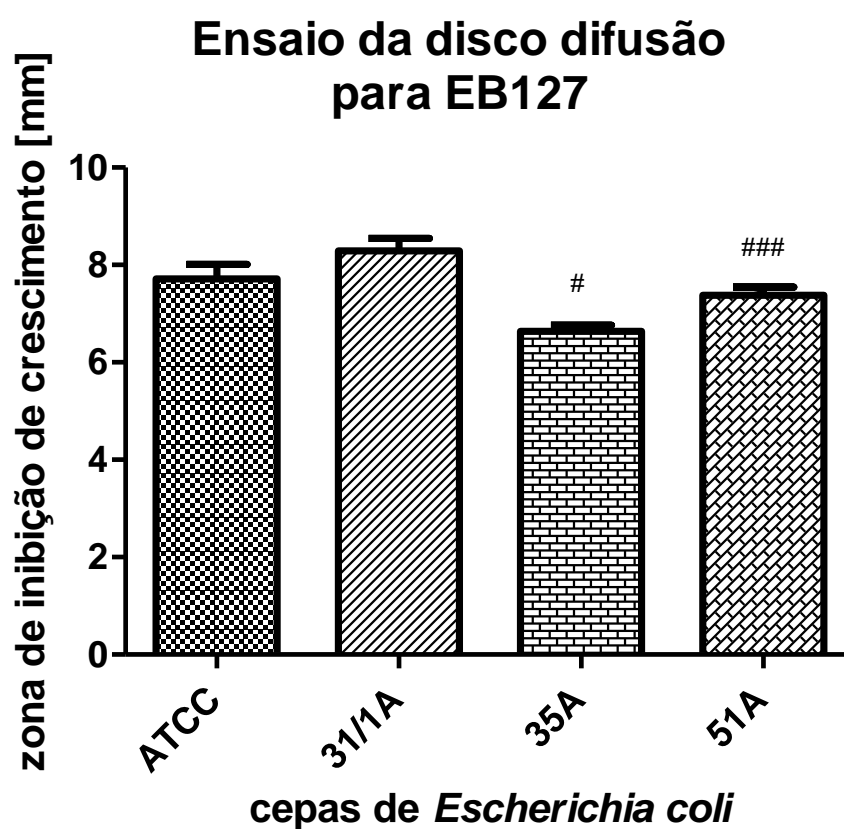


Figura 1. Resultados obtidos do ensaio da disco difusão em ágar, no qual o extrato bruto EB127 obtido de *Microplumeria anomala* foi testado contra quatro cepas de *Escherichia coli*. Diferenças estatísticas foram obtidas a partir de análise de variância do tipo ANOVA de uma entrada, com análise posterior de Tukey. Significância $p<0.05$.

A figura 2 representa o fluxograma usado para obtenção das frações do extrato bruto EB127.

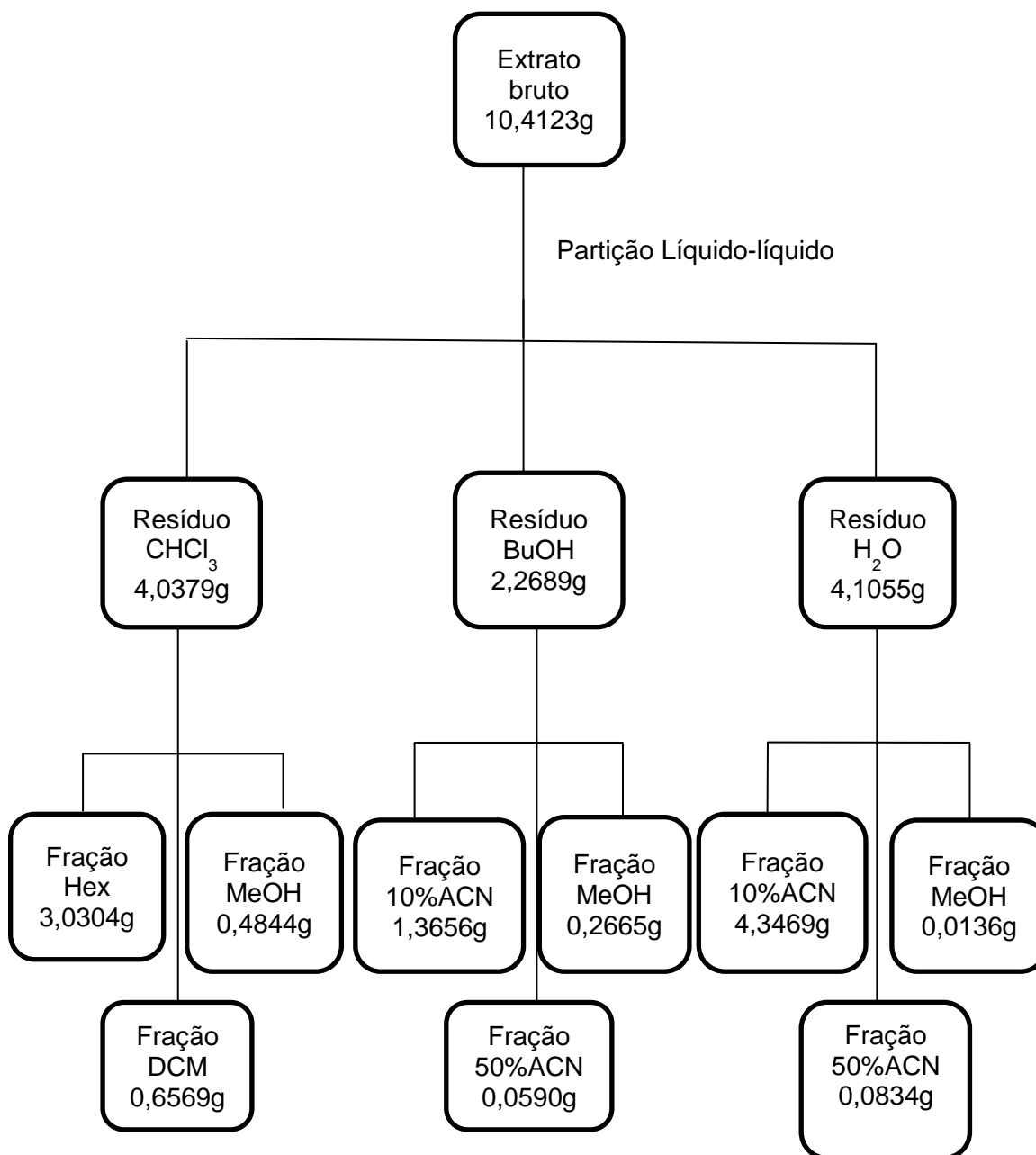


Figura 2. Esquema representativo do fracionamento do extrato bruto EB127 usando técnicas de cromatografia e de partição líquido-líquido. CHCl₃= Clorofórmio; BuOH = Butanol; Sepha = Sephadex LH-20; CC = Cromatografia em coluna; Hex = Hexano; DCM = Diclorometano; MeOH = Metanol; ACN = Acetonitrila; H₂O = Água

A figura 3 mostra os resultados obtidos da análise antibacteriana das frações de EB127.

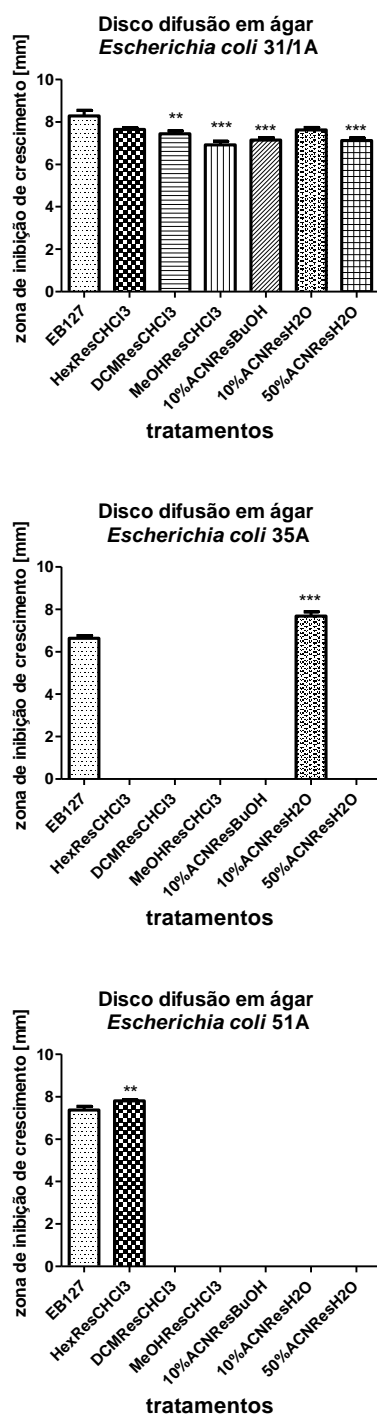


Figura 3. Resultados obtidos da análise antibacteriana de EB127 e suas frações frente a cepas de *Escherichia coli*, no modelo da disco difusão em agar. Resultados obtidos por análise de variância do tipo ANOVA de uma entrada, com análise posterior de Tukey. Significância $p < 0.05$.

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos da análise de antibióticos disponíveis no mercado *pet*. Doxíciclina, ampicilina, tetraciclina e enrofloxacina foram usados na forma injetável, no ensaio da microdiluição em caldo, para se obter a CIM e a CBM, como substâncias de referência.

Tabela 2: Resultados referentes à concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato bruto EB127, frente às quatro cepas de *Escherichia coli* testadas em microdiluição em caldo preparadas em diferentes concentrações usando o ensaio da microdiluição em caldo e resultados dos antibióticos usados como substâncias de referência no ensaio.

Cepas	Concentração		
	1.5x10 ² UFC/mL	1.5x10 ³ UFC/mL	1.5x10 ⁴ UFC/mL
<i>E. coli</i> ATCC25922	CIM=CBM=300mg/mL	CIM=CBM=300mg/mL	CIM=CBM=300mg/mL
<i>E. coli</i> 31/1A	CIM=CBM=200mg/mL	CIM=CBM=200mg/mL	CIM=CBM=500mg/mL
<i>E. coli</i> 35A	CIM=CBM=300mg/mL	CIM=CBM=300mg/mL	CIM=CBM>1000mg/mL
<i>E. coli</i> 51A	CIM=CBM=500mg/mL	CIM=CBM>1000mg/mL	CIM=CBM>1000mg/mL
1.5x10 ⁸ UFC/mL			
	CIM	CBM	
Doxiciclina	0,36 mg/mL	0,72 mg/mL	
Ampicilina	1,25 mg/mL	2,5 mg/mL	
Tetraciclina	0,20 mg/mL	0,20 mg/mL	
Enrofloxacina	<3,125 µg/mL	<3,125 µg/mL	

Legenda: CIM=concentração inibitória mínima; CBM=concentração bactericida mínima; UFC/mL= unidades formadoras de colônia por mililitros.

Figura 4. Esquema representativo do fracionamento do resíduo CHCl_3 , para obtenção de novas frações a partir das frações Hex e DCM, usando técnicas de cromatografia. CCDA = cromatografia em camada delgada analítica; RMN = ressonância magnética nuclear; CHCl_3 = clorofórmio; Sephadex = Sephadex LH-20; CC = cromatografia em coluna; Hex = hexano; DCM = diclorometano; MeOH = metanol; A = lupeol.



A figura 5 representa a atividade de EB127, suas frações e o composto isolado, lupeol, frente a *E. coli* ATCC25922.

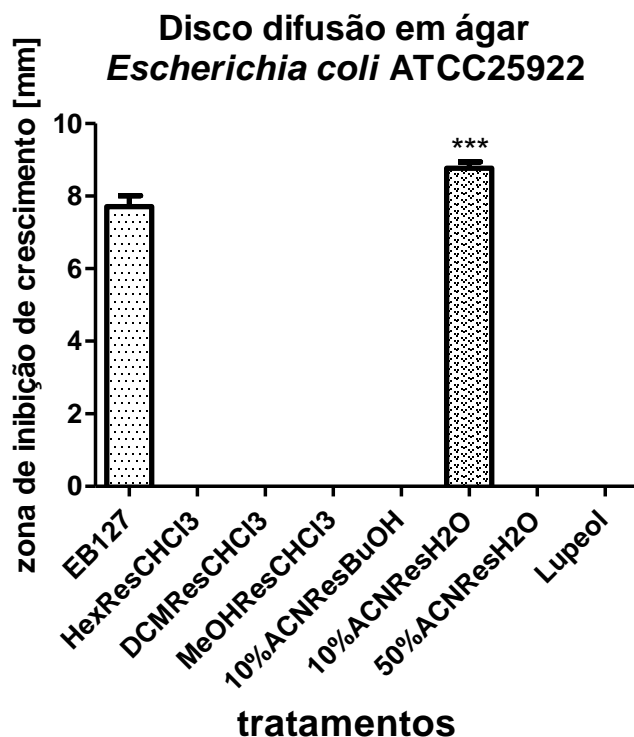


Figura 5. Resultados obtidos da análise antibacteriana de EB127 e suas frações e composto isolado, lupeol, frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC25922, no modelo da disco difusão em ágar. Resultados obtidos por análise de variância do tipo ANOVA de uma entrada, com análise posterior de Tukey. Significância $p < 0.05$.

Alcaloides foram identificados na fração metanólica originada do resíduo clorofórmico, mediante a revelação com reagente de Dragendorff (figura 4). Esses alcaloides se encontram em fase de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas.

Discussão

E. coli é um patógeno, que frequentemente apresenta cepas com multirresistência a antibióticos (Dolejská et al., 2008), cujas doenças causam grande impacto na economia voltada à Veterinária. A partir da utilização do ensaio da disco difusão em agar, foi realizado uma triagem em grande escala com o intuito de se encontrar novos extratos vegetais capazes de provocar inibição total ou parcial do crescimento bacteriano, para futuramente desenvolver novos medicamentos a serem usados em animais domésticos, selvagens e de produção (Camargo e Suffredini, 2014, *in press*).

Do programa de triagem, foi identificado o extrato bruto EB127 como ativo contra *E. coli* ATCC25922. Esse extrato foi testado em isolados de *E. coli* obtidos de cloaca de aves que apresentavam diferenças em relação à resistência a antibióticos e ao grau de virulência. EB127 apresentou atividade contra as três cepas, além da cepa ATCC, sendo que a ordem decrescente de atividade observada foi ATCC=31/1A>51A>35A. A cepa 35A, a que apresenta nenhuma resistência a antibióticos, foi a menos sensível à ação do extrato, ao passo que a cepa 31/1A apresentou o mesmo grau de sensibilidade que a cepa ATCC. Em seguida, EB127 foi fracionado, para que os compostos ativos fossem identificados. Para tanto, o fracionamento biodirecionado foi realizado, ou seja, as frações prioritariamente selecionadas para serem estudadas do ponto de vista químico são as que apresentam atividade antibacteriana. A partir de EB127, nove frações foram obtidas, em quantidades diferentes. Algumas não foram testadas por não terem massa suficiente e, portanto, não constam nos resultados. As frações obtidas foram testadas contra as quatro bactérias, e

observou-se que a fração apolar HEXResCHCl₃ apresentou-se ativa tanto contra a cepa 31/1A (virulência e resistência) quanto contra a cepa 51A (sem virulência e com muita resistência). Já a fração polar 10%ACNResH₂O apresentou atividade contra a cepa 31/1A e contra a cepa 35A (virulência e sem resistência). Sugere-se que pode haver a possibilidade de os genes de virulência e de resistência terem gerado sítios alvo para os compostos presentes em EB127, ao se comparar os resultados obtidos com as frações ativas. Porém, ainda é necessário avaliar quais os compostos químicos presentes nas duas frações que podem ser os responsáveis pela atividade antibacteriana observada.

Frente à necessidade de se identificar os compostos ativos, as frações hexânica e diclorometano do resíduo clorofórmico foram selecionadas para serem estudadas, visto que eram as de maior massa e de fácil manipulação pois, por se tratarem de frações apolares, podem ser trabalhadas na bancada.

Dessas frações, foi isolado o lupeol, que não apresentou atividade contra nenhuma cepa estudada. O lupeol é um triterpenoide, pertencente à classe dos terpenos, que são considerados metabólitos secundários de origem vegetal. Os processos metabólitos podem se dividir em primários e secundários. Os metabólitos primários estão envolvidos com as funções essenciais, tais como transporte de solutos (lipídeos, clorofila, aminoácidos, dentre outros), respiração e fotossíntese. Já os metabólitos secundários geralmente estão relacionados com a sobrevivência da planta (defesa contra patógenos, herbívoros e radiação solar e atraem polinizadores, micro-organismos simbiotes e dispersores de sementes) (DUARTE, 2012). O lupeol geralmente é encontrado em algumas plantas de uso medicinal e em frutas

como uvas, morangos, manga, figo e azeitonas. Estudos recentes mostram que o lupeol vem sendo estudado e possui ação antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral principalmente contra tumores de cabeça, pescoço e melanomas (NITTA, et al., 2013). No presente estudo, outras moléculas estão sendo isoladas e serão testadas, caso haja massa suficiente, nos modelos biológicos propostos.

Conclusão

Diante dos estudos realizados, verificou-se que EB127 apresentou atividade contra as quatro cepas de *E. coli* testadas, mas tanto EB127 quanto sua fração apolar apresentaram atividade contra a cepa 51A, e tanto EB127 quanto sua fração polar apresentaram atividade contra a cepa 35A, e ambas as frações apresentaram atividade contra 31/1A. O lupeol, composto isolado da fração apolar, não apresentou atividade contra nenhuma das cepas estudadas.

Referências

- Azevedo, A., Vieira, I.J.C., Veja, M.R.G., Guimarães, H.A., Filho, R.B. 2012. Alcalóides isolados das cascas de *Aspidosperma discolor* (Apocynaceae). IV Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica – Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- Azevedo, C. M. A., 2003. Bioprospecção: Coleta de material biológico com a finalidade de expor os recursos genéticos. Reserva da biodiversidade da Mata Atlântica-MAB-UNESCO. 2ªed. , cad. 17, p.35.
- Camargo, L. R.P., Suffredini, I.B. Atividade anti-*Escherichia coli* de extratos de plantas brasileiras. Novas tendências em pesquisa veterinária. 2014. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. (in press).
- Carlton W. W., McGavin, M. D., 1998. Patologia Veterinária Especial de Thomson . Trad. Barros, C. S. L. 2ªed., Artmed, Porto Alegre.
- Castilho, A.L., Saraceni, C.H.C., Díaz, I.E., Paciencia, M.L., Suffredini, I.B. 2013. New trends in dentistry: plant extracts against *Enterococcus faecalis*. The efficacy compared to chlorhexidine. Brazilian Oral Reserch, v. 27, n.2, p. 109-115.
- Cordell, G.A. (ed) 1998. The Alkaloids. Academic Press, California, Vol. 51, p.27.
- Dolejská, M. Šenk, D, Čížek, A, Rybaříková, J., Sychra, O., Literák, I. 2008. Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech farms. Research in Veterinary Science 85, 491-494.
- Duarte, A.F.S. 2012. Estudo fitoquímico, toxicidade e atividade biológica (antioxidante antimicrobiana e alelopática) de cascas de *Guettarda uruguensis* Cham. & Schltdl. Rubiaceae. Dissertação de Mestrado de Pós - Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Cuiabá, 117f.

- Gonçalves, T. A. P. 2006. Contribuição ao conhecimento da anatomia da madeira das famílias: Anacardiaceae, Annonaceae, Aquifoliaceae, Apocynaceae e Araliaceae, através de amostras carbonizadas do lenho de espécies brasileiras. Monografia de curso de Engenharia Florestal - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-Instituto de Florestas- Departamento de Silvicultura.116f.
- Knöbl, T., Godoy, S. N., Matushima, E. R., Guimarães, M.B., Ferreira, A.J.P. 2008. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 45, p. 54-60.
- Langoni, H., Penachio, D.S., Citadella, J.C.C., Laurino, F., Faccioli-Martins, P.Y., Lucheis, S.B., Menozzi, B.D. e Silva, A.V. 2011. Aspectos Microbiológicos e de qualidade do leite bovino. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.31, n.12, p.1059-1065,
- Lara, V. M., Donadeli, M. P., Cruz, F. S. F., Carregaro, A.B. 2008. Multirresistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de cadelas com piometra. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, n.4, p.1032-1034.
- Nitta, M., Azuma, K., Hata, K., Takahashi, S., Ogiwara, K., Tsuka, T., Imagawa, T., Yokoe, I., Osaki, T., Minami, S., Okamoto, Y. 2013. Systemic and local injections of lupeol inhibit tumor growth in a melanoma-bearing mouse model. Journal Biomedical Reports – Spandidos Publications, v.1, p. 641-645.
- Pinto, A.C., Ferreira, V.F., Silva, F.C. 2012. Otto R. Gottlieb e as Conexões com o Brasil de Ernest Wenkert – Revista Química Nova, v.35, n. 11, p. 2317-2323.
- Quinn, P.J., Markey, B. K. Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C. 2005. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. In: Weiss, L. H. N., Weiss, R. D. N. Artmed, Porto Alegre, p. 512.
- Suffredini, I.B., Paciencia, M.LB., Nepomuceno, D.C., Younes, R.N., Varella, A.D. 2006. Antibacterial and Cytotoxic Activity of Brazilian Plant Extracts –

Clusiaceae.– Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.101, n3. DOI:
10.1590/S0074-02762006000300011

Suffredini, I.B., Sader, H.S., Gonçalves, A.G., Reis, A.O., Gales, A.C., Varella, A.D.,
Younes, R.N. 2004. Screening of antibacterial active extracts obtained from
plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. Brazilian
Journal of Medical and Biological Research. v.37, n.3, p. 379-384.

Suffredini, I.B., Bacchi, E.M., Sakuda, T.M.K., Ohara, M.T., Younes, R.N., Varella, A.D.
2002. Atividade Antibacteriana de Extratos de Apocynaceae e CIM de Extrato
Orgânico de Caule de *Tabernaemontana angulata*–Revista Brasileira de
Ciências Farmacêuticas, v.38, n.1.

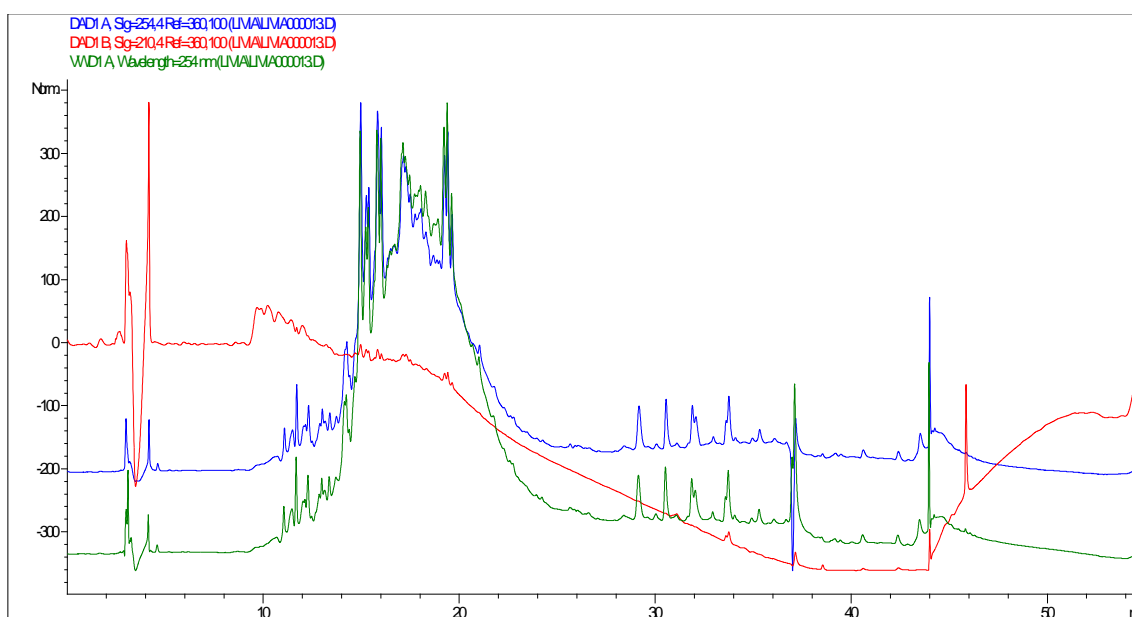
Younes, R. N., Varella, A. D., Suffredini, I. B. 2007. Discovery of new antitumoral and
antibacterial drugs from brazilian plant extract using high throughput screening.
CLINICS, v.62, n.6, p.763-768.

Situação do artigo em relação à revista

O artigo “**Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato vegetal de *Microplumeria anomala* (Müll. Arg.) Ducke contra cepas de *Escherichia coli***”, parte integrante desse trabalho, ainda se encontra em fase de conclusão de obtenção de resultados. Posteriormente, será estudado o tipo de revista que se enquadra o assunto abordado.

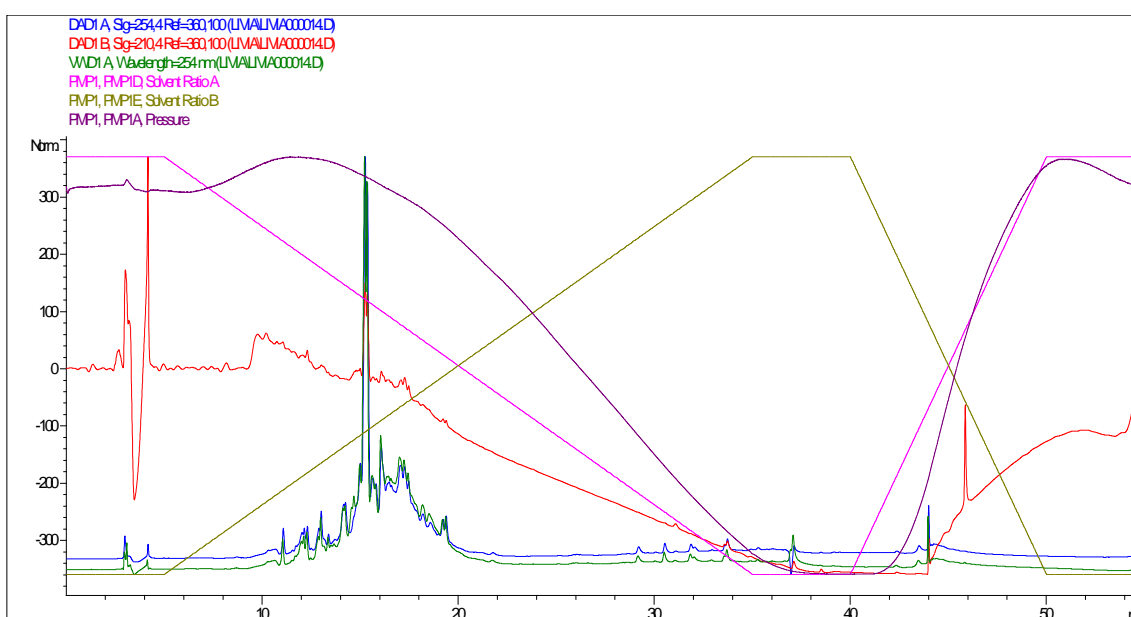
ANEXOS

Dados referentes ao perfil cromatográfico das frações de EB127 e dados da ressonância magnética nuclear.



Anexo 1.- Cromatograma da fração MeOH do resíduo CHCl_3 esta amostra não é totalmente solúvel em MeOH. Legenda:vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul: cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.

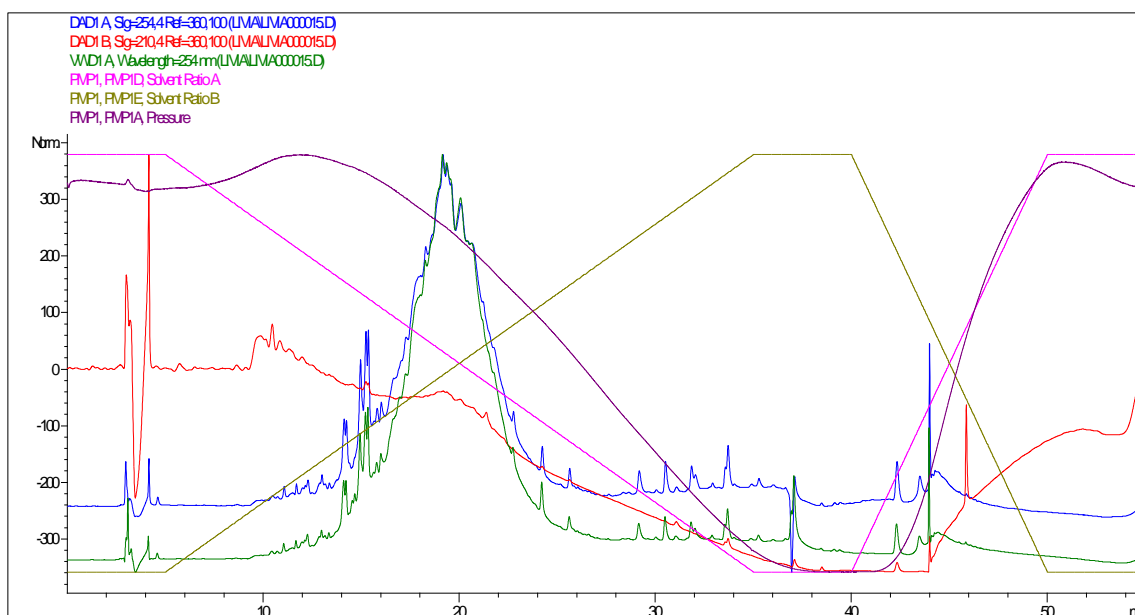
O cromatograma da fração obtida com 10% de ACN do resíduo BuOH (anexo 2) apresenta picos de absorção nos primeiros 20 minutos de corrida cromatográfica, e está de acordo com o esperado, porque se trata de uma amostra polar. A coluna é de fase reversa e a corrida cromatográfica inicia-se com maior proporção de água (mais polar), que diminui à medida que o tempo passa (diminuindo também a polaridade da fase móvel). A partir dessa análise, pode-se inferir que a fração é composta primordialmente de compostos polares.



Anexo 2.- Cromatograma da fração obtida com 10% ACN do resíduo BuOH.

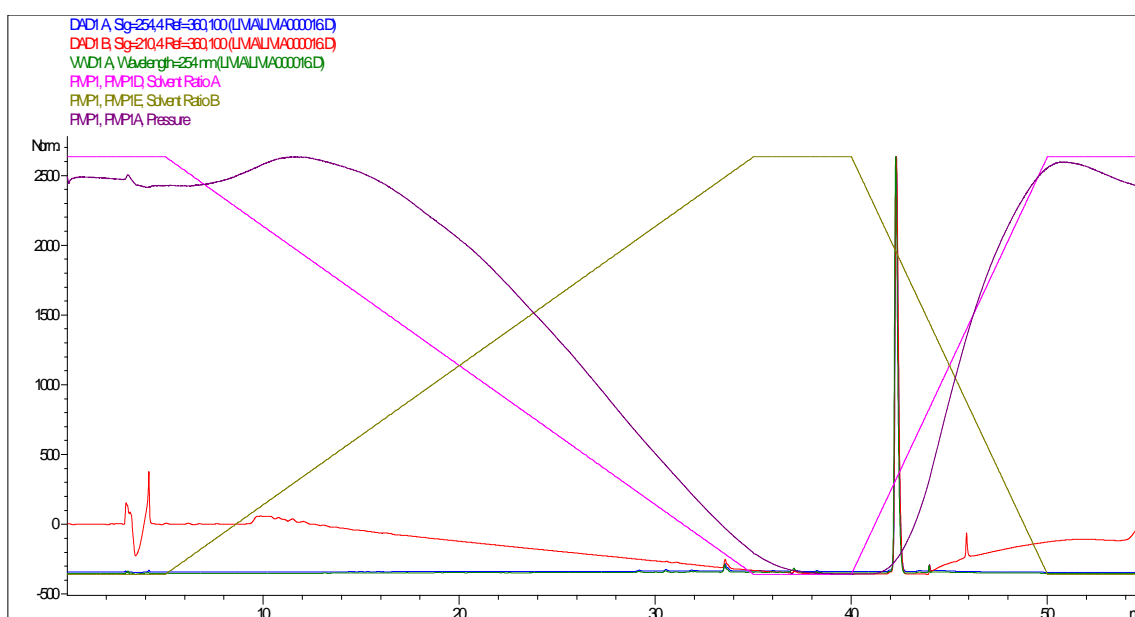
Legenda: vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul: cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.

O cromatograma da amostra obtida com 50% de ACN do resíduo BuOH apresenta picos a partir dos 14 minutos e se estende até os 24 minutos, o que está condizente com a amostra, por que foi extraída com 50% de ACN, significando que é menos polar que a de 10% ACN.



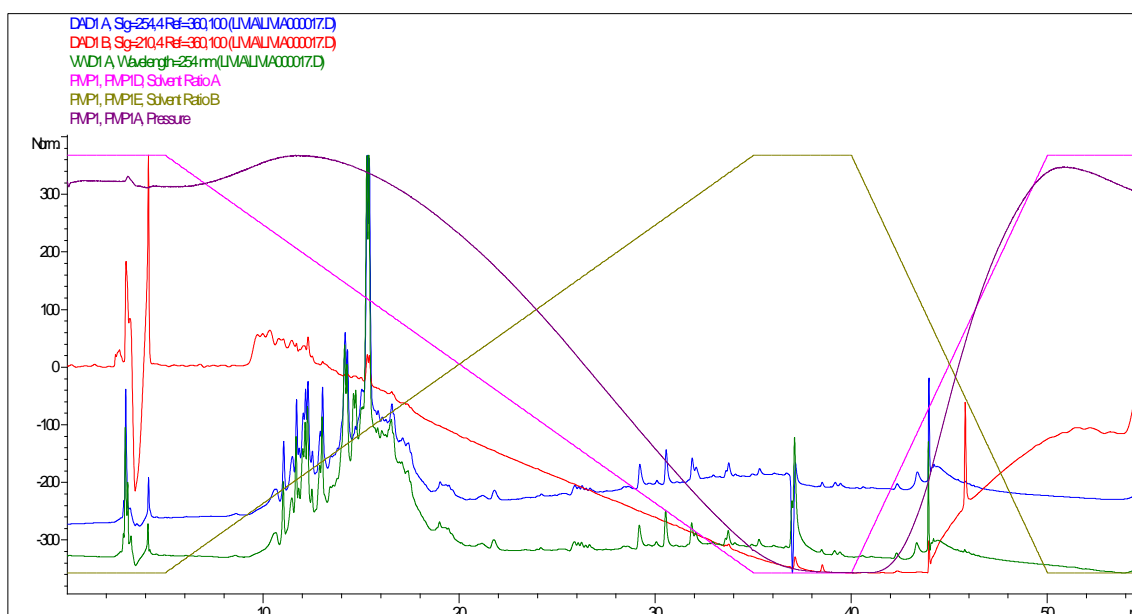
Anexo 3.- Cromatograma da fração obtida com 50% ACN do resíduo BuOH. A amostra não é totalmente solúvel em MeOH. Legenda: vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul: cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.

A partir da análise do cromatograma obtido da fração 100% MeOH do resíduo BuOH (anexo 4), conclui-se que se trata de uma amostra simples, cuja confirmação do grau de pureza é necessária, a ser realizada através da submissão da amostra a outro método de corrida cromatográfica.

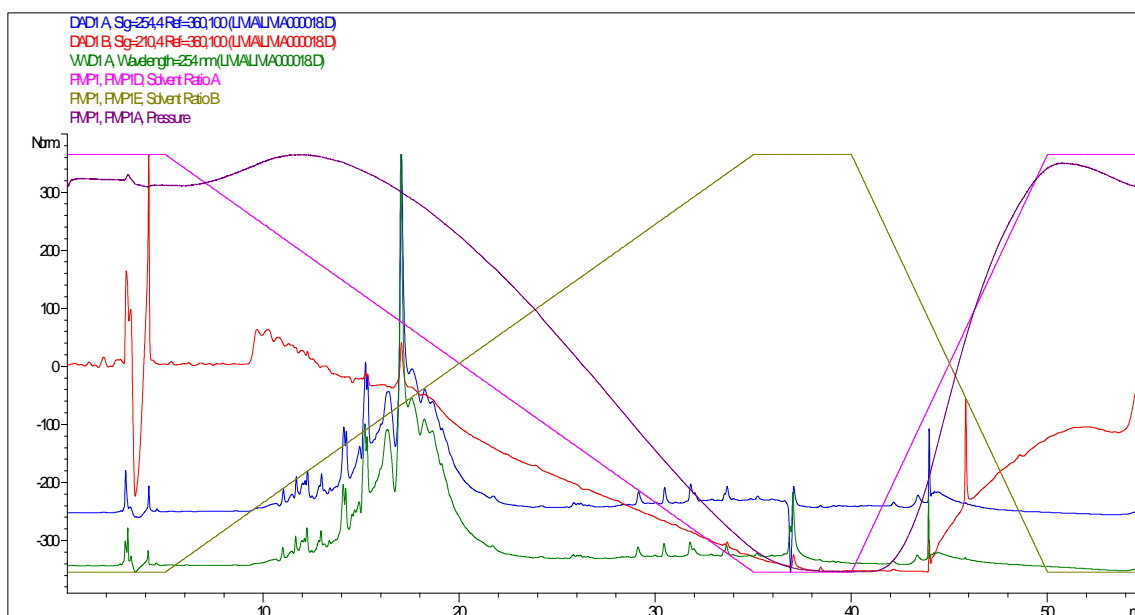


Anexo 4.- Cromatograma da fração obtida com 100% MeOH do resíduo BuOH. Legenda: vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul: cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.

O cromatograma da amostra obtida com 10% ACN do resíduo aquoso (anexo 5) é muito parecido com o cromatograma da anexo 3 (cromatograma da fração obtida com 10% ACN do resíduo BuOH) e ao mesmo tempo também é parecido com o cromatograma da anexo 7.



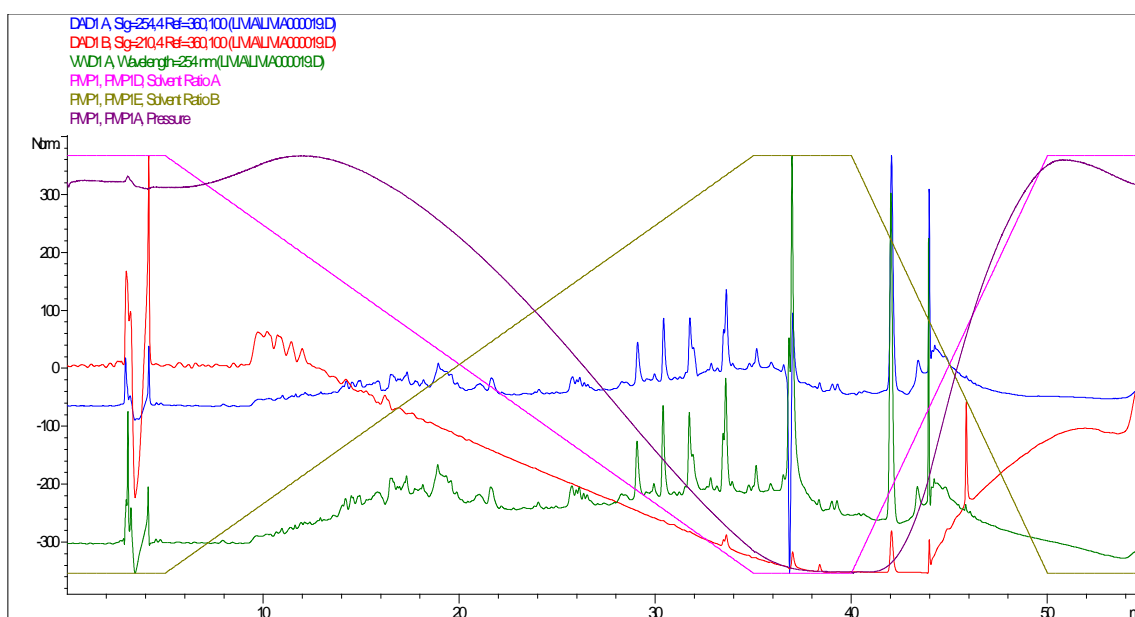
Anexo 5.- Cromatograma da fração obtida com 10% ACN do resíduo H₂O (não é totalmente solúvel em MeOH). Legenda: vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul: cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.



Anexo 6.-Cromatograma da fração obtida com 50% ACN do resíduo H₂O.

Legenda: vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul: cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.

O cromatograma obtido com 100% MeOH do resíduo aquoso (anexo 7), apresenta picos bem definidos e bem separados a partir dos 28 minutos da corrida cromatográfica.

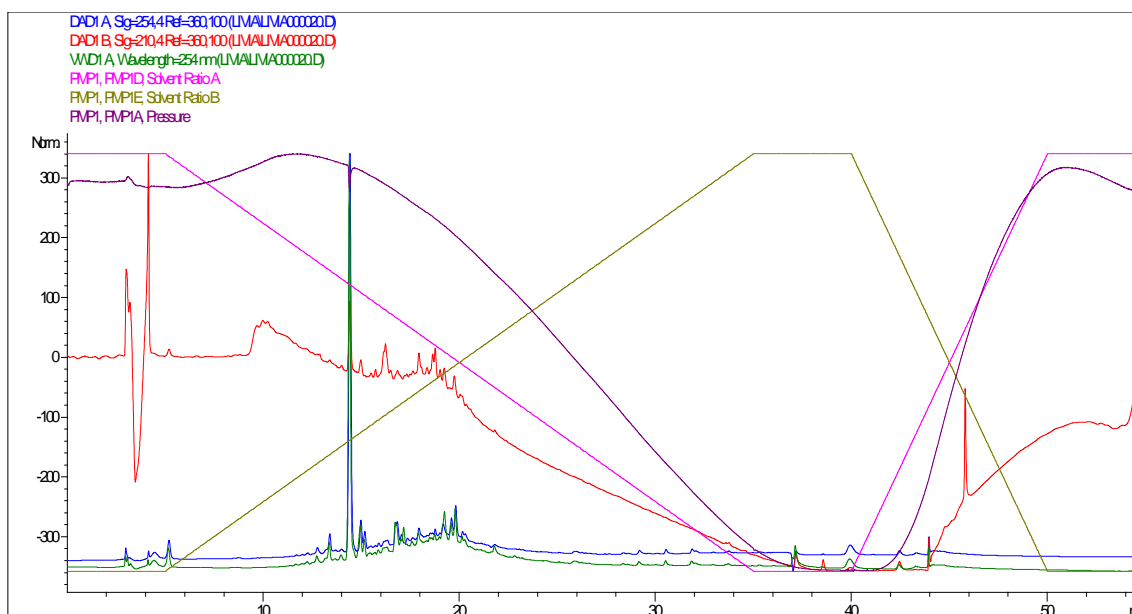


Anexo 7.-Cromatograma da fração obtida com 100% MeOH do resíduo H₂O.

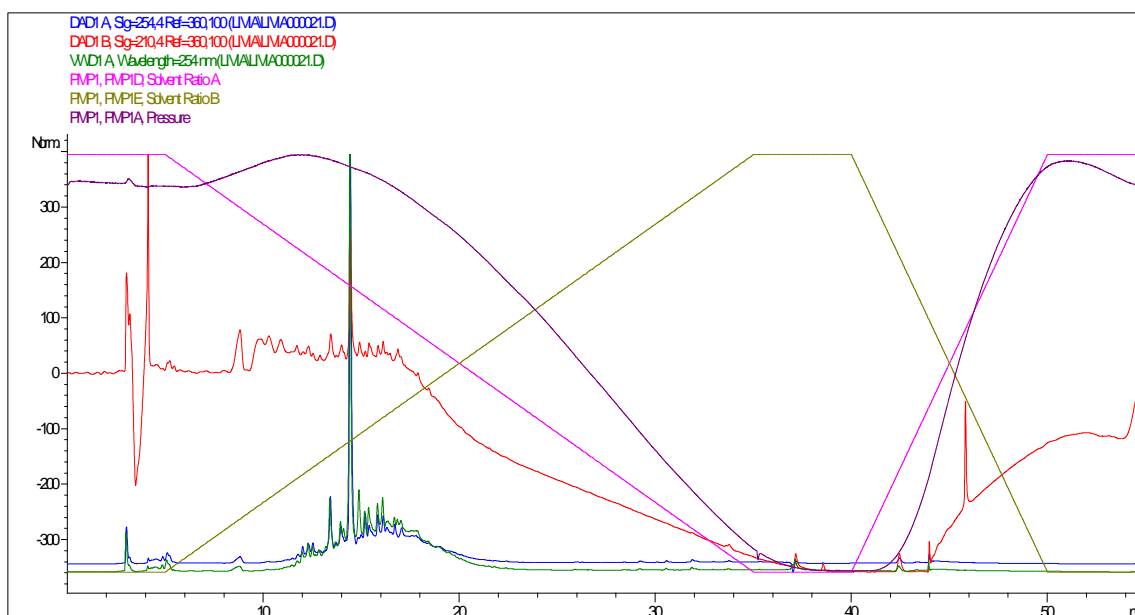
Legenda: vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul:

cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.

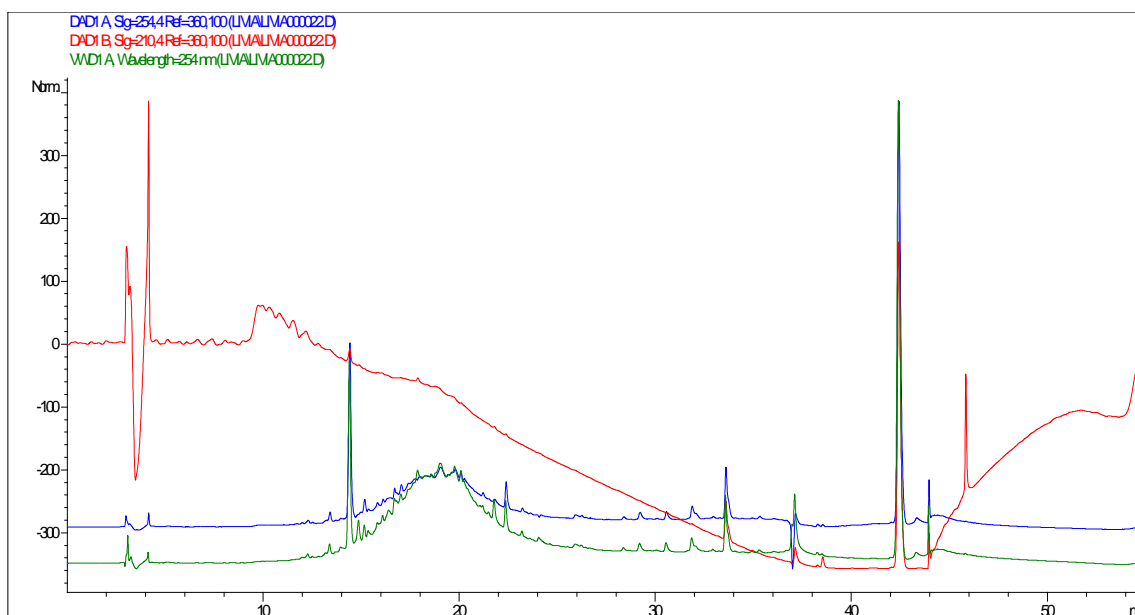
Para o extrato 272, são apresentados cromatogramas obtidos de cada fração. No cromatograma da fração de MeOH do resíduo CHCl_3 (anexo 8) observa-se um pico majoritário por volta de 14 minutos, o que também pode ser visto no cromatograma da fração obtida com 10% ACN do resíduo BuOH (anexo 19) e na amostra obtida com 50% ACN do resíduo BuOH (anexo 10), com a diferença de que apresenta mais picos em tempo após os 14 minutos (até 25 minutos).



Anexo 8.- Cromatograma da fração obtida com MeOH do resíduo CHCl_3 (não é completamente solúvel). Legenda: vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul: cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.

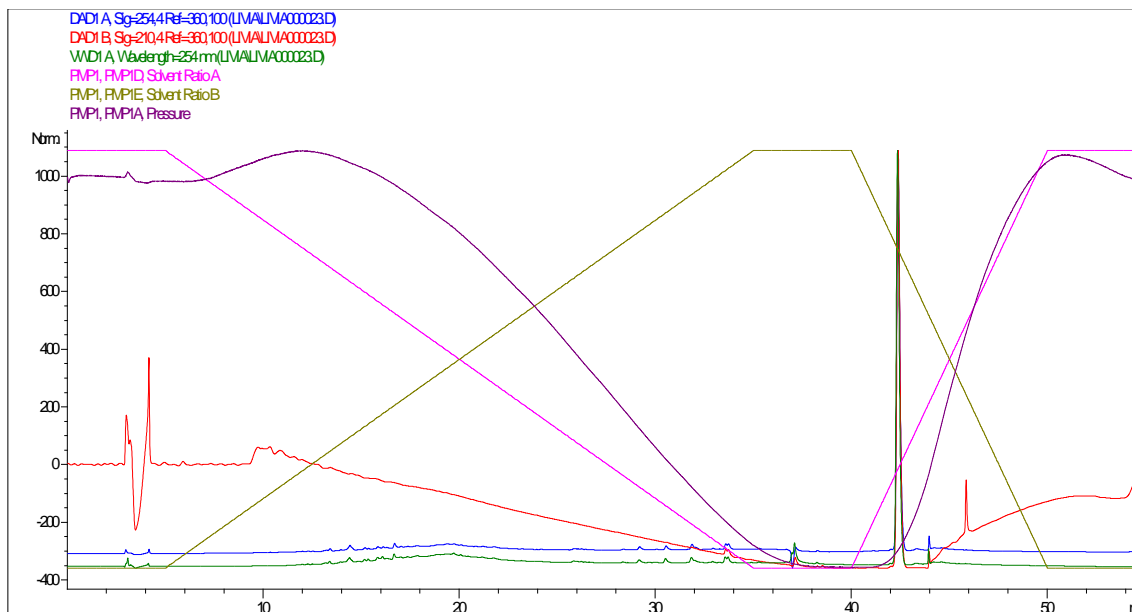


Anexo 9.- Cromatograma da fração obtida com 10% ACN do resíduo BuOH (amostra solubilizada em 50% MeOH H₂O). Legenda: vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul: cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.



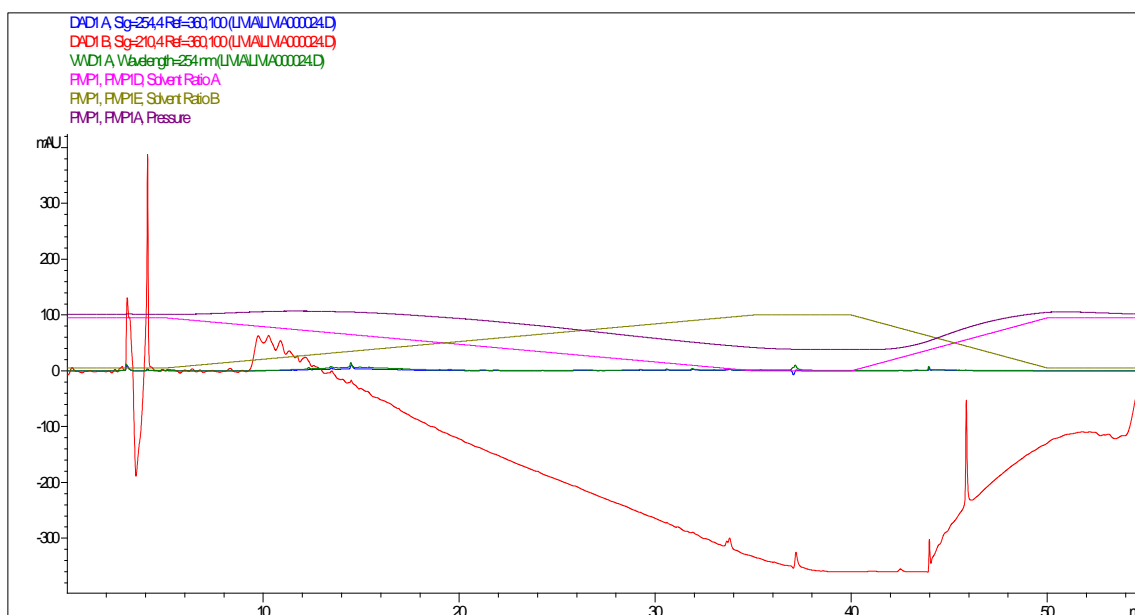
Anexo 10.- Cromatograma da fração obtida com 50% ACN do resíduo BuOH. Legenda: vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul: cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.

O cromatograma da fração obtida com 100%MeOH do resíduo BuOH (anexo 11) apresenta um pico muito intenso aos 42 minutos.



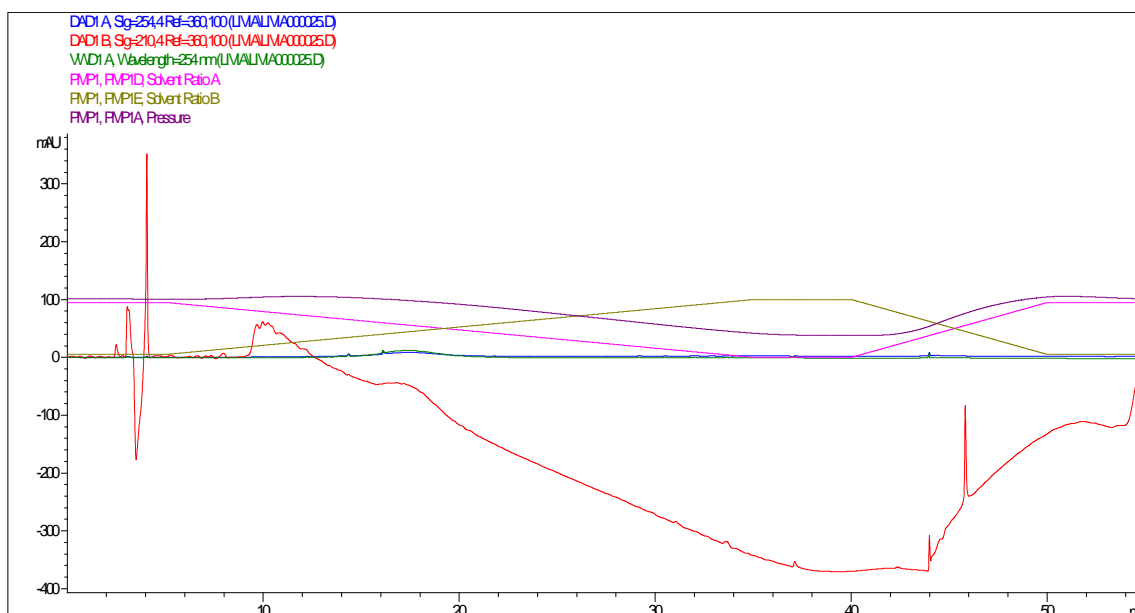
Anexo 11.-Cromatograma da fração obtida com 100% MeOH do resíduo BuOH. Legenda: vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul: cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.

Os cromatogramas das frações obtidas como 10% ACN (anexo 12), 50% ACN (anexo 13) e 100% MeOH (anexo 14) do resíduo aquoso apresentaram pico de absorção.

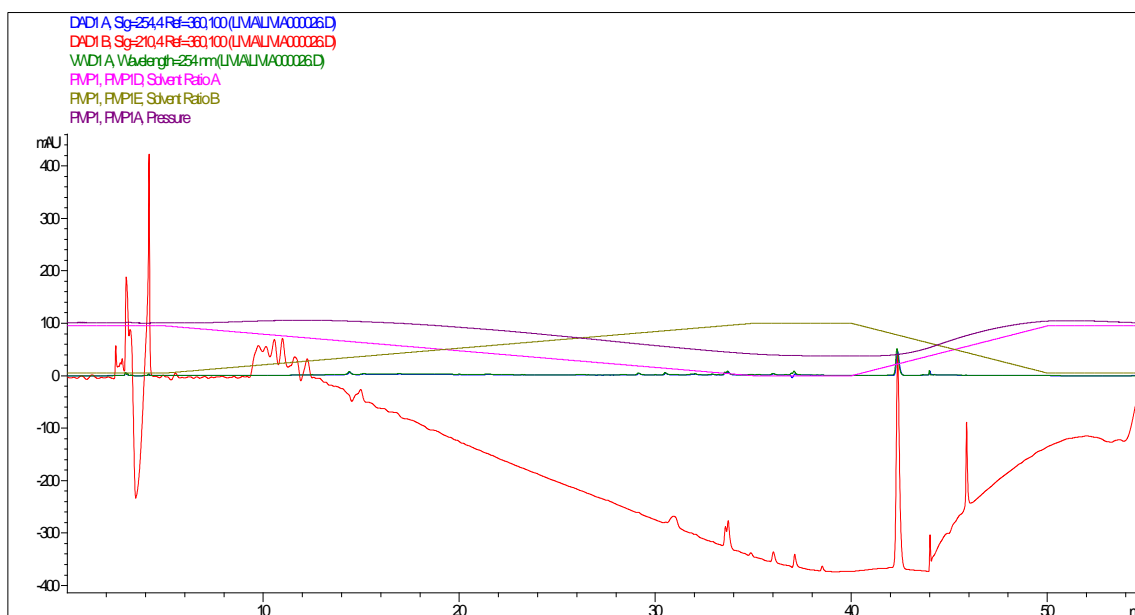


Anexo 12.-Cromatograma da fração obtida com 10% ACN do resíduo H₂O.

Legenda: vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul: cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.



Anexo 13-Cromatograma da fração obtida com 50% ACN do resíduo H₂O (não é totalmente solúvel). Legenda: vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul: cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.



Anexo 14- Cromatograma da fração obtida com 100% MeOH do resíduo H₂O (não é totalmente solúvel .em MeOH, nem em água) Legenda: vermelho; cromatograma obtido a 210 nm do detector DAD, azul: cromatograma obtidos a 254 nm do detector DAD e verde: cromatograma obtido a 254 nm do detector UV.

Ressonância magnética nuclear

Anexo 15

