



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO VEGETAL DE  
JAMBU (*Spilanthes acmella*) EM ISOLADOS DE *Staphylococcus* spp. DE  
AMOSTRAS DE LEITE DE BOVINOS**

MOISÉS MARTINS CHAGAS

MANAUS- AMAZONAS

Agosto, 2020

MOISÉS MARTINS CHAGAS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO VEGETAL DE JAMBU (*Spilanthes acmella*) EM ISOLADOS DE *Staphylococcus* spp. DE AMOSTRAS DE LEITE DE BOVINOS**

Orientador: Alexandre Alberto Tonin, Dr.

Coorientador: Felipe Faccini dos Santos, Dr.

Coorientadora: Rejane dos Santos Sousa, Dra.

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCAN) da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração Biotecnologia e Microbiologia.

MANAUS-AMAZONAS

Agosto, 2020

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C433a Chagas, Moisés Martins  
Avaliação antibacteriana do extrato vegetal de jambu (*Spilanthes acmella*) em isolados de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite de bovinos / Moisés Martins Chagas . 2020  
51 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Alexandre Alberto Tonin  
Coorientador: Felipe Faccini dos Santos  
Coorientadora: Rejane dos Santos Sousa  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Microbiologia. 2. bovinocultura de leite. 3. inibição de crescimento. 4. mastite bovina. I. Tonin, Alexandre Alberto. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Amazonas  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Ata da Defesa de Dissertação de Mestrado do Moisés Martins Chagas.

Aos vinte dias do mês de agosto de dois mil e vinte às 14h00, **Moisés Martins Chagas**, realizou a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Avaliação da atividade vegetal de jambú (*Spilanthes acmella*) em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de amostras de leite de bovinos". Em face à Emergência Sanitária por COVID-19, a Portaria da CAPES nº 36/2020 de 19/03/2020 e o Ofício Circular da PROPESP/UFAM nº 009/2020 de 30/03/2020, e diante da impossibilidade de realização da Defesa da Dissertação foi realizada através de sessão de videoconferência utilizando a plataforma Google Meet.

**Banca Examinadora:**

MEMBROS	PARECER	ASSINATURA
Dr. Alexandre Alberto Tonin (UFAM) – Presidente	Aprovado ( <input checked="" type="checkbox"/> ) Reprovado ( <input type="checkbox"/> )	Assinatura eletrônica no final do documento
Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto (UFAM) – Membro	Aprovado ( <input checked="" type="checkbox"/> ) Reprovado ( <input type="checkbox"/> )	Assinatura eletrônica no final do documento
Dra. Camila Tochetto (Exército Brasileiro) – Membro	Aprovado ( <input checked="" type="checkbox"/> ) Reprovado ( <input type="checkbox"/> )	Assinatura eletrônica no final do documento

<b>Resultado Final:</b> Aprovado ( <input checked="" type="checkbox"/> )
Reprovado ( <input type="checkbox"/> )

em Manaus, 20 de agosto de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Pedro de Queiroz Costa Neto**, Professor do Magistério Superior, em 20/08/2020, às 15:49, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Alberto Tonin**, Usuário Externo, em 20/08/2020, às 15:56, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Tochetto**, Usuário Externo, em 20/08/2020, às 16:10, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufam.edu.br/sei/controlador\\_esterno.php?acao=documento\\_conferir&id\\_origem\\_externo=0](http://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_esterno.php?acao=documento_conferir&id_origem_externo=0), informando o código verificador **0284659** e o código CRC **7F3B2B3B**.

Aos meus pais, Reinaldo Sarmiento Chagas (*in memoriam*)  
e M<sup>a</sup> Izabel de Azevedo Martins, pela presença, amor,  
apoio e por acreditar nos meus objetivos.

**Dedico**

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades que me ofereceu, pelo amparo em vários momentos difíceis, sendo meu refúgio e meu ouvinte sobre tudo e todas as coisas boas e ruins que me aconteceram, dando-me forças para seguir em frente e a alcançar meus sonhos.

A Universidade Federal do Amazonas - UFAM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal- PPGCAN pela oportunidade de me oferecer uma pós-graduação, ao continuar esse caminho acadêmico, proporcionando mais conhecimento e entendimento da área científica. Sou grato a todos os professores desta instituição que em cada área abriram um caminho para que eu possa buscar maiores desafios.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pela concessão de bolsa de estudos, para que eu pudesse me dedicar à pesquisa deste projeto, onde através dela pude me deslocar entre os municípios, assim como foi importante em questões pessoais.

Ao Instituto Federal do Amazonas – IFAM, por ceder o laboratório de ciências biológicas com todo seu equipamento e materiais, para que eu pudesse realizar as análises e assim obter dados para minha pesquisa.

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Alberto Tonin, por todo seu conhecimento, disposição, competência e esforço de realizar este projeto. Obrigado, por ter sido o melhor orientador de todos, sempre disponível, sempre me ajudando e sendo exigente quando necessário, para que eu possa assim me desenvolver como pessoa e como pesquisador.

Ao meu Coorientador, Dr. Felipe Faccini dos Santos, por ter me auxiliado tanto no fornecimento de materiais e melhores métodos para a coleta das amostras em um horário quase impossível, mas como também no laboratório, quando se estava disponível, passava os melhores métodos de como manusear cada material e as técnicas para que se obtivesse melhores resultados.

A Manoel Janer Pantoja Pimentel, Paulo Henrique Carloni Fleury Curado e Leandro de Carvalho Maquiné, que foram o elo de ligação entre mim e os proprietários de fazendas leiteiras, possibilitando a facilidade de acesso e permitindo que as amostras fossem coletadas. Com a ajuda destes amigos, foi possível conhecer novos lugares, novas pessoas, fazendas antes desconhecidas.

A Erika Tavares Pimentel e Rodiney Medeiros dos Reis, por serem pacientes e me ensinarem como funcionava os equipamentos do laboratório, cada aspecto do material e o processo das análises, a leitura de informações e a compilação de dados assim como me dando auxílio em diversas dúvidas sobre os detalhes microbiológicos do trabalho.

A Ananda Santigado de Oliveira e Deydre Nunes Merlo, por me ampararem no laboratório e na pesquisa quando lhes era possível, sendo que também tinham suas atividades e aulas recorrentes.

A Anne Caroline Dantas Tavares de Oliveira, técnica do laboratório por sempre me auxiliar em materiais para o laboratório e estando disponível sempre que necessário, foi de grande ajuda em diversos aspectos.

Aos meus pais Reinaldo Sarmiento Chagas e Maria Izabel de Azevedo Martins, por sempre me apoiarem nas minhas decisões, por serem pais incríveis me dando forças, carinho e até mesmo sendo exigentes quanto a minha educação. Mesmo após o falecimento do meu pai, sei que ele me protege, me apoia e me ampara sempre que preciso.

Aos meus amigos, Daniellen de Souza Carneiro, Vivian Greyce Batista Leal, Armanda Pessoa Neta e Manoel Janer Pantoja Pimentel, por serem o amparo em diversos momentos, serem divertidos e de certa forma uma válvula de escape da vida acadêmica e pós-graduação.

Por fim, quero agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser concluído. Agradeço a Deus por ter enviado todas essas pessoas que foram essenciais tanto para o projeto, como para a minha vida pessoal.

### **Epígrafe**

Não há problema em se perder,  
desde que você encontre  
seu caminho de volta.

Por Lugares Incríveis – Jennifer Niven



## RESUMO

No Brasil, o gênero *Staphylococcus* spp é considerado como o principal agente causal da mastite bovina. Diversos estudos apontam que tanto a bactéria *S. aureus*, como os estafilococos de coagulase-negativa além de serem os mais frequentes e encontrados na mastite, apresentam aumento crescente no padrão de resistência a antimicrobianos, de característica oportunista, acarretam em infecções intramamárias e diminuem a qualidade do leite. Uma das alternativas encontradas para auxiliar na redução dos custos e, principalmente, para minimizar os processos de resistência microbiológica é a utilização de agentes fitoterápicos (ou derivados destes) como agentes adjuvantes terapêuticos. Dentre estas potenciais alternativas terapêuticas encontramos o Jambu (*Spilanthes acmella*), planta rica em isobutilamidas bioativas. Devido à presença desta substância, a planta possui aplicação tradicional em produtos farmacêuticos, alimentos e produtos para a saúde e cuidados pessoais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antibacterianos do extrato vegetal de Jambu em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de amostras de leite bovino. Para este propósito foram coletadas 60 amostras de leite de vacas de municípios do interior do Estado do Amazonas. Estas amostras foram feitas a detecção, contagem e confirmação de *Staphylococcus* spp e, a partir destas, o teste de concentração inibitória mínima do extrato vegetal de Jambu. Como resultados, Das 60 amostras de leite, foi possível obter colônias características de *Staphylococcus* spp. de 56 (93,3%) amostras. Destas, foram obtidas 56 cepas, sendo 19 (33,9%) caracterizadas como *Staphylococcus aureus* e 37 (66,1%) como *Staphylococcus* spp. Todas as 56 cepas apresentaram algum nível de sensibilidade ao extrato vegetal de Jambu, desde a diluição inicial (concentração de 20%) até a diluição final (0,039%). Em nosso estudo obtivemos uma alta percentagem de isolamento (93,3%) de *Staphylococcus* spp das amostras, com 33,9% representando *Staphylococcus aureus* e 66,1% de estafilococo coagulase-negativa. Neste cenário, verificamos que o extrato vegetal de Jambu provocou inibição no crescimento de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite bovina, em todas as concentrações testadas, exceto a última (a 0,0195%). Para os isolados com concentração inibitória menor os efeitos, em sua maioria, se comportaram como bacteriostático, ao passo que para isolados com concentração inibitória maiores o efeito foi similar ao bactericida. Acreditamos que essas diferenças em efeitos possam estar ligadas a diferentes níveis de sensibilidade dos isolados.

**Palavras-chave:** Microbiologia, bovinocultura de leite, inibição de crescimento, mastite bovina.

## Abstract

In Brazil, the genus *Staphylococcus* spp is considered as the main causal agent of bovine mastitis. Several studies indicate that both *S. aureus* bacteria and coagulase-negative staphylococci, in addition to being the most frequent and found in mastitis, have an increasing pattern of resistance to antimicrobials, which are opportunistic, leading to intramammary infections and decreasing milk quality. One of the alternatives found to help reduce costs and, mainly, to minimize the processes of microbiological resistance is the use of phytotherapeutic agents (or derivatives thereof) as therapeutic adjuvant agents. Among these potential therapeutic alternatives, we find Jambu (*Spilanthes acmella*), a plant rich in bioactive isobutyl amides. Due to the presence of this substance, the plant has traditional applications in pharmaceutical products, food, and products for health and personal care. Thus, the objective of this work was to evaluate the antibacterial effects of the Jambu plant extract in isolates of *Staphylococcus* spp. from bovine milk samples. For this purpose, 60 milk samples were collected from cows from municipalities in the interior of the State of Amazonas. These samples were made for the detection, counting, and confirmation of *Staphylococcus* spp and, from these, the minimum inhibitory concentration test of the Jambu plant extract. As a result, Of the 60 milk samples, it was possible to obtain colonies characteristic of *Staphylococcus* spp. of 56 (93.3%) samples. Of these, 56 strains were obtained, of which 19 (33.9%) were characterized as *Staphylococcus aureus* and 37 (66.1%) as *Staphylococcus* spp. All 56 strains showed some level of sensitivity to the Jambu plant extract, from the initial dilution (20% concentration) to the final dilution (0.039%). In our study, we obtained a high percentage of isolation (93.3%) of *Staphylococcus* spp from the samples, with 33.9% representing *Staphylococcus aureus* and 66.1% of coagulase-negative staphylococcus. In this scenario, we found that the Jambu plant extract inhibited the growth of *Staphylococcus* spp. isolated from bovine milk samples, in all tested concentrations, except the last one (at 0.0195%). For isolates with a lower inhibitory concentration, the effects, for the most part, behaved as bacteriostatic, whereas for isolates with a higher inhibitory concentration the effect was similar to the bactericide. We believe that these differences in effects may be linked to different levels of sensitivity of the isolates.

**Keywords:** Microbiology, dairy cattle, growth inhibition, bovini mastitis.

## LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Instituto Federal do Amazonas-Zona Leste .....	23
Figura 2 - Acondicionamento de amostras de leite .....	24
Figura 3 - Recepção e identificação das amostras de leite bovino, coletadas em três microrregiões do Amazonas (Nhamundá, Presidente Figueiredo e Careiro da Várzea) .....	24
Figura 4 - Amostras diluídas para análises .....	25
Figura 5 - Placa de Petri, contendo o meio Ágar Baird Parker .....	25
Figura 6 - Placa de Petri contendo Colônias de <i>Staphylococcus</i> spp. ....	26
Figura 7 - Teste de coloração de Gram.....	27
Figura 8 - Visualização de <i>Staphylococcus aureus</i> em microscópio óptico .....	27
Figura 9 - Comparação entre placas com catalase positiva e negativa.....	28
Figura 10 - Comparação entre tubos com coagulase positiva e negativa.....	29
Figura 11 - Tubo de bisel, contendo crescimento bacteriano .....	29
Figura 12 - Comparação para o nível de turbidez da amostra .....	30
Figura 13 - Preparação das microplacas com meio Mueller Hilton .....	30
Figura 14 - Adição de extrato de jambu ( <i>Spilanthes acmella</i> ) .....	31
Figura 15 - Microplaca de fundo U contendo todos os diluentes .....	31
Figura 16 - Reinoculação em Ágar Bairk Parker de 10 µL da diluição anterior ao crescimento inibitório mínimo.....	32
Figura 17 - Leitura do nível de sensibilidade ao extrato vegetal de jambu ( <i>Spilanthes acmella</i> ) .....	33
Figura 18 - Visualização de botão branco, base para a leitura de nível de sensibilidade ao extrato vegetal de jambu.....	33

## LISTA DE TABELA

Tabela 1. Dados do teste de concentrações inibitórias mínimas (CIM) em placa, para isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. em amostras de leite bovino submetidas a diferentes concentrações de extrato vegetal de Jambu ( <i>Spilanthes acmella</i> ) em meio Ágar Baird Park (ABP).....	34
--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
2.1	Geral.....	16
2.2	Específico.....	16
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
3.1	Produção Leiteira.....	17
3.2	Mastite bovina.....	17
3.3	<i>Staphylococcus</i> spp.....	18
	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (ECN).....	20
<b>3.4</b>	Jambu ( <i>Spilanthes acmella</i> ).....	21
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1	Local da Pesquisa.....	23
4.2	Amostras de leite.....	23
4.3	Análises microbiológicas: Isolamento, enumeração e identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.....	24
4.3.1	Detecção microbiológica de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
4.3.2	Contagem de colônias presuntivas: .....	26
4.3.3	Contagem de colônias típicas: .....	26
4.3.4	Caracterização das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
4.3.5	Teste de coloração de Gram: .....	27
4.3.6	Teste de Catalase .....	28
4.3.7	Teste de Coagulase livre em tubo.....	28
4.3.8	Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) .....	29
4.3.9	Determinação do crescimento em diluição anterior a Concentração Inibitória Mínima .....	32
4.3.10	Análise dos dados .....	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	33
5.1	Identificação dos isolados.....	33
5.2	Crescimento Inibitório Mínimo.....	33
5.3	Reinoculação em meio Ágar Baird Parker.....	35
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	36
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

O leite é um produto alimentício, composto de proteínas, carboidratos, lipídeos, gordura, lactose, minerais, vitaminas e água.

Com o passar dos anos, a produção leiteira precisou se desenvolver, seja ela nos âmbitos do manejo sanitário, alimentação e genética. A atividade leiteira se concentrou principalmente na melhoria produtiva das vacas, ou seja, desde o nascimento ao abate, onde todo o processo ocorra à baixo custo. Hoje, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de leite e possui o segundo maior rebanho leiteiro do mundo, ficando somente atrás da Índia, refletindo sua relevância para o mercado internacional de lácteos.

Dentre os pilares da atividade leiteira está o manejo sanitário, que se destaca, pois é o que sofre constantemente com a mastite bovina, seja ela clínica ou subclínica, acarretando em perdas econômicas anuais. Isto se deve ao fato que, embora o leite apresente nutrientes em sua composição, essa mesma riqueza nutricional se torna favorável a uma variedade de microrganismos patogênicos.

Em tempos de crescimento nos custos de produção, atividades e manejos que levem à redução nas perdas são de extrema valia dentro de uma propriedade. Neste sentido, a análise econômica de uma doença tem como objetivo principal, estimar o impacto ocasionado pela enfermidade sobre o desempenho econômico da fazenda leiteira. No caso da mastite bovina, as perdas devido a casos clínicos são percebidas com maior facilidade pelo produtor, já que os sinais clínicos são evidentes e o leite produzido é descartado. Por outro lado, estimar as perdas e despesas associadas aos casos de mastite subclínica não é tão evidente, quando comparado aos casos clínicos, principalmente, porque a doença não causa alterações visuais do leite ou úbere da vaca, mas apresenta alterações na produção e nas características nutricionais.

Bactérias do gênero *Staphylococcus* em isolados de leite mastítico bovino também apresentam características de virulência e resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento da doença (DINIZ *et al.*, 2010). Sendo necessário assim a busca por alternativas com menor custo e que com potencial antimicrobiano. Uma das alternativas encontradas para auxiliar na redução dos custos e, principalmente, para minimizar os processos de resistência microbológica é a utilização de agentes fitoterápicos (ou derivados destes) como agentes adjuvantes terapêuticos (BERTINI *et al.*, 2005). Inúmeras publicações, nas mais diferentes áreas, exploram esse imenso, e ainda pouco explorado nicho de pesquisa de novos agentes farmacológicos.

Dentre a biodiversidade da flora amazônica, e com potencial de agente fitoterápico, está o Jambu (*Spilanthes acmella*), erva da região Norte do Brasil e que se destaca na alimentação humana, presente em pratos típicos como o tacacá e em bebidas alcoólicas como a cachaça. Quando se estuda plantas medicinais, se extrai categoricamente todas as partes da planta, das flores ao caule, e no caso do Jambu, o extrato presente nas folhas se torna importante, sendo rica em uma substância denominada Espilantol, esta substância por sua vez tem a característica anestésica, ao mesmo tempo em que pode ser anti-inflamatória, antimicrobiana e antibacteriana. Assim, pensando-se na vasta biodiversidade Amazônica, a utilização de plantas e/ou derivados é extremamente promissora e pode ser conduzida com amplas possibilidades de novas descobertas, podendo causar impactos positivos em diversas áreas das ciências da saúde (humana e animal).

Desta forma, baseado nas informações apresentadas sobre a importância da mastite na saúde animal e produtividade de rebanhos, o objetivo global deste projeto é avaliar a atividade antibacteriana do extrato vegetal de Jambu (*Spilanthes acmella*) em isolados de *Staphylococcus* spp provenientes de amostras de leite de bovinos, obtidos na microrregião de Manaus.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana do extrato vegetal de Jambu (*Spilanthes acmella*) em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de amostras de leite de bovinos, obtidas nas microrregiões de Manaus.

### **2.2 Específico**

Determinar, *in vitro*, as concentrações inibitórias mínimas, para os isolados de *Staphylococcus* spp. do extrato vegetal de Jambu;



### **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Produção Leiteira**

Segundo as últimas estatísticas disponibilizadas pela FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) sobre a produção mundial de leite referem-se a 2017. Neste período, enquanto a produção total brasileira apresentou queda de 0,5% em relação a 2016, no mundo subiu de 801,2 para 827,9 bilhões de litros, avanço de um ano para o outro (ANUÁRIO-LEITE, 2019). O Brasil mesmo perdendo 0,5% em volume, saiu do quarto para o terceiro lugar no *ranking* dos 20 maiores países produtores de leite em 2016 e 2017 (ANUÁRIO-LEITE, 2019).

A produção de leite brasileira foi de 33,5 bilhões de litros em 2017, sendo 35,7% oriundos da região Sul, 34,2% da Sudeste, 11,9% da Centro-Oeste, 11,6% da Nordeste e 6,5% da região Norte. Entre 2012 e 2017, o aumento da produção nacional foi de 1,2 bilhão de litros, impulsionada principalmente pelos três estados do Sul (ANUÁRIO-LEITE, 2019). Em 2017, a produção de leite na região Norte foi de 2,19 bilhões de litros de leite e o estado de Rondônia representou 47,1% do total. No Pará, a quantidade produzida atingiu 28%; em Tocantins, 19,8%; no Acre, 2,01%; no Amazonas, 2%; em Roraima, 0,8% e no Amapá, 0,2% (ANUÁRIO-LEITE, 2019).

#### **3.2 Mastite bovina**

A mastite bovina é definida como a inflamação da glândula mamária, frequente e contagiosa em vacas de alto rendimento. Alterações na composição do leite, redução na qualidade e quantidade do leite e aumento dos custos com tratamentos, mão-de-obra e abate são responsáveis não apenas por enormes perdas econômicas, mas também criam preocupações com o bem-estar animal e a saúde humana (SEEGERS *et al.*, 2003; DOS REIS *et al.*, 2013; PUMIPUNTU *et al.*, 2013; HYDE *et al.*, 2020). A mastite é classificada como clínica ou subclínica com base na aparência da inflamação do úbere, ou seja, a mastite subclínica (SCM) é a inflamação da glândula mamária que não cria alterações visíveis no leite. Embora o leite pareça normal, as vacas com SCM produzem menos leite com baixa qualidade, incluindo menor prazo de validade dos produtos lácteos e maior risco para a higiene do leite, pois contém vários organismos patogênicos. Além disso, se a SCM não for diagnosticada durante o estágio inicial e não forem adotadas ações de gerenciamento adequadas, poderá evoluir para mastite clínica

(CM) e, assim, levar a perdas econômicas substanciais para o setor de laticínios. (HORTET; SEEGER, 1998; LEITNER *et al.*, 2006; PUMIPUNTU *et al.*, 2013).

A gravidade da mastite depende em grande parte dos padrões de interações entre patógenos invasores e as células epiteliais mamárias bovinas (BME) (SCHUKKEN *et al.*, 2011). Pesquisas revelaram que as bactérias Gram-negativas provocam forte resposta inflamatória por meio da estimulação vigorosa da síntese de citocinas na glândula mamária, resultando na ativação da resposta inflamatória local e sistêmica (BURVENICH *et al.*, 2003; MITTERHUEMER *et al.*, 2010). Por outro lado, foi relatado que as bactérias Gram-positivas provocam reação imune muito mais fraca do úbere e geralmente nenhuma forte resposta imune sistêmica é detectada (GRESHAM *et al.*, 2000; BANNERMAN, 2009). Portanto, a compreensão aprofundada dos mecanismos moleculares específicos de patógenos envolvidos na geração de respostas imunológicas das glândulas mamárias pode ser de grande importância para explorar e selecionar medidas de controle eficazes de mastite induzida por patógenos específicos em vacas leiteiras.

### **3.3 *Staphylococcus spp.***

*Staphylococcus spp.* Compreende o principal gênero envolvido em casos de mastite subclínica (PYÖRÄLÄ; TAPONENA, 2009). Amplamente distribuídos no ambiente, os *Staphylococcus* fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas saudáveis. As características celulares das bactérias são amplas, sendo mesófilos com temperatura de crescimento entre 7 e 47,8 °C e podem produzir enterotoxinas termo resistentes a temperaturas entre 10 e 46 °C. O pH ideal para o seu desenvolvimento varia entre 7 a 7,5, mas possível a multiplicação em alimentos com pH variando entre 4,2 e 9,3 (SANTANA *et al.*, 2010).

#### ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, catalase-positiva e coagulase-positiva, representa um dos patógenos mais importantes da mastite (BARKEMA, 2006; QUE, 2015).

Como principal patógeno associado à vaca, o *S. aureus* se espalha entre os animais, principalmente durante o processo de ordenha (SOL, 2000; BARKEMA, 2006; GERMAP, 2016). Assim, de posse de informações microbiológicas, podemos classificar como mastite contagiosa aquela causada por microrganismos bem adaptados

à sobrevivência no úbere, sendo transferidos de um quarto infectado a outro sadio através, principalmente, da mão do ordenador ou teteiras da ordenhadeira no momento da ordenha (BRITO *et al.*, 2007).

Portanto, o reservatório primário é o próprio animal; deste modo, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis* são considerados os principais agentes contagiosos (SILVA; ARAÚJO, 2008). Essas bactérias ao invadirem a glândula mamária bovina provocam reação inflamatória mediana com aparecimento de casos com sintomatologia clínica (BRAMLEY *et al.*, 1999). Porém, estima-se que para cada caso de mastite clínica devem existir entre 15 e 40 casos de mastite subclínica, nos rebanhos.

Em termos etiológicos, *S. aureus* se destaca como um dos micro-organismos mais frequentemente encontrados nas infecções intramamárias (IIM) de bovinos em todos os continentes, e também é aquele que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária leiteira (ZSCHÖCK *et al.*, 2000; SCHLEGELOVÁ *et al.*, 2003; VASUDEVAN *et al.*, 2003). No Brasil, *S. aureus* é considerado como o principal agente causal da mastite bovina, com taxas de isolamento entre rebanhos que variam entre 8,3 e 49,23% (LANGONI *et al.*, 1991; COSTA *et al.*, 1995; MORETTI *et al.*, 1998; BRITO *et al.*, 1999; LAFFRANCHI *et al.*, 2001; DONATELE *et al.*, 2002). Assim, devido a sua grande importância como agente causador da mastite e pela dificuldade de seu controle, *S. aureus* tem sido bastante estudado quanto a seu papel na infecção, bem como em relação a seu perfil de resistência aos antimicrobianos.

Se considerarmos que a prevalência da mastite está relacionada, principalmente, ao manejo antes, durante e após a ordenha, o tratamento desta enfermidade deve ser considerado como mais complexo, visto que requer a intervenção por meio de antimicrobianos de amplo espectro sistêmicos e com ação local. No entanto, o sucesso dessas medidas depende de vários aspectos, dentre eles, da escolha e da posologia adequada das drogas, da distribuição das drogas dentro da glândula mamária, do estado fisiológico do animal, da precocidade com que o tratamento é instituído e do micro-organismo envolvido (GRUET *et al.*, 2001; ERSKINE *et al.*, 2003). Diversos estudos apontam que *S. aureus*, além de ser o mais frequentemente isolado da mastite bovina no Brasil, apresenta aumento crescente no padrão de resistência a antimicrobianos (BRITO *et al.*, 2001; RUEGG, 2017). Segundo Barravieira (1994), tal fato pode estar relacionado à capacidade diferenciada de aquisição de resistência que este micro-organismo possui. Desta forma, o monitoramento da resistência em *S. aureus* é também

importante, pois o uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores que influenciam no incremento das taxas de resistência (ZAFALON *et al.*, 2008). Ainda, há de se considerar o fato de que os perfis de resistência de *S. aureus* podem ser bastante variáveis entre rebanhos, e até mesmo dentro de um mesmo rebanho (CARDOSO *et al.*, 2000; RABELLO *et al.*, 2005; SILVEIRA-FILHO *et al.*, 2005). Estes fatores determinam que taxas de cura obtidas a partir da antibioticoterapia são, geralmente, insatisfatórias e dependem muito dos patógenos envolvidos (EBERHART *et al.*, 1986), além de estes poderem constituir fontes de resíduos no leite (ERSKINE *et al.*, 2003). Em estudos desenvolvidos em vários países foi relatada a ocorrência frequente de resistência à penicilina, enquanto a resistência a outros agentes antimicrobianos é menos comum (STEPHAN *et al.*, 2001; ERSKINE *et al.*, 2003; VINTOV *et al.*, 2003; NADER FILHO *et al.*, 2007; SAEKI, 2011).

### ***Staphylococcus coagulase negativa* (ECN)**

Conhecendo a importância do *S. aureus* nas doenças da glândula mamária de bovinos, como mencionado acima, precisa-se completar a importância de outras espécies do gênero *Staphylococcus*. Neste sentido, contudo, considerável progresso na classificação sistemática dos *Staphylococcus* e no desenvolvimento de métodos para a identificação do gênero, espécies e subespécies, tem permitido aos clínicos se inteirarem da variedade de ECN presentes em amostras clínicas e, assim, os consideram como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos (KLOOS; BANNERMAN, 1994). Atualmente, são reconhecidos como microrganismos essencialmente oportunistas, que se prevaecem de inúmeras situações orgânicas para produzir graves infecções (KLOOS; BANNERMAN, 1999).

Esses microrganismos, antes considerados contaminantes, agora são causa frequente de mastite, principalmente subclínica (TAPONEN *et al.*, 2007; CAPURRO *et al.*, 2009). Além disso, são comumente considerados oportunistas, pois normalmente são encontrados na pele do teto e podem ter acesso ao interior da glândula mamária resultando na infecção intramamárias (TAPONEN *et al.*, 2007). Segundo Santos e Reis (2009) esses patógenos são descritos como os mais frequentemente isolados em amostras de leite, tanto de vacas em lactação, quanto de novilhas, formando um grupo de bactérias conhecido como patógenos secundários, por terem baixa patogenicidade (ou seja, causam poucos danos na glândula mamária). Pyörälä e Taponen (2009) concluíram que os ECN podem causar uma infecção persistente, quando capazes de

permanecer na glândula mamária, resultando em aumento da contagem de células somáticas do leite, afetando sua qualidade e diminuindo sua produção.

### 3.4 Jambu (*Spilanthes acmella*)

*Spilanthes* (Compositae ou Asteraceae) é um gênero composto por mais de 60 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, como África, América, Bornéu, Índia, Sri Lanka e Ásia (SAHU *et al.*, 2011; TIWARI *et al.*, 2011). *S. acmella* é nativa do Brasil e é cultivada o ano todo, como planta ornamental ou medicinal. O jambu é uma espécie herbácea pertencente à família Asteraceae, variando entre 32 a 60 centímetros de altura, com numerosos caules e flores de calêndula acumulado na cabeça, amplamente cultivada em vários municípios da região Nordeste do estado do Pará, nos quais o seu consumo é significativo em pratos típicos, tais como pato no tucupí, tacacá, arroz com jambu, pizza, e nas bebidas alcoólicas, como a cachaça e o licor de jambu (BUNYAPRAPHATSARA; CHOKECHAREUNPORN, 1999; COUTINHO *et al.*, 2006; SILVA, 2015; COSTA, 2020).

Nas folhas é produzido um óleo essencial com índice elevado de uma substância conhecida como espilantol (COUTINHO *et al.*, 2006), uma amida responsável pelas propriedades bioatividades anti-inflamatórias, anti-sépticas e anestésicas da planta (DIAS *et al.*, 2012). O Jambu (*Spilanthes acmella*), é uma planta rica em isobutilamidas bioativas. A principal molécula, e a mais bioativa, é o alcaloide antisséptico N-isobutilamidado ácido (2E, 6Z, 8E) - deca-2,6,8-trienóico, comumente chamado de espilantol. Devido à presença desta substância, a planta possui aplicação tradicional em produtos farmacêuticos, alimentos e produtos para a saúde e cuidados pessoais. Também é conhecido como antimicrobiano (FABRY *et al.*, 1996; PADHAN *et al.*, 2017). Existem estudos reportando que plantas do gênero *Spilanthes* possuem atividades antibacterianas (RINCÓN *et al.*, 2012), antifitopatogênica (RANI; MURTY, 2006), inseticida e antimicrobiana (PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2009) e antifúngica (RANI; MURTY., 2006).

Estudos na área da saúde, reforçam a presença de agentes anti-inflamatórios, antimicrobianos e antibacterianos, presentes nas flores de *S. acmella*, e que o espilantol além de exercer ação anti-inflamatória, também induz a atividade de eliminação de radicais livres e inibe a transcrição inflamatória na dermatite e pancreatite (HAW;

KENG, 2003; SHARMA, 2003; Wu *et al.*, 2008; YADAV; SINGH, 2010; ARORA *et al.*, 2011; BAKONDIA, *et al.*, 2019).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi realizada no Instituto Federal do Amazonas – IFAM, Campus Zona Leste (Figura 1) Departamento de Medicina Veterinária, mais precisamente no Laboratório de Ciências Biológicas. Localizada na estrada do Aleixo, no bairro Armando Mendes – Manaus, Amazonas.



Figura 1 - Instituto Federal do Amazonas-Zona Leste  
Fonte: Google (2018)

### 4.2 Amostras de leite

As amostras foram obtidas de fazendas em três Microrregiões do Amazonas (Nhamundá, Presidente Figueiredo e Careiro da Várzea), totalizando 60 (sessenta) amostras, sendo 10 (dez) amostras de Nhamundá, 20 (vinte) de Careiro da Várzea e 30 (trinta) de Presidente Figueiredo.

Foram coletadas 10 mL de amostra de animais que não apresentaram indícios visuais de mastite clínica, sendo consideráveis visualmente como saudáveis. As amostras foram acondicionadas em tubos de Falcon de 15 mL, com tampa rosqueada previamente esterilizados, identificadas de acordo com cada animal e propriedade e seguidamente colocadas em caixa de material isotérmico com baterias de gelo, onde permaneceram por 24 horas devido ao deslocamento geográfico, em seguida levadas ao laboratório, onde permaneceram por 24 horas em congelamento, para posteriormente serem feitas as devidas análises (Figura 2).



Figura 2 - Acondicionamento de amostras de leite  
Fonte: Chagas, M.M. (2019)

### 4.3 Análises microbiológicas: Isolamento, enumeração e identificação de *Staphylococcus ssp.*

#### 4.3.1 Detecção microbiológica de *Staphylococcus aureus*

Para este processo, foi necessário inserir um código em cada amostra, para facilitar o processo e método de análises (Figura 3).



Figura 3 - Recepção e identificação das amostras de leite bovino, coletadas em três microrregiões do Amazonas (Nhamundá, Presidente Figueiredo e Careiro da Várzea)  
Fonte: Chagas, M.M. (2019)



Em seguida, em tubos Eppendorf previamente esterilizados, se fez a diluição das amostras, na concentração 9:1, onde para cada 900  $\mu\text{L}$  de água destilada autoclavada, foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  de amostra (Figura 4).

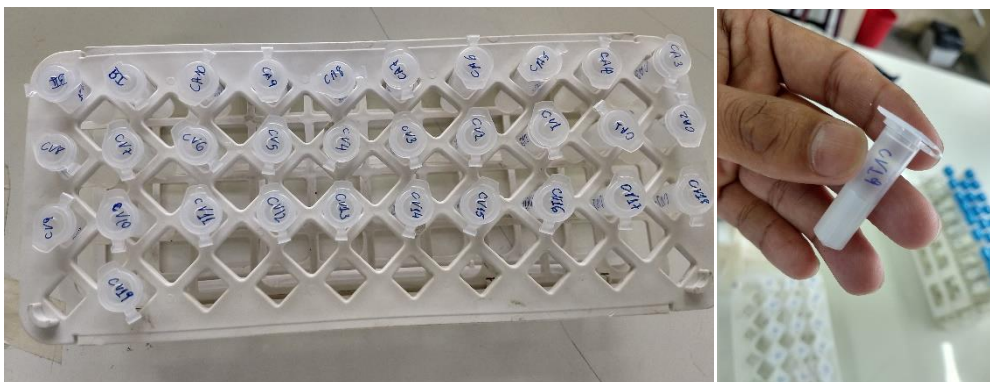


Figura 4 - Amostras diluídas para análises

Fonte: Chagas, M.M. (2019)

Posteriormente inseridos 1 mL em uma placa de Petri, claramente identificada, contendo 20 mL do meio de cultura Ágar Baird Parker (ABP) (Figura 5), espalhando o inóculo com auxílio de alça de Drigalski estéril. As placas então foram incubadas em condições de aerobiose à temperatura de 37 °C por até 72 horas, com observação do desenvolvimento microbiano a cada 24 e 48 horas, bem como contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

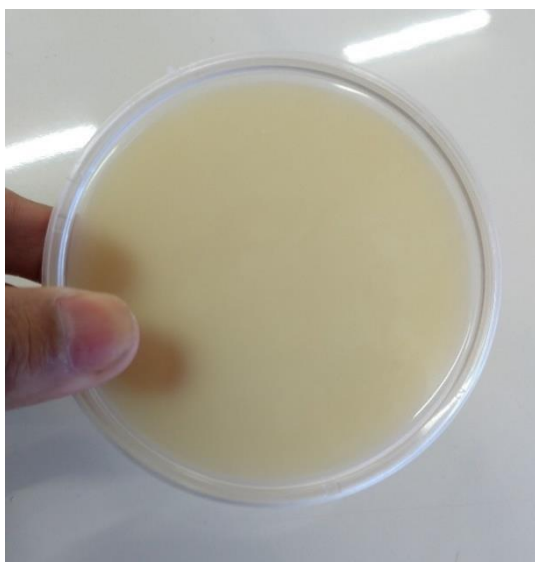


Figura 5 - Placa de Petri, contendo o meio Ágar Baird Parker

Fonte: Chagas, M.M. (2019)

#### 4.3.2 Contagem de colônias presuntivas:

Foram selecionadas as placas com 20 a 200 colônias, foram contadas as colônias típicas de *S. aureus*: colônias circulares, pretas, pequenas, lisas, convexas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca (Figura 6).

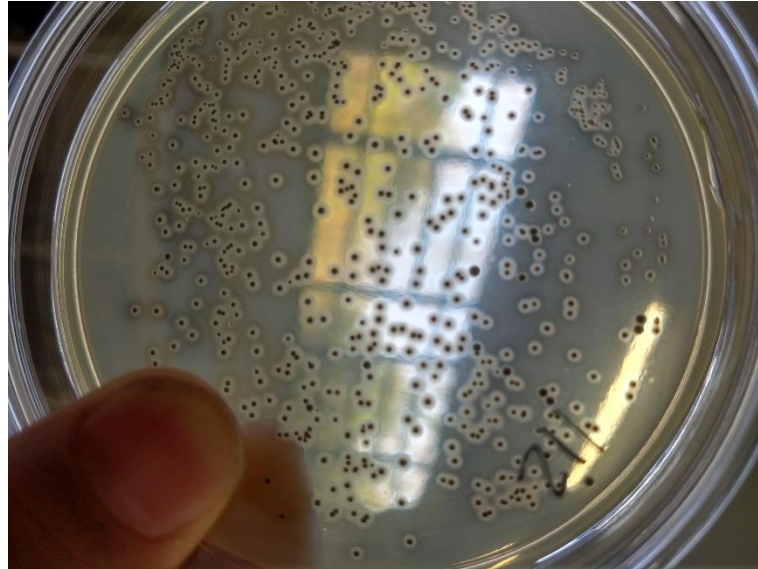


Figura 6 - Placa de Petri contendo Colônias de *Staphylococcus* spp.

Fonte: Chagas, M.M. (2019)

#### 4.3.3 Contagem de colônias típicas:

Foi selecionada uma colônia típica. Quando a placa apresentou colônias suspeitas de mais de um tipo, ou seja, típicas e atípicas, foi selecionada uma colônia aleatória correspondente a um número proporcional à distribuição dos diferentes tipos na placa. O número de UFC/mL foi calculado em função do número de colônias típicas e/ou atípicas obtidas, fator de diluição e porcentagem de colônias confirmadas.

#### 4.3.4 Caracterização das amostras de *Staphylococcus aureus*

Todas as colônias selecionadas foram semeadas em caldo BHI (infusão cérebro-coração) e incubadas por 24 horas a 37 °C. Seguidamente, as colônias sugestivas de microrganismos do gênero *Staphylococcus* foram submetidas à coloração de Gram.

#### 4.3.5 Teste de coloração de Gram:

Uma pequena amostra da colônia foi retirada e usada no teste de coloração de Gram, que consiste na reação da bactéria com os reagentes (violeta de genciana, lugol (Iodo), álcool absoluto e fucsina), sobre uma lâmina, respeitando a quantidade do reagente e o tempo de reação, em seguida, sendo observados em um microscópio óptico (**Figura 7**). Quando as bactérias se apresentam positivas para *S. aureus* a coloração observada é a violeta, assim como é possível identificar as formas arredondadas e agrupadas das mesmas (Figura 8).

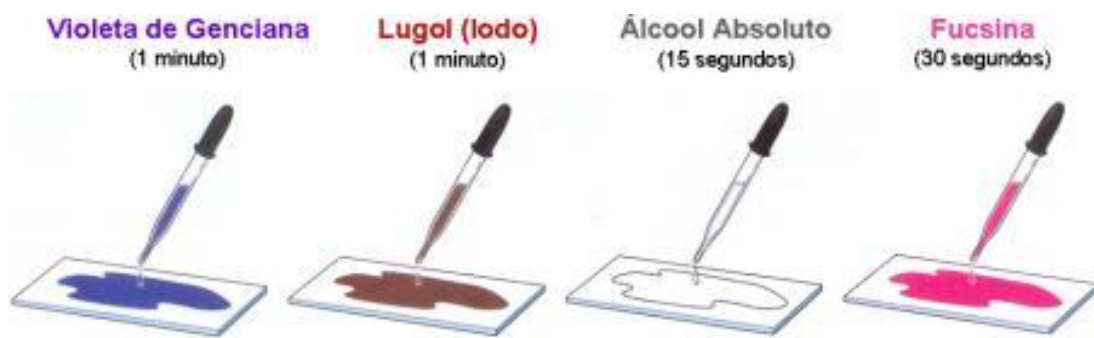


Figura 7 - Teste de coloração de Gram

Fonte: <http://biomedicinaparatodos.blogspot.com/>

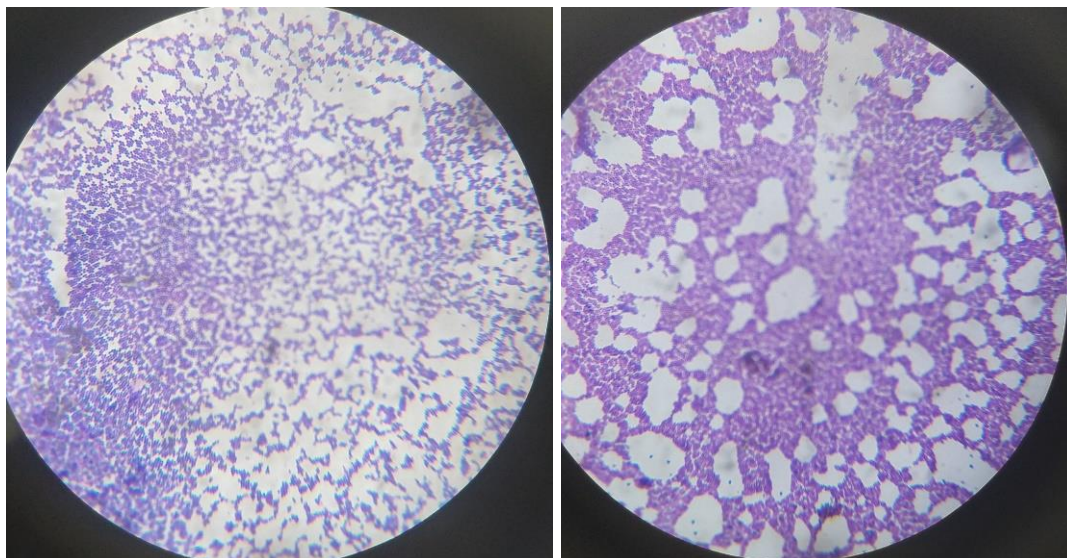


Figura 8 - Visualização de *Staphylococcus aureus* em microscópio óptico

Fonte: Chagas, M.M. (2019)

#### 4.3.6 Teste de Catalase

Com alça de semeadura flambada, foi retirada uma colônia pura de *Staphylococcus* (após 24h de cultivo em caldo BHI). Esta então, passou por um processo de esfregaço em uma placa de Petri, em seguida foi adicionada de uma a duas gotas de hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) a 3%, popularmente conhecida como água oxigenada sobre o esfregaço. As estirpes que apresentaram a produção de efervescência, liberação de gás, com produção de pequenas bolhas, foram consideradas positivas (Figura 9).

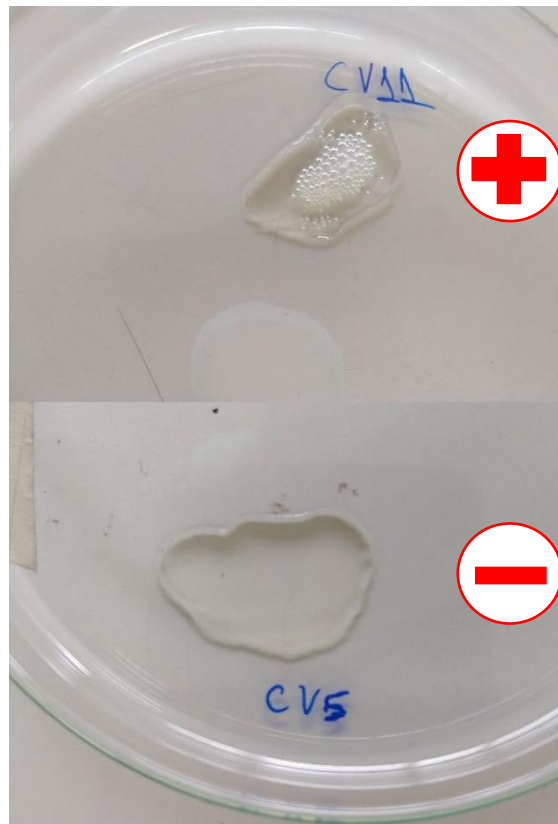


Figura 9 - Comparação entre placas com catalase positiva e negativa  
Fonte: Chagas, M.M. (2019)

#### 4.3.7 Teste de Coagulase livre em tubo

Em tubos de ensaio de vidro estéreis, foi adicionado 3 mL de Coagulu (plasma de coelho) e mais 3 mL de cultura pura de colônias sugestivas de *Staphylococcus*, crescidas após 24 horas de cultivo em caldo BHI. Os tubos foram inclinados suavemente, sem agitar, e incubados a 37 °C em banho-maria. Foram analisados os tubos quanto a capacidade de reação do microrganismo com o plasma, resultando na



formação do coágulo, após 24 e 48 horas, onde as estirpes que coagularam o plasma, formando um coágulo, foram consideradas positivas (Figura 10).

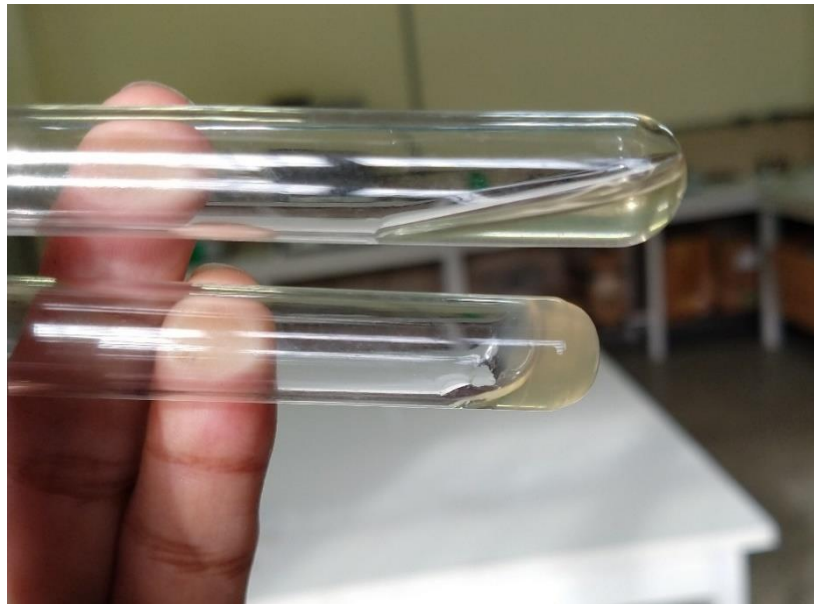


Figura 10 - Comparação entre tubos com coagulase positiva e negativa

Fonte: Chagas, M.M. (2019)

#### **4.3.8 Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM)**

Este processo consistiu em duas etapas, na primeira em tubos de ensaio estéreis foram adicionados os meios Mueller Hilton Broth (M.H) mais Agar Power Bacteriological, posteriormente inclinados (bisel), em seguida, foram adicionadas as bactérias através da alça de sementeira, dos tubos de BHI, onde após 24 horas, foi feita a leitura dos tubos (bisel) para observar se houve crescimento bacteriológico (Figura 11).



Figura 11 - Tubo de bisel, contendo crescimento bacteriano

Fonte: Chagas, M.M. (2019)

Nos tubos de ensaio com crescimento bacteriano, considerados positivos foi então adicionado água destilada autoclavada, para que pudessem ser comparadas com o padrão **Macfarland**, obtendo-se assim um padrão para o nível de turbidez (Figura 12).



Figura 12 -  
Comparação para o  
nível de turbidez da  
amostra  
Fonte: Chagas, M.M.  
(2019)

Na segunda etapa, foram utilizadas microplacas de fundo “U” esterilizadas e previamente numeradas, onde foram adicionadas 100  $\mu$ L de Mueller Hilton Broth (M.H) esterilizado em cada poço presente na microplaca (Figura 13).



Figura 13 - Preparação das microplacas com meio Mueller Hilton  
Fonte: Chagas, M.M. (2019)

Com a numeração, na primeira coluna, na linha 1 foram adicionadas mais 100µL de M.H, sendo esta chamada de Controle negativo, na linha 2 foram adicionadas mais 100µL de M.H, mais a bactéria *Staphylococcus* ATCC, sendo considerada como Controle positivo, a linha 3 foram adicionadas 100 µL de Álcool (controle de diluente) e na linha 4 em diante foram adicionadas 100 µL de extrato de Jambu (Figura 14), sendo diluída em linhas subsequentes, em seguida foram adicionadas 10 µL de amostra dos tubos de bisel na respectiva triplicata, sendo então colocadas em estufa a 37 °C (Figura 15).



Figura 15 - Adição de extrato de jambu (*Spilanthes acmella*)  
Fonte: Oliveira, A.S. (2019)

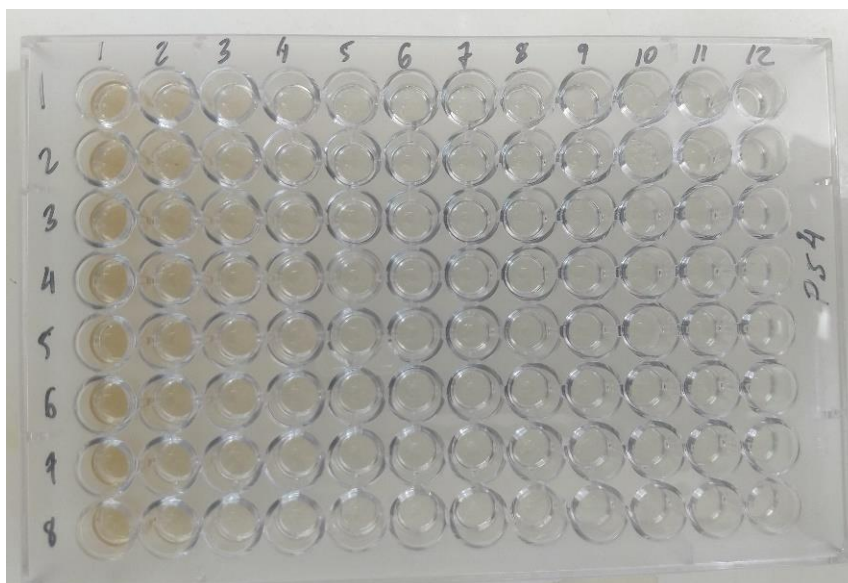


Figura 14 - Microplaca de fundo U contendo todos os diluentes  
Fonte: Chagas, M.M. (2019)

Em uma folha, foram anotadas o sequenciamento de todas as placas, para que se pudesse fazer a leitura de 24 horas, observando em qual coluna e linha houve o crescimento de um botão branco no respectivo poço, considerado como crescimento bacteriano, sendo anotado respectivamente. As leituras foram realizadas em lupa microbiológica em presença de fonte de luz oposta.

#### **4.3.9 Determinação do crescimento em diluição anterior a Concentração Inibitória Mínima**

Esta etapa foi realizada após a leitura do CIM em placa. Para verificar a existência de crescimento microbiológico em placa (em meio ABP) na diluição anterior a CIM observada, 10 $\mu$ L do poço anterior a CIM observada foram retirados e reinoculados em placa contendo ABP (Figura 16).

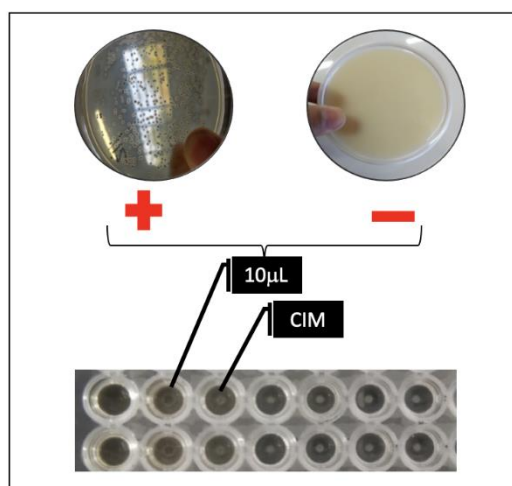


Figura 16 - Reinoculação em Ágar Bairk Parker de 10  $\mu$ L da diluição anterior ao crescimento inibitório mínimo

Fonte: Chagas, M.M. (2019)

#### **4.3.10 Análise dos dados**

Para a verificação de possíveis diferenças nas concentrações inibitórias mínimas do extrato vegetal de Jambu, e demais testes empregados nas amostras, foram considerados observações qualitativas (positivo e negativo).



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Identificação dos isolados

Das 60 amostras de leite, foi possível obter colônias características de *Staphylococcus* spp. de 56 (93,3%) amostras. Destas, foram obtidas 56 cepas, sendo 19 (33,9%) caracterizadas como *S. aureus* e 37 (66,1%) como *Staphylococcus* spp.

### 5.2 Crescimento Inibitório Mínimo

Todas as 56 cepas apresentaram algum nível de sensibilidade ao EVJ (Figuras 17/18), independentemente de ser ou não produtor de coagulase, ocorrendo a partir da concentração de 20% até 0,039% do EVJ, conforme demonstrado na Tabela 1.

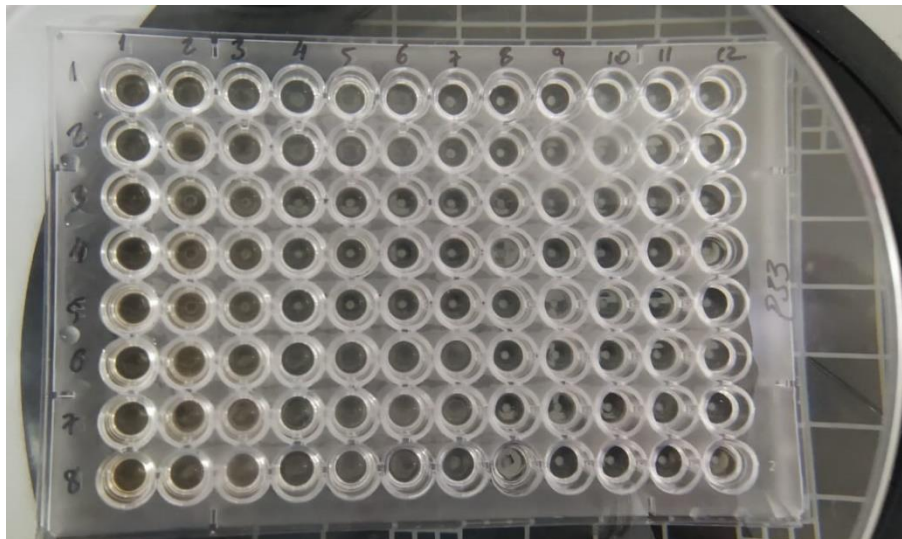


Figura 17 - Leitura do nível de sensibilidade ao extrato vegetal de jambu (*Spilanthes acmella*)

Fonte: Chagas, M.M. (2019)

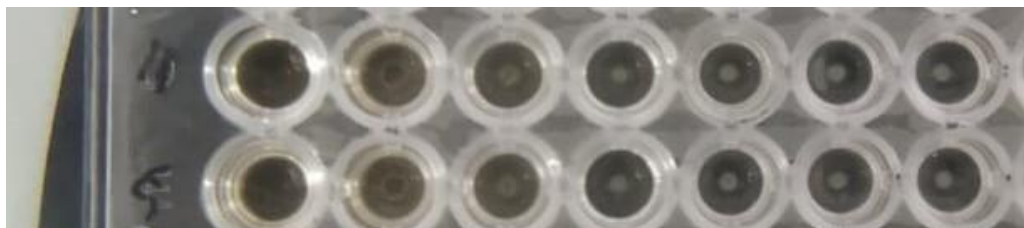


Figura 18 - Visualização de botão branco, base para a leitura de nível de sensibilidade ao extrato vegetal de jambu

Tabela 1. Dados do teste de concentrações inibitórias mínimas (CIM) em placa, para isolados de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite bovino submetidas a diferentes concentrações de extrato vegetal de Jambu (*Spilanthes acmella*) em meio Ágar Baird Park (ABP)

<b>CIM em Placa</b>	<b>IDA</b>	<b>CV NA CIM</b>	<b>CV NA DIA</b>	<b>COAG</b>	<b>CIM em Placa</b>	<b>IDA</b>	<b>CV NA CIM</b>	<b>CV NA DIA</b>	<b>COAG</b>
20%	Cepa 1	S	ndt	+	10%	Cepa 29	N	N	-
20%	Cepa 2	S	ndt	+	10%	Cepa 30	N	N	-
20%	Cepa 3	S	ndt	+	10%	Cepa 31	N	N	-
20%	Cepa 4	S	ndt	+	5%	Cepa 32	S	N	+
20%	Cepa 5	S	ndt	-	5%	Cepa 33	S	N	+
20%	Cepa 6	S	ndt	-	5%	Cepa 34	S	N	+
20%	Cepa 7	S	ndt	-	5%	Cepa 35	N	N	-
20%	Cepa 8	S	ndt	-	5%	Cepa 36	N	N	-
20%	Cepa 9	S	ndt	-	2,5%	Cepa 37	N	N	+
20%	Cepa 10	S	ndt	-	2,5%	Cepa 38	N	N	+
20%	Cepa 11	S	ndt	-	2,5%	Cepa 39	N	N	-
20%	Cepa 12	S	ndt	-	2,5%	Cepa 40	N	N	-
20%	Cepa 13	S	ndt	-	2,5%	Cepa 41	N	N	-
20%	Cepa 14	S	ndt	-	1,25%	Cepa 42	N	N	+
20%	Cepa 15	S	ndt	-	1,25%	Cepa 43	N	N	+
20%	Cepa 16	S	ndt	-	1,25%	Cepa 44	N	N	+
20%	Cepa 17	N	ndt	-	1,25%	Cepa 45	N	N	+
20%	Cepa 18	N	ndt	-	1,25%	Cepa 46	N	N	-
20%	Cepa 19	N	ndt	-	1,25%	Cepa 47	N	N	-
20%	Cepa 20	N	ndt	-	1,25%	Cepa 48	N	N	-
10%	Cepa 21	S	N	+	0,625%	Cepa 49	N	N	+
10%	Cepa 22	S	N	+	0,625%	Cepa 50	N	N	+
10%	Cepa 23	S	N	+	0,625%	Cepa 51	N	N	-
10%	Cepa 24	S	N	-	0,625%	Cepa 52	N	N	-
10%	Cepa 25	S	N	-	0,3125%	Cepa 53	N	N	+
10%	Cepa 26	S	N	-	0,3125%	Cepa 54	N	N	-
10%	Cepa 27	S	N	-	0,3125%	Cepa 55	N	N	-
10%	Cepa 28	S	N	-	0,039%	Cepa 56	N	N	-

Obs: CIM: concentração inibitória mínima; IDA: identificação da amostra; CV: crescimento visual; ABP: ágar Baird Parker; DIA: diluição imediatamente anterior; COAG: coagulase; S: Sim; N: Não; ndt: Não determinado.

### **5.3 Reinoculação em meio Ágar Baird Parker**

Na tabela 1 estão expostos os resultados da inoculação em meio Ágar Baird Parker (ABP) da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada isolado e das concentrações diluições imediatamente anteriores. Observa-se que na CIM de 20%, 16 (80%) apresentaram crescimento nesta diluição (1:2) em Ágar Baird Parker (não foi possível determinar o crescimento em diluição imediatamente anterior – CDIA – pois essa foi a diluição inicial); em EVJ a 10%, 8 (72,7%) ocorreu CIM nesta diluição (1:4) em meio ABP; em EVJ a 5%, 3 (60%) ocorreu CIM na diluição (1:8) em meio ABP. A partir da diluição de EVJ a 2,5% (1:16), e subsequentes, não se observou crescimento em ABP do respectivo CIM ou CDIA. Desta forma, do total dos 56 isolados, 27 (48,2%) apresentaram CIM em ABP, ao passo que 29 (51,2%) não apresentaram crescimento algum. Em nenhuma das amostras houve CDIA.

## 6 DISCUSSÃO

O Brasil ocupa a terceira colocação entre os principais países produtores de leite, sendo que, segundo dados do Centro de Inteligência do Leite (CILEITE) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), a produção total de leite brasileira (inspecionada e não inspecionada) aumentou de 19,767 para 33,840 bilhões de litros de leite entre os anos de 2000 e 2018, respectivamente (CILEITE, 2020). No entanto, neste mesmo período o rebanho de vacas ordenhadas foi reduzido de 17,885 para 16,357 milhões de cabeças (CILEITE, 2020). Porém, se considerarmos a produtividade, esta é baixa, com média de 1.525 litros/vaca/ano, um dos menores índices entre os principais países produtores de leite (CNA, 2020). Deste modo, com a queda do tamanho do rebanho e a necessidade de se manter a crescente na produção, faz-se necessário a otimização desta produção, especialmente pela sinergia entre melhoramento genético dos plantéis, que possibilita aumento real na produção (VAN ARENDONK *et al.*, 1989), bem como pela redução nas perdas (VISSIO *et al.*, 2015), em especial por doenças na lactação e suas consequências diretas (redução na produtividade) ou indiretas (descarte de leite por tratamentos). Ademais, é importante ressaltar que a Instrução Normativa nº 62 (IN-62) estabeleceu padrões mínimos para que o leite possa ser comercializado (SIMÕES; OLIVEIRA, 2012). Nestes padrões, o leite deve ser produzido por animais saudáveis e a glândula mamária é o órgão-chave para este status.

Em 93,3% (56/60) de nossas amostras, conseguimos isolar *Staphylococcus* spp. Dentre as diferentes espécies incluídas nesse gênero, *S. aureus* se destaca como um dos micro-organismos mais frequentemente encontrados nas infecções intramamárias (IIM) de bovinos em todos os continentes, e também é aquele que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária leiteira (ZSCHÖCK *et al.*, 2000; SCHLEGELOVÁ *et al.*, 2003; VASUDEVAN *et al.*, 2003). No Brasil, *S. aureus* é considerado o principal agente causal da mastite bovina, com taxas de isolamento entre rebanhos que variam entre 8,3 e 49,23% (LANGONI *et al.*, 1991; COSTA *et al.*, 1995; MORETTI *et al.*, 1998; BRITO *et al.*, 1999; LAFRANCHI *et al.*, 2001; DONATELE *et al.*, 2002). Nossa taxa de isolamento foi de 33,9% (19/56), o que representa um índice dentro dos já reportados. Diversos estudos apontam que *S. aureus*, além de ser o mais frequentemente isolado da mastite bovina no Brasil, apresenta aumento crescente no padrão de resistência a antimicrobianos (BRITO *et al.*, 2001). Segundo Barravieira (1994), tal fato pode estar relacionado à capacidade diferenciada de aquisição de resistência que este

micro-organismo possui. Desta forma, o monitoramento da resistência em *S. aureus* é também importante, pois o uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores que influenciam no incremento das taxas de resistência (ZAFALON *et al.*, 2008).

Os estafilococos coagulase-negativa (ECN), grupo de *Staphylococcus* que eram considerados bactérias não patogênicas até a sua descoberta como agentes causadores de infecções nosocomiais (KLOOS; BANNERMAN, 1994; VERMONT *et al.*, 1998). Porém, com a emergência da multirresistência aos antimicrobianos em ECN, recomenda-se que uma grande atenção seja direcionada também para estes microrganismos (NUNES, 2000; SINGHAL *et al.*, 2006). Em nosso estudo 66,1% (37/56) dos isolados foi classificado como ECN, ou *Staphylococcus* spp., sendo que as principais espécies envolvidas em infecções são: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. lugdunensis* e *S. xylosum*, embora outras espécies possam também causar infecções, especialmente em humanos (KLOOS; BANNERMAN, 1994; CUNHA *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2003; ROSS *et al.*, 2005; SINGHAL *et al.*, 2006). É importante lembrar que os ECN constituem um dos maiores grupos componentes da microbiota de mucosas da pele humana (SILVA *et al.*, 2000), o que pode sugerir inadequados processos nas etapas de lactação. Portanto, pela proximidade de relação entre humanos e animais de produção, como bovinos, as infecções cruzadas são passíveis de ocorrerem, podendo contribuir com a redução na qualidade do leite, da sanidade animal e, em especial contribuir para infecções em humanos.

Devido à crescente preocupação com a saúde pública, sanidade animal e o impacto que a resistência antimicrobiana pode acarretar a ambos, pesquisas envolvendo terapias alternativas (ou acessórias), como plantas medicinais e seus compostos, vêm sendo realizadas, a fim de obter uma maior variedade de fármacos (ou adjuvantes terapêuticos) com ação antimicrobiana (BERTINI *et al.*, 2005). Nesse sentido, estudos científicos mostram que *S. acmella* possui vários efeitos, dentre os quais encontramos efeito anestésico, antipirético, antifúngico, antioxidante, analgésico e antimicrobiana. *Spilanthes acmella* também possui bom efeito inseticida (DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 2003; AHMED *et al.*, 2013). No entanto, há pouca literatura científica atual sobre o efeito antibacteriano da planta de *S. acmella* e, mais ainda, sobre bactérias do leite, como *Staphylococcus* spp.

De maneira geral, nossos resultados demonstraram que o extrato vegetal de jambu (EVJ) apresentou capacidade de inibir o crescimento dos isolados, mas sim uma dispersão entre o EVJ na maior concentração (20%) até a concentração 0,039% (diluição 1:1024). Acreditamos que esse efeito possa estar relacionado aos diferentes perfis de sensibilidade dos agentes, visto que, se considerarmos dados de *S. aureus*, os perfis de resistência desta espécie podem ser bastante variáveis entre rebanhos, e até mesmo dentro de um mesmo rebanho (CARDOSO *et al.*, 2000; RABELLO *et al.*, 2005; SILVEIRA-FILHO *et al.*, 2005).

Na concentração mais alta do EVJ, 20%, nenhuma das 56 amostras apresentaram crescimento visual. Vinculamos esse resultado devido ao fato das plantas conterem flavonóides, taninos e outros fotoquímicos, que são antimicrobianos conhecidos (PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2009). Narayana *et al.* (2001) demonstraram que os flavonóides tiveram efeito antimicrobiano contra muitas bactérias, principalmente Gram-positivas. Ahmed *et al.*, (2013), relataram que *S. acmella* tem forte atividade inibitória no crescimento bacteriano, principalmente em Gram-positivos, o que coincide com o presente experimento ao encontrar esse efeito em *Staphylococcus* spp.

No entanto, trabalhando-se só com 20 (vinte) amostras com CIM inicial (20%), 16 (80%) apresentaram crescimento quando os respectivos CIM foram inoculadas em meio ABP. Nessa concentração, portanto, acreditamos que o EVJ, para estas 16 (dezesseis) amostras, tenha provocado um efeito bacteriostático nestes 16 isolados, impedindo a replicação bacteriana. Villalobos *et al.* (2019), também observaram efeitos bacteriostáticos em amostras de *Porphyromonas gingivalis* ao utilizar extrato de Jambu. Pode-se tentar se estabelecer um paralelo de comparação versus efeito em relação a bactérias Gram-negativas e positivas, em relação ao efeito do EVJ, visto que *P. gingivalis* é uma bactéria Gram-negativa. No entanto, Arora *et al.* (2011) observaram que extratos de *S. acmella* tiveram atividade ainda maior do que a doxíciclina contra *Klebsiella pneumoniae*, outra bactéria Gram-negativa. Nas demais quatro amostras do EVJ a 20%, sem crescimento em ABP, acreditamos que o efeito tenha sido bactericida. Portanto, essa não uniformidade entre prováveis efeitos bacteriostáticos ou bactericidas, provavelmente se deva aos diferentes perfis de sensibilidade dos isolados, visto que são provenientes de diferentes animais, propriedades e manejo. Neste sentido, observamos que a partir da concentração de EVJ a 5% e inferiores, não se constatou crescimento de *Staphylococcus* spp. no respectivo CIM. Acreditamos que esses isolados possuam um

perfil de sensibilidade mais alto e que, para estes, o EVJ provocou um efeito bactericida.

Um ponto interessante a se ressaltar é o fato de que nas concentrações onde houve crescimento em ABP do CIM (10 e 5% de EVJ) as amostras eram de *S. aureus*. Nossa hipótese associa o fato que, de maneira geral, *S. aureus* é mais patogênico para os bovinos (nas mastites) do que os ECN, e por isso, provavelmente, mais expostos a terapias antimicrobianas do que os ECN. Variações nos índices de resistência são observadas entre regiões ou rebanhos devido à pressão seletiva exercida pelo agente antimicrobiano (RAJALA-SCHULTZ *et al.* 2004). Cabe ressaltar que para alguns isolados de *S. aureus* não houve crescimento em ABP na CIM. Estes provavelmente eram perfis de maior sensibilidade, pois a CIM ocorreu em diluições superiores a 20, 10 e 5%.

## 7 CONCLUSÃO

Em nosso estudo obtivemos alta percentagem de isolamento (93,3%) de *Staphylococcus* spp. das amostras, com 33,9% representando *S. aureus* e 66,1% de estafilococos coagulase-negativa. Neste cenário, verificamos que o extrato vegetal de Jambu provocou inibição no crescimento de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite, em todas as concentrações testadas, exceto a última (a 0,0195%). Para os isolados com CIM menor (maiores concentrações de EVJ) os efeitos, em sua maioria, se comportaram como bacteriostático, ao passo que para isolados com CIM maiores (menores concentrações de EVJ) o efeito foi similar ao bactericida. Acreditamos que essas diferenças em efeitos possam estar ligadas a diferentes níveis de sensibilidade dos isolados.



## 8 REFERÊNCIAS

AHMED S.; RAHMAN A.; MUSLIM T.; SOHRAB M.H; AKBOR M.A; SIRAJ S.; SULTANA, N.; MANSUR.M.A.A. Antimicrobial cytotoxicity and phytochemical activities of *Spilanthes acmella*. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 47, p.437-40, 2013.

ANUÁRIO-LEITE. **EMBRAPA**. 2019. Disponível em: <  
<https://www.embrapa.br/gado-de-leite/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1109959/anoario-leite-2019-novos-produtos-e-novas-estrategias-da-cadeia-do-leite-para-ganhar-competitividade-e-conquistar-os-clientes-finais>>.

Acesso: 02/05/2018.

ARORA, S.; VIJAY, S.; KUMAR, D. Phytochemical and antimicrobial studies on the leaves of *Spilanthes acmella*. **Journal Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, p.145-150, 2011

BAKONDI, E.; SINGH, S.B.; HAJNÁDY, Z.; PÉNZES, M.N.; REGDON, Z.; KOVÁCS, K.; HEGEDUS, C.; MADÁCSY, T.; MALÉTH, J.; HEGYI, P.; DEMÉNY, M.A.; NAGY, T.; KÉKI, S.; SZABO, É.; VIRÁG, L. Spilanthol Inhibits Inflammatory Transcription Factors and iNOS Expression in Macrophages and Exerts Anti-inflammatory Effects in Dermatitis and Pancreatitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, p.4308, 2019.

BANNERMAN, D.D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.87, p.10-25, 2009.

BARHEMA, H.; SCHUKKEN, Y.; ZADOKS, R. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1877-1895, 2006.

BARRAVIEIRA, B. Estudo clínico das estafilocóccias. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v.67, n.2, p.160-192, 1994.

BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L.L., MENEZES, E.A.; MORAIS, S.M.; CUNHA, F.A.; CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade de bactérias

frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Revista Infarma**, v.17, n.314, p.80-3, 2005.

BRAMLEY, A.J.; CULLOR, J.S.; ERSKINE, R.J., et al. **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison: National Mastitis Council, p.64, 1999.

BRITO, L.G.; SALMAN, A.K.D.; GONÇALES, M.A.R.; FIGUEIRÓ, M.R. **Cartilha para o produtor de leite de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2007. p.40. Disponível em: <  
[https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/24649/1/doc100cartilhaproduto\\_rleite.pdf](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/24649/1/doc100cartilhaproduto_rleite.pdf)> . Acesso em: 02/05/2018.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T.; VEIGA, V.M.O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.129-135, 1999.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamárias bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.10-17, 2001.

BUNYAPRAPHATSARA, N.; CHOKECHAREUNPORN, O. Tradition medicinal plants. **Prachachon**: Bangkok. 1999.

BURVENICH, C.; VAN MERRID, V.; MEHRZAD, J.; EZ-FRAILE, A.; DUCHATEAU, L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Veterinary Research**, v.34, p.521-564, 2003.

CARDOSO, H.F.T.; COSTA, G.M.; SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.22, n.5, p.199-206, 2000.

CAPURRO, A.; ARTURSSON, K.; WALLER, K.P.; BENGTSSON, B.; ERICSSON-UNNERSTAD, H.; ASPÁN, A. Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and tuf gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococci

isolated from cases of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.134, n.3-4, p.327-333, 2009.

**CEILite** – Centro de Inteligência do Leite – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Leite em Números. Disponível em: <[https://www.cileite.com.br/leite\\_numeros\\_producao](https://www.cileite.com.br/leite_numeros_producao)>. Acesso em: 25/05/2020.

CHANG, M.R.; CARVALHO, N.C.P.; OLIVEIRA, A.L.L.; MONCADA, P.M.F.; MORAES, B.A.; ASENSI, M.D. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz. Journal of Infectious Diseases**, v.7, n.2, p.149-160, 2003.

**CNA - CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL.** Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/noticias/producao-de-leite-deve-crescer-25-em-2018>. Acesso em: 25/05/2020.

**COSTA, C.N.C. Desempenho fotossintético, crescimento, produção e qualidade pós-colheita de variedades de jambu sob calagem e fertilização nitrogenada.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, PA. 2020.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R., WATANABE, E.T.; WHITE, C.R.; PARDO, R.B. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.17, n.5, p.215-217, 1995.

COUTINHO, L.N.; APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B. Galhas e deformações em Jambu (*Spilanthes oleraceae*) causadas por *Tecaphora spilanthes* (Ustilaginales). **Summa Phytopathol**, Botucatu, v.32, n.3, p.283-285, 2006.

CUNHA, M.L.R.S. LOPES, C.A.M.; RUGOLO, L.M.S.S.; CHALITA, L.V.A.S. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. **Jornal de Pediatria**, v.78, n.4, p. 279-288, 2002.

DIAS, A.M.A., SANTOS, P.; SEABRA, I.J.; JUNIOR, R.N.C.; BRAGA, M.E.M.; SOUSA, H.C. Spilanthal from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v.61, p.62-70, 2012.

DINIZ, C.M.; MELO, R.T.; MENDONÇA, E.P.; COELHO, L.R.; FONSECA, B.B.; ROSSI, D.A. Resistência a oxacilina em *Staphylococcus* spp isolado de leite mastítico. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.69, p.482-8, 2010.

DOMINGO D, LÓPEZ-BREA M. Plantas con acción antimicrobiana. **Revista Española de Quimioterapia**, v.16, p.385-93, 2003.

DONATELE, D.M.; MOTTA, O.V.; FOLLY, M.M. Perfil antimicrobiano de linhagens de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva na mastite subclínica de vacas leiteiras nas regiões norte e noroeste do Estado do Rio de Janeiro. **Revista NAPGAMA**, v.5, n.2, p.3-6, 2002.

DOS REIS C.B, M.; BARREIRO, J.R.; MESTIERI, L.; DE FELÍCIO PORCIONATO, M.A.; DOS SANTOS, M.V. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. **BMC Veterinary Research**, v.9, p.67, 2013.

EBERHART, R.J. Management of dry cows to reduce mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.1721-1732, 1986.

ERSKINE, R.J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F.J. Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary Clinical Food Animal Practice**, v.19, p.109-138, 2003.

FABRY, W.; OKEMO, P. O.; ANSONG, R. Fungistatic and fungicidal activity of east African medicinal plants. **Mycoses**, v.39, p.67-70, 1996.

**GERMAP**. GERMAP 2015. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human-und Veterinärmedizin in Deutschland; Bundesamt für Verbraucherschutz: Berlin, Germany; ISBN 978-3-9818383-0-5. 2016.

GRESHAM, H.D.; LOWRANCE, J.H.; CAVER, T.E.; WILSON, B.S.; CHEUNG, A.L.; LINDBERG, F.P. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. **Journal of Immunology**, v.164, p.3713-3722, 2000.

GRUET, P.; MAINCENT, P.; BERTHELOT, X., KALTSATOS, V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.50, p.245-259, 2001.

- HAW, A.B.; KENG, C.L. Micropropagation of *Spilanthes acmella* L., a bio-insecticide plant, through proliferation of multiple shoots. **Journal of Applied Horticulture**, v.5, p.65-68, 2003
- HYDE, R. M.; DOWN, P. M.; BRADLEY, A. J.; BREEN, J. E.; HUDSON, C.; LEACH, K.A & GREEN, M. J. Automated prediction of mastitis infection patterns in dairy herds using machine learning. **Scientific Reports**, v.10, p.4289, 2020.
- HORTET, P. & SEEGER, H. Calculated milk production losses associated with elevated somatic cell counts in dairy cows: review and critical discussion. **Veterinary Research**, v.29, p.497-510, 1998.
- KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, p.17-40, 1994.
- KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. Staphylococcus and Micrococcus. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H.; editores. **Manual of Clinical Microbiology**. 6<sup>a</sup>ed. Washington: American Society Microbiology; p.264-82, 1999.
- LANGONI, H.; PINTO, M.P.; DOMINGUES, P.F.; LISTONI, F.J.P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, n.6, p.507-515, 1991.
- LAFFRANCHI, A.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.1027-1032, 2001.
- LEITNES, G., KRIFUCKS, O., MERIN, U., LAVI, Y. & SILANIKOVE, N. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physicochemical properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, v.16, p.648-654, 2006.
- MITTERHUEMER, S.; PETZL, W.; KREBS, S.; MEHNE, D.; KLANNER, A.; WOLF, E.; ZERBE, H.; BLUM, H. *Escherichia coli* infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland. **BMC Genomics**, v.11, p.138, 2010.

MORETTI, A.; PASQUALI, P.; MENCARONI, G.; MENCARONI, L.; BONCIO, D.; FIORETTI, D.P. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria). **Journal of Veterinary Medicine**, Series B, v.45, p.129-132, 1998.

NARAYANA K.R.; REDDY M.S.; CHALUVADI M.; KRISHNA, D. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian journal of pharmacology**, v.33, p.2-16, 2001.

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

NUNES, A. P. F. ***Staphylococcus coagulase-negativa: diferenciação em espécies, diversidade genômica de espécies resistentes à oxacilina e determinação da susceptibilidade a glicopeptídeos***. Rio de Janeiro, RJ. Dissertação (Mestrado), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

QUE, Y-A.; MOREILLON, P. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th ed.; **Elsevier Saunders**: Philadelphia, PA, USA, p.2237-2271, 2015.

PADHAN, D.; PATTNAIK, S.; BEHERA, A.K. Growth-arresting Activity of *Acmella* Essential Oil and its Isolated Component D-Limonene (1,8 P-Mentha Diene) against *Trichophyton rubrum* (Microbial Type Culture Collection 296). **Pharmacognosy Magazine**, v.13, p.555-560, 2017.

PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v.14, p.850-867, 2009.

PUMIPUNTU, N.; KULPEANPRASIT, S.; SANTAJIT, S.; TUNYONG, W.; KONG-NGOEN, T.; HINTHONG, W.; INDRAWATTANA, N. Screening method

for *Staphylococcus aureus* identification in subclinical bovine mastitis from dairy farms. **Veterinary World**, v.10, p.721-726, 2013.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONENA, S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v.134, n1/2, p.3-8, 2009

RABELLO, R.F.; SOUZA, C.R.V.M.; DUARTE, R.S.; LOPES, R.M.M.; TEIXEIRA, L.M.; CASTRO, A.C.D. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, **Brazil. Journal of Dairy Sciences**, v.88, p.3211-3219, 2005.

RAJALA-SCHULTZ, P.J.; SMITH, K.L.; HOGAN, J.S.; LOVE, B.C. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Veterinary Microbiology**, v.102, p.33-42, 2004.

RANI S.A.; MURTY S.U. Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. **African Journal of Biomedical Research**, v.9, p.67-69, 2006.

RINCÓN C.A.M.v.; CASTAÑO J.C.O.; RÍOS E.V. Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.17, p.160-171, 2012.

ROSS, T.L.; FUSS, E.P.; HARRINGTON, S.M.; CAI, M.; PERL, T.M.; MERZ, W.G. Methicillin-Resistant *Staphylococcus caprae* in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.1, p.363-367, 2005.

RUEGG, P.L. A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.10381-10397, 2017.

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

SAHU, J.; JAIN, K.; JAIN, B.; SAHU, R.K. A review on phytopharmacology and micropropagation of *Spilanthes acmella*. **Pharmacologyonline newslett**, v.2, p.1105-1110, 2011.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SANTOS, M.V.; REIS, C.B.M. Mastite por *Staphylococcus* coagulase negativa. Piracicaba – SP: Milkpoint. 2009. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/mastite-por-istaphylococcosi-coagulase-negativa-56691n.aspx> >. Acesso em: 21 dez 2018.

SCHLEGELOVÁ, J.; DENDIS, M.; BENEDÍK, J.; BABAK, V. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on farms differ in coagulase genotype. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.327-334, 2003.

SCHUKKEN, Y.H.; GÜNTHER, J.; FITZPATRICK, J.; FONTAINE, M.C.; GOETZE, L.; HOLST, O.; LEIGH, J.; PETZL, W.; SCHUBERTH, H.-J.; SIPKA, A.; SMITH, D.G.E.; QUESNELL, R.; WATTS, J.; YANCEY, R.; ZERBE, H.; GURJAR, A.; ZADOKS, R.N.; SEYFERT, H.M. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.144, p.270–289, 2011.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, v.34, p.475-491, 2003.

SHARMA, R. Medicinal plants of India – na encyclopedia. Delhi: **Daya Publishing House**. 2003.

SILVA, A.E. **Jambu (*spilanthes oleracea* Linn.) minimamente processado: compostos bioativos e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 2015.

SILVA, M.V.M.; ARAÚJO, K.P.C. Mastite e qualidade do leite. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**, Belo Horizonte, p. 20-23, 2008.

SILVA, W.P.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.2, p.103-106, 2000.



SILVEIRA-FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; FREITAS, M.L.F.; LUZ, I.S.; ALMEIDA, A.M.P.; LEAL, N.C.; SENA, M.J.; MOTA, R.A. Molecular epidemiologic study of *Staphylococcus aureus* associated to bovine mastitis from Pernambuco state, Brazil. **Revista NAPGAMA**, v.8, n.1, p.12-17, 2005.

SINGHAL, R.; DHAWAN, S.; MOHANTY, S.; SOOD, S. Species distribution & antimicrobial susceptibility of coagulase negative *Staphylococci* in a tertiary care hospital. **Indian Journal of Medical Research**, v.123, p.569-570, 2006.

SIMÕES, T.V.M.D.; OLIVEIRA, A.A. Mastite bovina, considerações e impactos econômicos. **Documentos/Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 170, p.25. 2012. Disponível em: [http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes\\_2012/doc\\_170.pdf](http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf). Acesso em: 02/05/2018.

SOL, H.W.; BARKEMA, Y.H. Schukken. Factors Associated with Cure after Therapy of Clinical Mastitis Caused by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.278-284, 2000.

STEPHAN, R.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A.A.; LÄMMLER, C. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v.78, p.373-382, 2001.

TAPONEN, S. **Bovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci**. Academic dissertation. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Walter Hall, Agnes Sjöbergin katu 2, Helsinki, 2008.

TIWARI, K.L.; JADHAV, S.K.; JOSHI, V. Na updated review on medicinal herb genus *Spilanthes*. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v.9, p.1170-1178, 2011

VAN ARENDONK, J.A.M., HOVENIER, R., DE BOER, W. Phenotypic and genetic association between fertility and production in dairy cows. **Livestock Production Science**, v.21, p.1-12, 1989.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of

*Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, Geneva, v.92, p.179-185, 2003.

VERMONT, C.L.; HARTWIG, N.G.; FLEER, A.; MAN, P.; VERBRUGH, H.; ANKER, J.V.D.; GROOT, R.; BELKUM, A.V. Persistence of clones of coagulase-negative staphylococci among premature neonates in neonatal intensive care units: two-center study of bacterial genotyping and patient risk factors. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.9, p.2485-2490, 1998.

VILLALOBOS, I.M.; DORIA, J.F.; HERRERA A.H.; CABALLERO, A.D. Evaluation of the antibacterial activity of the extract of *Spilanthes acmella* In *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mutans*. **British Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v.4, p.1701-1709, 2019.

VINTOV, J.; AARESTRUP, F.M.; ZINN, C.E.; OLSEN, J.E. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. **Veterinary Microbiology**, v.95, p.133-147, 2003.

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, p.7-14, 2015.

WU, L.C.; FAN, N.C.; LIN, M.H.; CHU, I.R.; HUANG, S.J.; HU, C.Y.; HAN, S.Y. Antiinflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.2341-9, 2008

YADAV, K.; SINGH, B. Micropropagation of *Spilanthes acmella* Murr. – An important medicinal plant. **Nature and Science**, v.8, p.5-11, 2010

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

ZSCHÖCK, M.; BOTZLER, D.; BLÖCHER S.; SOMMERHÄUSER, J.; HAMANN, H.P. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome

toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. **International Dairy Journal**, v.10, p.569-574, 2000.