



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Pró-Reitoria de Pós-Graduação
Programa de Pós-graduação em Biociência Animal
Péricles Tavares Austregésilo Filho

**Avaliação fitoquímica e da atividade antimicrobiana dos extratos
hidroalcóólico e hexânico das folhas de *Melaleuca leucadendra*
(Myrtaceae) em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite
bovina**

Recife
2024



**Universidade Federal Rural de Pernambuco
Pró-Reitoria de Pós-Graduação
Programa de Pós-graduação em Biociência Animal
Péricles Tavares Austregésilo Filho**

**Avaliação fitoquímica e da atividade antimicrobiana dos extratos
hidroalcóólico e hexânico das folhas de *Melaleuca leucadendra*
(Myrtaceae) em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite
bovina**

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biociência Animal.

**Recife
2024**

Dados Internacionais de
Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de
Pernambuco Sistema Integrado de
Bibliotecas

Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

A938a Austregésilo-Filho, Péricles Tavares Austregésilo Filho
Avaliação fitoquímica e da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcolóico e hexânico das folhas de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina / Péricles Tavares Austregésilo Filho Austregésilo-Filho. - 2024.
91 f. : il.

Orientador: Rinaldo
Aparecido Mota.
Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2024.

1. Fitoterapia. 2. Mastite. 3. Metabólitos. 4. Resistência Antimicrobiana. I. Mota, Rinaldo Aparecido, orient. II. Título

CDD 636.089

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica.

Péricles Tavares Austregésilo Filho

Data de aprovação ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. René Duarte Martins

Departamento de Saúde Coletiva (Farmacologia) – UFPE

Profa. Dra. Eulina Tereza Nery Faris

Departamento de Medicina Veterinária – UNIFACOL

Prof. Dr. Gibson Gomes de Oliveira

Departamento de Medicina Veterinária – UNIFACOL

Prof. Dr. José Antonio de Sousa Pereira Junior

Departamento de Medicina Veterinária – UNIFACOL

DEDICATÓRIA

A minha esposa Veralúcia e meus filhos Vinnycius, Victor e Bárbara.

À minha mãe Rivanda.

Na família encontramos forças para superar qualquer obstáculo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida concedida, por me ensinar que a fé nos fortalece a superar todos os desafios.

À minha mãe Dna. Rivanda por me acompanhar em todos os caminhos trilhados.

Ao meu amor Veralúcia Autregésilo por me dar as mãos quando pensei em fraquejar e ao nosso filho Vinnycius que me ensinou a ser pai novamente. A Victor meu filho pelo carinho e atenção sempre comigo. À Bárbara minha filha e aos meus netos Benjamin, Luisa e Rebeca, as fofuras mais lindas do mundo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rinaldo Mota, pela acolhida, disponibilidade, atenção e todo apoio no decorrer de sua orientação.

Às amigas Mauricéia e Eulina por me darem a oportunidade de retornar a academia e fazer esse projeto de vida tão lindo.

Aos amigos Prof. Gibson e Prof. Antônio pelo incentivo, apoio nas avaliações fitoquímicas e nas publicações.

À amiga Profa. Amanda Silva e todos que fazem parte do Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE pelas análises e suporte.

Aos amigos e amigas que fiz durante o decorrer do curso e todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho. Muito obrigado!

EPÍGRAFE

“Junta-se aos bons e serás um deles”

Autor desconhecido.

RESUMO

Objetivou-se neste estudo realizar a avaliação fitoquímica e atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico e hexânico das folhas de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae), na concentração de 20mg/mL, em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. Após identificação da planta foram realizados o preparo dos extratos que foram submetidos aos testes fitoquímicos e antibacterianos. A verificação da presença das classes dos metabólitos foi realizada por análise cromatográfica por técnicas tradicionais e a verificação dos compostos por espectrometria de massa acoplada a eletrosplay HPLC-DAD-ESI(+)-MS/MS (micrOTOF-QII) (ESI-MS); o extrato hidroalcoólico e hexânico foram analisados por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS). Para avaliar a ação antibacteriana foram verificadas a concentração inibitória (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) em isolados de *Staphylococcus aureus* de mastite bovina. Nos resultados foram verificados a presença de terpenos, flavonoides glicosilados, flavonoides aglicona, triterpenos, tanino e a espectrometria identificou 13 superclasses químicas com 88 compostos. No cromatograma GC-MS foram encontrados 37 picos, correspondentes a 37 compostos químicos. Os extratos hidroalcoólico e hexânico apresentaram metabólitos com atividade biológica comprovada na literatura especializada. Por sua vez, os mesmos extratos apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas de *Staphylococcus aureus* causadores de mastite bovina, demonstrando ser uma alternativa no tratamento da doença.

Palavras-chave: Fitoterapia; Mastite; Metabólitos; Resistência Antimicrobiana.

ABSTRACT

The objective of this study was to carry out the phytochemical evaluation and antimicrobial activity of the hydroalcoholic and hexanic extract of the leaves of *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae), at a concentration of 20mg/mL, on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. After plant identification, extracts were prepared and subjected to phytochemical and antibacterial tests. Verification of the presence of metabolite classes was carried out by chromatographic analysis using traditional techniques and verification of compounds by mass spectrometry coupled to electrospray HPLC-DAD-ESI(+)-MS/MS (micrOTOF-QII) (ESI-MS) ; the hydroalcoholic and hexane extract were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). To evaluate the antibacterial action, the inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were verified in isolates of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. The results verified the presence of terpenes, glycosylated flavonoids, aglycone flavonoids, triterpenes, tannin and spectrometry identified 13 chemical superclasses with 88 compounds. In the GC-MS chromatogram, 37 peaks were found, corresponding to 37 chemical compounds. The hydroalcoholic and hexane extracts presented metabolites with biological activity proven in the specialized literature. In turn, the same extracts showed antimicrobial activity against strains of *Staphylococcus aureus* that cause bovine mastitis, proving to be an alternative in the treatment of the disease.

Keywords: Phytotherapy; Mastitis; Metabolites; Antimicrobial Resistance.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
<i>Melaleuca</i> e suas aplicações	11
Ação antimicrobiana da <i>Melaleuca</i>	14
Mastite	15
Mastite e a fitoterapia	17
3 OBJETIVOS	18
Geral	18
Específicos	18
4 REFERÊNCIAS	19
5 CAPÍTULO 1	28
DESREPLICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO EXTRATO DE <i>Melaleuca leucadendra</i> (Myrtaceae)	28
RESUMO	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	42
6 CAPÍTULO 2	51
Atividade antimicrobiana de <i>Melaleuca</i> spp. (Myrtaceae) frente a isolados bacterianos causadoras da mastite bovina: uma análise cienciométrica (Publicado no periódico Conjecturas, Vol. 22, Nº 18. P..1012-1024. https://doi.org/10.53660/CONJ-2240-2W83 . 2022)	51
RESUMO	51
ABSTRACT	52
INTRODUÇÃO	53
METODOLOGIA	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	63
7 CAPÍTULO 3	66

Atividade antimicrobiana do extrato de <i>Melaleuca leucadendra</i> (Myrtaceae) em bactérias causadoras da mastite bovina (Publicado em Peer Review, 5(16), 115–128. https://doi.org/10.53660/772.prw2222 . 2023)	66
RESUMO	66
ABSTRACT	67
INTRODUÇÃO	68
MATERIAL E MÉTODOS	69
RESULTADOS	71
DISCUSSÃO	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
8 CAPÍTULO 4.....	81
Phytochemical investigation of hexanic extract of the <i>Melaleuca leucadendra</i> (l) l. Myrtaceae (Publicado em Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.8, n.8, p.59651-59658. https://doi.org/10.34117/bjdv8n8-310 . 2022)	81
ABSTRACT	81
RESUMO	82
INTRODUCTION	83
OBJECTIVE	83
MATERIALS AND METHODS.....	83
RESULTS AN DISCUSSION	84
CONCLUSIONS	86
ACKNOWLEDGMENTS	86
REFERENCES	86
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a inflamação da glândula mamária causada por bactérias patogênicas, além de outros agentes infecciosos como fungos, vírus e algas (ESSA *et al.*, 2023). A doença é a mais frequente na produção de leite e compromete sua qualidade (AUSTREGÉSILO-FILHO *et al.*, 2022); é propagada nos rebanhos e onera a produção e a indústria de laticínios (LOPES *et al.*, 2018).

Os agentes infecciosos podem ser transmitidos diretamente de animal para animal, principalmente durante a ordenha, sendo causada por bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* responsáveis pela mastite contagiosa (ACOSTA *et al.*, 2016). Por outro lado, também pode ocorrer a mastite ambiental cuja forma de transmissão é causada por microrganismos presentes no ambiente como *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis* (CALIMAN *et al.*, 2023). Segundo Langoni (2013), quando a bactéria se localiza na mama (glândulas) esta consome os componentes do leite e se propaga em alto nível.

Na maioria dos casos, a não efetividade do tratamento, muitas vezes pode levar ao uso indiscriminado de antimicrobianos, sem recomendações do médico veterinário, o que pode levar a um problema ainda maior, que é a seleção de microrganismos resistentes, causadores das mastites crônicas (ARCANJO *et al.*, 2017).

Staphylococcus aureus é o agente patogênico mais frequente na mastite bovina. Entretanto, o controle e o tratamento desta infecção frequentemente enfrentam dificuldades devido à complexa natureza das diferentes cepas e um traço de grande relevância desses organismos é o fenômeno resistência aos fármacos (LI *et al.*, 2017). Esse patógeno tende a ser resistente a múltiplos antimicrobianos, especificamente à meticilina, devido a presença do gene *mecA* (ASGHAR, 2014)

O emprego de antimicrobianos sem orientação do profissional veterinário pode ocasionar a seleção de microrganismos resistentes, gerando dificuldade no sistema de produção do leite. Desta forma, é possível que esses agentes venham a ser responsáveis pelo desenvolvimento de mastites crônicas (ARCANJO *et al.*, 2017). Além disso, Martin (2011) relata que os resíduos de antibióticos podem provocar problemas de saúde tanto nos animais quanto nos humanos.

O tratamento convencional da mastite baseia-se no uso de antibióticos, porém, é crescente o interesse em alternativas terapêuticas como a fitoterapia

que pode ser utilizada como coadjuvante ou até mesmo substituir o uso de antibióticos (AUSTREGÉSILO-FILHO *et al*, 2023)

Uma alternativa é a busca por produtos naturais, que sejam efetivos e causem menos danos a produção de leite, perdas pelo descarte, mortes dos animais e custos com tratamento. Dentre as diferentes fontes de produtos naturais, as plantas são consideradas promissoras, onde são realizados estudos iniciais a partir de extratos hidroalcoólicos no tratamento da mastite como relatado por Schuch *et al.* (2008), e cujos resultados demonstraram evidência de inativação bacteriana a partir de testes com extratos de plantas.

Nader *et al.* (2010) avaliaram a eficácia da fitoterapia em vacas leiteiras com mastite. Os resultados indicaram que o tratamento foi capaz em reduzir a atividade microbiana da glândula mamária frente à infecção com *Staphylococcus aureus*, além de algumas plantas que apresentarem potencial anti-inflamatório e antioxidante. Os autores utilizaram *Lippia sidoides* (folha), *Cochlospermum regium* (casca, entre casca e cerne da raiz), *Baccharis dracunculifolia* (folha), *Croton antisiphiliticum* (raíz) e *Eugenia dysenterica* (folha).

Mendonça *et al.* (2021) também utilizaram a fitoterapia em testes *in vitro* com as espécies *Eugenia uniflora* L. e *Psidium guajava* L., registrando atividade antimicrobiana frente a isolados de *Staphylococcus aureus* da mastite bovina e Silveira *et al.* (2023) observaram que a utilização de extratos de plantas nativas do cerrado (*Lafoensia pacari*, *Hymenaea sp.* e *Stryphnodendron adstringens*), apresentaram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter sp.* e *Escherichia coli*, bem como ações anti-inflamatória e antioxidante, contribuindo para a diminuição da incidência de casos de mastite e melhoria da saúde do animal.

Hemaiswarya *et al.* (2008), Langeveld *et al.* (2014) e Magi *et al.* (2015) realizaram estudos relacionando a potencialidade dos compostos fitoquímicos e a possibilidade de reduzir o uso de antibióticos; associaram a atividade sinérgica de extratos vegetais contra microorganismos, principalmente bactérias resistentes a medicamentos. Austregésilo-Filho *et al.* (2022b) relataram que estudos sobre a eficácia de espécies do gênero *Melaleuca* (Myrtaceae) contra bactérias causadoras de mastite têm se concentrado nos componentes químicos do óleo essencial.

Desta forma, este estudo realizou a avaliação fitoquímica e a atividade antimicrobiana do extrato bruto das folhas de *Melaleuca leucadendra*

(Myrtaceae) frente a isolados de *Staphylococcus aureus* causadores da Mastite Bovina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

***Melaleuca* e suas aplicações**

Plantas medicinais são espécies vegetais usadas para fins terapêuticos. Essa prática existe desde tempos antigos, abrangendo várias civilizações (SAAD *et al.*, 2018).

O homem utiliza recursos naturais para benefício próprio e dos rebanhos e há muito tempo, o conhecimento sobre plantas medicinais evoluiu para aplicação na área da saúde. A pesquisa fitoterápica veterinária cresceu devido a seus benefícios potenciais, como menor probabilidade de resistência antimicrobiana em microorganismos, menor geração de resíduos medicamentosos nos alimentos, formas farmacêuticas mais simples e inclusão do saber local na terapêutica (WALLER *et al.*, 2001; TOYANG *et al.*, 2007).

Os metabólitos secundários presentes nas plantas têm uma função primordial na defesa contra microorganismos, insetos e animais, além de auxiliar na adaptação e regulação. No entanto, quando consumidos por outros seres vivos, esses metabólitos podem ter propriedades terapêuticas, sendo utilizados para o tratamento de doenças (SIMÕES *et al.* 2017).

As plantas que compõem o gênero *Melaleuca* (família Myrtaceae) se originam das regiões costeiras da Austrália, compondo cerca de 230 espécies amplamente distribuídas em todo o mundo, principalmente na Austrália, América tropical, Sul da Ásia e Indonésia (CRAVEN; LEPSCHI, 1999).

Bean (2020) relata as principais características taxonômicas morfológicas da espécie *M. leucadendra*, que apresenta inflorescências espigadas, picos de 30–150 mm de comprimento; folhas maiores com 40–150 mm de comprimento; estames glabros; feixes de estames com 9–22 mm de comprimento; frutas 4,5–6,5 mm de diâmetro; pelos de folha 0,2–0,8 mm de comprimento ou ausentes e inflorescências de 24–30 mm de largura.

São árvores com até 7m de altura, que possuem uma copa espessa, folhas sem pêlos que medem de 10 a 35 mm de comprimento e cerca de 1 mm de largura, enquanto a filotaxia das folhas é espalhada em espiral (MONZOTE *et al.*, 2020). Glândulas proeminentes enriquecidas com óleo aromático são

encontradas nessas folhas (JOHNS *et al.* 1992). Franklin *et al.* (2007) estudaram a distribuição do gênero e indicam que *Melaleuca leucadendra* ocorre em uma ampla gama de solos, os profundamente alagáveis, ao longo de córregos, em várzeas e pântanos.

A família *Myrtaceae* é reconhecida por suas propriedades medicinais e aromáticas. O gênero *Melaleuca* abriga espécies amplamente utilizadas na medicina tradicional e seu perfil fitoquímico e antimicrobiano tem despertado grande interesse científico devido ao potencial terapêutico que essas plantas podem oferecer (CARSON *et al.*, 2006; HAMMER *et al.*, 1999; SCHNEIDER e KORBES, 2022).

As principais espécies (*M. alternifolia*, *M. quinquenervia*, *M. bracteata* e *M. cajuputi*) têm sido submetidas à extração de óleo essencial que é conhecido mundialmente como óleo de “tea tree” (YASIN *et al.*, 2021). Também é conhecido como óleo de cajupat ou óleo de *tea tree* australiano, pelo fato das espécies de plantas que o produzem serem nativas daquela região. A cor do óleo varia de transparente a levemente amarelada, tem efeito refrescante como o mentol e odor semelhante à cânfora (TRAN *et al.*, 2013). Tanavat *et al.* (2022) também as indicaram para plantio para produção de madeira.

A espécie *Melaleuca leucadendra* possui vários metabólitos secundários, dentre eles: terpenos, flavonoides glicosilados, flavonoides aglicona, triterpenos e taninos, entre outros. Esses compostos têm mostrado uma variedade de atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas em vários estudos (SILVA *et al.*, 2020; SHAH *et al.* 2013, RINI *et al.* 2012).

Na Segunda Guerra Mundial, o óleo de *tea tree* foi utilizado como agente antimicrobiano e repelente de insetos. Com o passar do tempo, suas aplicações e popularidade se expandiram, sendo atualmente utilizado como conservante, fungicida, biocida natural e em cosméticos, aromaterapia, além de medicamentos alopáticos e fitoterápicos (YASIN *et al.*, 2021). Syarifah *et al.* (2022) testaram os compostos da *Melaleuca leucadendra* na inibição do vírus SARS-CoV-2 e Monzote *et al.* (2020) testaram o óleo no tratamento da leishmaniose que foi capaz de controlar o tamanho da lesão e a carga parasitária no modelo de leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c causada por *Leishmania amazonensis* em comparação aos animais não tratados ($p < 0,05$) e semelhante aos tratados com Glucantime® ($p > 0,05$).

A espécie mais investigada para a produção de óleo essencial é a *Melaleuca alternifolia*, que é uma planta que em condições naturais cresce até 8 metros (SOUTHWELL; LOWE, 1999). O óleo desperta o interesse de diferentes indústrias por possuir algumas propriedades medicinais, dentre essas, a atividade antimicrobiana (CARSON *et al.*, 2006). Já foram observados seus efeitos contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, *S. mutans* e *Candida albicans* (LAM *et al.*, 2020), além da ação na cicatrização de feridas (TULLIO *et al.*, 2019). Austregésilo-Filho *et al.* (2022a) relataram as potencialidades da *Melaleuca leucadendra* por sua ampla gama de atividades biológicas.

Efeitos anti-inflamatórios também foram evidenciados como em uma recente revisão sistemática, com o objetivo de saber se o óleo de *tea tree* é uma alternativa viável a clorexidina no manejo da doença gengival e periodontal em adolescentes e adultos (SINGH *et al.*, 2022), e verificou-se que o óleo foi superior à clorexidina na redução dos sinais de inflamação gengival. Diallo *et al.* (2022) confirmaram as atividades antibacteriana e anti-inflamatória dos óleos essenciais das folhas de *Melaleuca leucadendra*, onde o óleo exibiu atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Al-Sayed *et al.* (2019) relataram o potente efeito gastroprotetor da casuarinina extraído da *Melaleuca leucadendra* atribuído aos seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antiapoptóticos, sugerindo a potencial aplicação da casuarinina como agente antiúlcera.

Além disso, já se conhece a sua atividade antitumoral, como verificado em um estudo, no qual o concentrado de *Melaleuca alternifolia* mostrou atividade anticancerígena significativa contra linhagens celulares de câncer de próstata e mama humano (CLARK *et al.*, 2021). Em animais, a *Melaleuca* e o terpinen-4-ol (principal componente do óleo) demonstraram atividade contra diversos modelos de neoplasia maligna em camundongo como câncer colorretal, melanoma, mesotelioma e câncer de pulmão, no entanto a interrupção completa da progressão do tumor não foi obtida (GREAY *et al.*, 2010; IRELAND, *et al.*, 2012; NAKAYAMA *et al.*, 2017; SHAPIRA *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2012).

Sharifi-Rad *et al.* (2017) relataram que *Melaleuca leucadendra* possui inúmeras aplicações reconhecidas na medicina tradicional de diversos países. No Vietnã são utilizadas para tratar a gota; na Indonésia, no tratamento de vertigens, dor de dente, reumatismo, obesidade e hiperlipidemia; em países da América do Sul são utilizadas no tratamento da psoríase; nas Filipinas como

antimalárico; no Senegal para tratar doenças respiratórias, inflamações e dermatite e em Taiwan para aliviar a dor.

Ação antimicrobiana da *Melaleuca*

O aumento da quantidade de bactérias resistentes aos antibióticos tem despertado o interesse em produtos vegetais como agentes antimicrobianos de uso combinado com fármacos. Esta atividade sinérgica, visa controlar a patogenia de alguns microorganismos (HEMAISWARYA *et al.*, 2008). Um grupo relevante de compostos antimicrobianos vegetais é composto pelos óleos essenciais que se tratam de misturas complexas de metabólitos secundários voláteis. Os óleos essenciais e seus componentes podem atuar em conjunto com alguns antibióticos, potencializando sua atividade antimicrobiana, ou ainda oferecer possibilidade para reduzir o uso dessa classe de medicamentos (LANGEVELD *et al.*, 2014; MAGI *et al.*, 2015).

Nessa perspectiva, as propriedades antimicrobianas da melaleuca são em geral atribuídas à capacidade dos seus componentes de hidrocarbonetos se dividirem em membranas biológicas, prejudicando sua integridade estrutural e funcional (SIKKEMA *et al.*, 1995). Hidrocarbonetos terpenos aromáticos voláteis compõem o óleo da melaleuca que resultam em cerca de 100 componentes moleculares com diferentes concentrações (BROPHY *et al.*, 1989). Os principais componentes são α -terpineno, γ -terpineno, terpineno-4-ol e eucaliptol (MORI; USUKI, 2022).

O óleo essencial da espécie *Melaleuca alternifolia* possui conhecidas propriedades medicinais contra bactérias resistentes causadoras de infecções dermatológicas, atividade antifúngica, é usada na odontologia contra a formação de biofilme e anti-inflamatório, ações antitumorais e anestésicas (CARMO *et al.*, 2021; CASARIN *et al.*, 2019; IRELAND *et al.*, 2012; KOZICS *et al.*, 2019).

Em animais, já se verificou melhora acentuada de lesões de dermatofilose com o uso do óleo de melaleuca em cavalos (FRYE *et al.*, 2019). Também foi evidenciado que o óleo extraído de *Melaleuca alternifolia* junto à *Litsea citrata* pode modular a produção de fatores de virulência e respostas imunológicas e se tornar parte de intervenção para controlar a vibriose em um ambiente de aquicultura de peixes ou camarões (ZHENG *et al.*, 2021).

Além disso, um estudo observou que o óleo de *Melaleuca alternifolia* pode afetar a viabilidade de protoscoleces de *Echinococcus ortleppi*, sugerindo uma opção de protocolo para o tratamento da equinococose cística no gado bovino (MONTEIRO *et al.*, 2017). Além disso, testes *in vitro* já verificaram que o óleo de *tea tree* entre 5 e 10%, apresentou 100% de eficácia no controle dos carrapatos em vacas leiteiras (PAZINATTO BOITO *et al.*, 2016).

Mastite

A mastite bovina é a inflamação da glândula mamária que ocorre por diversos fatores infecciosos com múltiplas causas que envolvem uma variedade de patógenos, o ambiente e outros relacionados ao animal, os microrganismos de maior prevalência são *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* que ocasionam a mastite contagiosa, a doença também pode ser causada por microrganismos ambientais (mastite ambiental), como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, leveduras, algas e fungos (FAZOLI *et al.*, 2023; ACOSTA, 2016)

A mastite é geralmente causada por diferentes microrganismos, sendo uma doença bastante frequente em vacas leiteiras em todo o mundo (ADDIS *et al.* 2016a.; OIKONOMOU *et al.*, 2012). A mastite pode reduzir a qualidade e a quantidade do leite e merece atenção especial devido aos danos sanitários e econômicos (ADDIS *et al.*, 2016b).

Existe uma alta variação na frequência dos patógenos da mastite entre os rebanhos e os locais pesquisados, as infecções por *Staphylococcus aureus* são de difícil controle e esta bactéria costuma causar mastite subclínica, clínica ou crônica, além de doenças tanto em humanos quanto em animais domésticos (Li *et al.*, 2017).

Nessa perspectiva, um estudo objetivou identificar patógenos emergentes associados à mastite bovina no Nordeste do Brasil e caracterizá-los quanto à resistência fenotípica e genotípica a antimicrobianos (DE OLIVIERA *et al.*, 2022), os pesquisadores avaliaram um total de 321 amostras de leite de vacas com mastite subclínica, e os isolados obtidos em cultura foram identificados por meio de dessorção-ionização a laser associada à matriz - espectrometria de massa de tempo de voo (MALDI-TOF MS). Foram identificadas 72 bactérias consideradas emergentes na região de estudo. O antibiograma revelou os

seguintes perfis de resistência: ampicilina (77,7%; 56/72), cefoxitina (69,4%; 50/72), eritromicina (61,1%; 44/72), oxacilina (63,8%; 46/72), penicilina (79,1%; 57/72), tetraciclina (63,8%; 46/72), gentamicina (25,0%; 18/72) e vancomicina (20,8%; 15/72). Os autores reforçaram que bactérias emergentes com potencial zoonótico e multirresistentes ocorrem em vacas com mastite na região nordeste do Brasil (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022).

O uso excessivo ou inadequado de tratamento antimicrobiano na mastite bovina tem impactos significativos na saúde pública. Isso ocorre devido ao potencial surgimento de bactérias resistentes, que podem entrar na cadeia alimentar. A preocupação com o uso de antimicrobianos em animais e suas implicações para a saúde humana tem sido objeto de grande preocupação por parte das autoridades de saúde pública há muitas décadas (NASCIMENTO *et al.*, 2023).

Recentemente, Vianna *et al.* (2023) observaram o interesse crescente na aplicação de terapias alternativas na medicina veterinária, com foco particular no uso de fitoterápicos. Essa abordagem tem sido explorada como um complemento ao tratamento convencional na mastite bovina, com ênfase na utilização de óleos essenciais para fins de inibição do crescimento bacteriano ou aumento da eficácia terapêutica.

Em vista disso, na produção de leite orgânico em rebanhos do Brasil, tem utilizado a homeopatia como tratamento da mastite bovina, estimulando as defesas naturais do hospedeiro (BRACCINI *et al.*, 2019). Porém, a resposta imune à infecção estafilocócica pode variar, e causar desde infecções leves até quadros mais graves. As variações na resposta imune do animal podem ser promovidas por fatores de virulência essenciais à resposta imune (THANERT *et al.*, 2017), e podem ocorrer em hospedeiros tratados com homeopatia.

Nesse sentido, autores brasileiros investigaram a produção de biofilme *in vitro* e seus genes em *Staphylococcus* spp. isolados no leite de vacas com mastite tratadas com homeopatia (Belladone (12 CH), Hepar sulfur (12 CH), Silicea (12 CH), Fósforo (12 CH) e Phytolacca decandra (12 CH)) (FERREIRA *et al.*, 2022). Verificaram que uso da homeopatia não elimina os isolados de *Staphylococcus* spp., que podem persistir por meses nas vacas em lactação. Além disso, esses isolados podem ter potencial patogênico, facilitando a persistência desses patógenos.

Fazolli *et al.* (2023) citaram que a abordagem científica na gestão da mastite é essencial para reduzir os prejuízos econômicos e de qualidade na

produção leiteira. O acompanhamento frequente da saúde e higiene dos úberes das vacas, baseado em diagnósticos prévios, a adoção de medidas higiênicas sanitárias e a implementação de protocolos de controle de infecção, com o suporte de médicos veterinários, são elementos-chave para o sucesso na prevenção e controle da mastite, garantindo assim a sustentabilidade e eficiência da cadeia produtiva leiteira.

Neto e Oliveira (2023) relataram que a mastite é a principal causadora de prejuízos tanto econômicos como de qualidade na cadeia produtiva leiteira, sendo necessário o acompanhamento frequente do produtor na saúde e higiene dos úberes das vacas, a partir de diagnósticos prévios, adoção de medidas higiênicas sanitárias e protocolos de controle da infecção com o auxílio do médico veterinário

Mastite e a fitoterapia

O crescimento do número de artigos científicos sobre o emprego de espécies do gênero botânico *Melaleuca* frente a bactérias causadoras de mastite a partir de 2010 pode estar relacionado com o que Brandão et al. (2006) já havia detectado, ao relatar o surgimento de um consumidor cada vez mais exigente, buscando produtos saudáveis, livres de resíduos, possibilitados pela produção dentro de padrões agroecológicos. Esse tipo de produto, segundo Peixoto et al. (2009), tem que ser certificado, com base em um rol de exigências como a não utilização de fertilizantes químicos e agrotóxicos na produção de alimentos para o rebanho e a diminuição da utilização de antibióticos, justificando-se a busca por produtos naturais com devida comprovação científica.

O Brasil ocupa a quarta posição na produção mundial na produção de leite (IBGE, 2016) e domina o cenário de pesquisas relacionadas ao uso de *Melaleuca* spp. na prevenção ou controle da mastite bovina. Esta tendência provavelmente está ligada a uma crescente preocupação, não somente no aumento da produtividade, mas em relação a qualidade da produção do leite no Brasil, pois a detecção, mesmo em pequenas quantidades de resíduos de antibióticos levam ao descarte, evitando-se prejuízos à saúde pública (FERREIRA et al., 2014), o que leva a busca por novas abordagens para o controle e prevenção da mastite em vacas leiteiras (BASKARAN et al., 2009).

Mendonça et al. (2021) também utilizaram a fitoterapia como tratamento da mastite bovina e Silveira et al. (2023) observaram que a utilização de extratos

de plantas, apresentou atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante, contribuindo para a diminuição da incidência de mastite e melhoria da saúde do animal.

Hemaiswarya *et al.* (2008), Langeveld *et al.* (2014) e Magi *et al.* (2015) realizaram estudos relacionando a potencialidade dos compostos fitoquímicos e a possibilidade de reduzir o uso de antibióticos associando extratos vegetais com efeito sinérgico contra bactérias resistentes a medicamentos. Austregésilo-Filho *et al.* (2022b) relataram que estudos sobre a eficácia de espécies do gênero *Melaleuca* (Myrtaceae) contra bactérias causadoras de mastite são concentrados nos componentes químicos do óleo essencial. Obtiveram resultados promissores em testes antimicrobianos com extrato de *Melaleuca leucadendra* em cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de animais com mastite bovina.

3 OBJETIVOS

Geral

Realizar a avaliação fitoquímica e da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcolólico e hexânico da folha de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) frente a isolados de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.

Específicos

- Coletar e identificar amostras de *Melaleuca leucadendra*.
- Preparar os extratos hidroalcolólico e hexânico da folha da planta de maneira padronizada.
- Realizar análises fitoquímicas para identificar e quantificar os principais compostos presentes nos extratos.
- Executar os testes de sensibilidade antimicrobiana dos extratos de *Melaleuca leucadendra* frente a isolados de *Staphylococcus aureus* causadores da mastite bovina.
- Analisar os dados obtidos sobre a atividade antimicrobiana do extrato de *Melaleuca leucadendra* e sua aplicabilidade potencial no tratamento da mastite bovina.
- Produzir estudo cienciométrico sobre a planta em relação à mastite bovina.

4 REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G. D.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JUNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36(7), 565-573. 2016.

ADDIS, M.F.; TANCA, A., UZZAU S.; OIKONOMOU, G.; BICALHO, R.C.; MORONI, P. The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies. **Mol. Biosyst.** 12, 2359–2372. <https://doi.org/10.1039/C6MB00217J>. 2016a.

ADDIS, M.F.; TEDDE, V.; PUGGIONI, G.M.G.; PISANU, S.; CASULA, A.; LOCATELLI, C.; ROTA, N.; BRONZO, V.; MORONI, P.; UZZAU, S. Evaluation of milk cathelicidin for detection of bovine mastitis. **J. Dairy Sci.** 99, 8250–8258. <https://doi.org/10.3168/JDS.2016-11407>. 2016b.

AL-SAYED E., MICHEL H., KHATTAB M., EL-SHAZLY M., SINGAB A. Protective Role Of Casuarinin From *melaleuca leucadendra* Against Ethanol-induced Gastric Ulcer In Rats. **Planta Med**, 01(86), 32-44. <https://doi.org/10.1055/a-1031-7328>. 2029. 2019.

ARCANJO, M.; HERBERT, A. OLIVEIRA, P. C. S.; MOREIRA, L. C. JAYME, C. G.; SOARES, N. A.; OLIVEIRA, A. R.; PEREIRA, A. K.; NOGUEIRA, M. A. R. Programa dos seis pontos de controle da mastite em rebanhos leiteiros. **Gl. Sci Technol**, Rio Verde, v.10, n. 01, p.78 – 88, jan/abr. 2017.

ASGHAR, A. H. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from tertiary care hospitals. **Pak J Med Sci**, v. 30, n. 4, 2014. [doi: http://dx.doi.org/10.12669/pjms.304.4946](http://dx.doi.org/10.12669/pjms.304.4946)

AUSTREGESILO-FILHO, P. T.; MOURA, G. J. B.; FARIAS, E. T. N.; OLIVEIRA, G. G.; PEREIRA-JUNIOR, J. A. S.; MOTA, R. Atividade antimicrobiana de *Melaleuca* spp. (Myrtaceae) frente a isolados bacterianos causadoras da mastite bovina: uma análise cienciométrica. **Conjecturas**, Vol. 22, Nº 18. P..1012-1024. <https://doi.org/10.53660/CONJ-2240-2W83>. 2022

AUSTREGÉSILO-FILHO, P. T.; TSCHA, M. C.; FARIAS, E. T. N.; OLIVEIRA, G. G.; PEREIRA JR, J. A. S.; MOTA, R. A. Phytochemical investigation of hexanic extract of the *Melaleuca leucadendra* (l) l. Myrtaceae. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.8, n.8, p.59651-59658. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n8-310> . 2022b.

AUSTREGÉSILO-FILHO, P. T.; TSCHA, M. C.; FARIAS, E. T. N.; OLIVEIRA, G. G.; PEREIRA JR, J. A. S.; MOTA, R. A. Atividade antimicrobiana do extrato

de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) em bactérias causadoras da mastite bovina. **Peer Review**, 5(16), 115–128. <https://doi.org/10.53660/772.prw2222> . 2023

BASKARAN, S. A.; KAZMER, G. W.; HINCKLEY, L.; ANDREW, S. M.; VENKITANARAYANAM, K. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. **Journal of dairy science**, 92 (4), 1423-1429. 2009.

BEAN, A.R. Taxonomic notes on the *Melaleuca leucadendra* (L.) L. group (Myrtaceae) in Queensland. **Austrobaileya** 10(4): 645–655. 2020.

BRACCINI, G. L.; CASSETA, J.; SILVA, S. C. C.; CARNIATTO, C. H. O.; SANTOS, V. D. R.; COSTA, V. F. Aplicação da homeopatia na produção animal. **Revista Valore**, Volta Redonda, 4 (Edição Especial): 310-32. 2019.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16, 408-420. 2006.

BROPHY, J.J.; DAVIES, N.W.; SOUTHWELL, I.A.; STIFF, I.A.; WILLIAMS, L.R. Gas Chromatographic Quality Control for Oil of *Melaleuca* Terpinen-4-ol Type (Australian Tea Tree). **J. Agric. Food Chem.** 37, 1330–1335. <https://doi.org/10.1021/JF00089A027> . 1989.

CALIMAN, M. F.; GASPAROTTO, P. H. G.; RIBEIRO, L. F. Principais impactos da mastite bovina: Revisão de literatura. **Getec**, V.12, n.37, p.91-102. 2023.

CARMO, P.H.F.; COSTA, M.C.; FRANCO, P.H.C.; LAGE, A.C.P.; ROCHA, C.E.V.; CHAVES, C.R.; FARACO, A.A.G.; LADEIRA, L.O.; AGUILAR, J.L.L.; CÉSAR, I.C.; PAIXÃO, T.A.; RESENDE-STOIANOFF, M.A.; SANTOS, D.A. Essential oils of *Taxandria fragrans* and *Melaleuca alternifolia* have effective antidermatophytic activities in vitro and in vivo that are antagonised by ketoconazole and potentiated in gold nanospheres. **Nat. Prod. Res.** 35, 4694–4697. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1709186> . 2021.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clin. Microbiol. Rev.** 19, 50. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006> . 2006.

CASARIN, M.; PAZINATTO, J.; OLIVEIRA, L.M.; DE SOUZA, M.E.; SANTOS, R.C.V.; ZANATTA, F.B. Anti-biofilm and anti-inflammatory effect of a herbal nanoparticle mouthwash: a randomized crossover trial. **Braz. Oral Res.** 33. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2019.VOL33.0062> . 2019.

CLARK, A.M.; MAGAWA, C.; PLIEGO-ZAMORA, A.; LOW, P.; REYNOLDS, M.; RALPH, S.J. Tea tree oil extract causes mitochondrial superoxide production and apoptosis as an anticancer agent, promoting tumor infiltrating neutrophils cytotoxic for breast cancer to induce tumor regression. *Biomed. Pharmacother. Biopha* 140, 111790. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111790> . 2021.

CRAVEN, L.A.; LEPSCHI, B.J. Enumeration of the species and infraspecific taxa of *Melaleuca* (Myrtaceae) occurring in Australia and Tasmania. *Aust. Syst. Bot.* 12, 819–927. <https://doi.org/10.1071/SB98019> . 1999.

DE OLIVEIRA, R.P.; BEZERRA, B.A.; DE MELO, R.P.B.; DA SILVA, D.M.S.; DE CARVALHO, R.G.; JULIANO, M.A.; FARIAS, M.P.O.; DE LIRA, N.S.C.; MOTA, R.A. Bovine mastitis in northeastern Brazil: Occurrence of emergent bacteria and their phenotypic and genotypic profile of antimicrobial resistance. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 85. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2022.101802> . 2022.

DIALLO, A.; TINE, Y.; SENE, M.; DIAGNE, M.; DIOP, A.; NGOM, S.; ... & PAOLINI, J. The Essential Oil of *Melaleuca leucadendra* L. (Myrtaceae) From Fatick (Senegal) As a Source Of Methyleugenol. Composition, Antibacterial And Anti-inflammatory Activities. *Journal of Essential Oil Research*, 4(34), 322-328. <https://doi.org/10.1080/10412905.2022.2067254> . 2022.

ESSA, B.; AL-SHARIF, M.; ABDO, M.; FERICEAN, L.; ATEYA, A. New Insights on Nucleotide Sequence Variants and mRNA Levels of Candidate Genes Assessing Resistance/Susceptibility to Mastitis in Holstein and Montbéliarde Dairy Cows. *Journals Veterinary Sciences*. V. 10. Issue 1. 10.3390/vetsci10010035. 2023.

FAZOLI, K. G. Z.; REY, L. M. R.; RÚBIO, K. A. J.; GARCIA SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, H. M. S.; ... & GONÇALVES, D. D. Perfil de Resistência de Isolados de Mastite Bovina, Presença do Gene mec A e Identificação de Cepas Produtoras de ESBL em Pequenas Propriedades Rurais de Laticínios. *Animais* 2023, 13, 1147. <https://doi.org/10.3390/ani13071147> . 2023.

FERREIRA, A. R. P.; MACEDO, L. D. S. O.; DA ROCHA, T. S.; Ramos, L. S. N. Resíduos de antibióticos em leite in natura utilizado para processamento em laticínio localizado no município de Teresina – Piauí. *Acta Tecnológica*, 9 (1), 9-12. 2014.

FERREIRA, E.M.; ROMERO, L.C.; CUNHA, M. L.R. S.; JUNIOR, W.M.; CAMARGO, C.H.; JÚNIOR, W.B.; ZAFALON, L.F. Persistence of *Staphylococcus* spp. in milk from cows undergoing homeopathy to control subclinical mastitis. *BMC Vet. Res.* 18, 273. <https://doi.org/10.1186/S12917-022-03364-8> . 2022.

FRANKLIN, D.; BROCKLEHURST, P.; LYNCH, D.; BOWMAN, D. Niche Differentiation and Regeneration In The Seasonally Flooded melaleuca Forests Of Northern Australia. **J. Trop. Ecol.**, 4(23), 457-467. <https://doi.org/10.1017/s0266467407004130>. 2007.

FRYE, C.C.; BEI, D.; PARMAN, J.E.; JONES, J.; HOULIHAN, A.J.; RUMORE, A. Efficacy of Tea Tree Oil in the Treatment of Equine Streptothricosis. **J. equine Vet. Sci.** 79, 79–85. <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2019.05.011>. 2019.

GREAY, S.J.; IRELAND, D.J.; KISSICK, H.T.; HEENAN, P.J.; CARSON, C.F.; RILEY, T. V.; BEILHARZARZ, M.W. Inhibition of established subcutaneous murine tumour growth with topical *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66, 1095–1102. <https://doi.org/10.1007/S00280-010-1267-3>. 2010.

HAMMER, K.A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x. 1999.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A.K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine** 15, 639–652. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2008.06.008>. 2008.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Abate de animais, produção de leite, couro e ovos**. 2016. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicado/res/agropecuaria/producaoagropecuaria/abateleite-couro-ovos_201504_2.shtm. Acessado em: 30 out de 2021.

IRELAND, D.J.; GREAY, S.J.; HOOPER, C.M.; KISSICK, H.T.; FILION, P.; RILEY, T. V.; BEILHARZ, M.W. Topically applied *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil causes direct anti-cancer cytotoxicity in subcutaneous tumour bearing mice. **J. Dermatol. Sci.** 67, 120–129. <https://doi.org/10.1016/J.JDERMSCI.2012.05.005>. 2012.

JOHNS, M.R; JOHNS, J.E.; RUDOLPH, V. Steam distillation of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. **J. Sci. Food Agric.** 58, 49–53. <https://doi.org/10.1002/JSFA.2740580109>. 1992.

KOZICS, K.; BUCKOVÁ, M.; PUSKÁROVÁ, A.; KALASZOVÁ, V.; CABICAROVÁ, T.; PANGALLO, D. The Effect of Ten Essential Oils on Several Cutaneous Drug-Resistant Microorganisms and Their Cyto/Genotoxic and Antioxidant Properties. **Molecules** 24. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24244570>. 2019

LAM, N.S.; LONG, X.; SU, X.; LU, F. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its monoterpene constituents in treating protozoan and helminthic infections. *Biomed. Pharmacother.* 130. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110624>. 2020.

LANGEVELD, W.T.; VELDHUIZEN, E.J.A.; BURT, S.A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit. Rev. Microbiol.* 40, 76–94. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.763219>. 2014

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.* v.33,n.5, p. 620-626. 2013.

LI, T.; LU, H.; WANG, X.; GAO, Q.; DAI, Y.; SHANG, J.; LI, M. Molecular Characteristics of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis between 2014 and 2015. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00127>. 2017.

LOPES, B. C.; MANZI, M. P.; LANGONI, H. Etiologia das mastites: pesquisa de micro-organismos da classe Mollicutes. *Vet. e Zootec.* 25(2): 173-179. jun.; 2018.

MAGI, G.; MARINI, E.; FACINELLI, B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00165>. 2015

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antibióticos em leite – Uma revisão. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 18, n. 2, p. 80-87, 2011.

MENDONÇA, A. T.; CARVALHO, G. A.; INÁCIO, M. C. P; PEREIRA, M. A. Avaliação antimicrobiana da eficácia dos extratos hidroalcoólicos da pitangueira e da goiabeira, in vitro, contra *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. *Rev Augustus.* 27(54):59–77. 2021.

MONTEIRO, D.U.; AZEVEDO, M.I.; WEIBLEN, C.; DE AVILA BOTTON, S.; FUNK, N.L.; DE BONA DA SILVA, C.; ZANETTE, R.A.; SCHWANZ, T.G.; DE LA RUE, M.L. In vitro and ex vivo activity of *Melaleuca alternifolia* against protozoocoles of *Echinococcus ortleppi*. *Parasitology* 144, 214–219. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001621>. 2017

MONZOTE, L.; SCHERBAKOV, A.M.; SCULL, R.; SATVAL, P.; COS, P.; SHCHEKOTIKHIN, A.E.; GILLE, L.; SETZER, W.N. Essential Oil from *Melaleuca leucadendra*: Antimicrobial, Antikinetoplastid, Antiproliferative and Cytotoxic Assessment. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25235514>. 2020.

MORI, N.; USUKI, T. Extraction of essential oils from tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lemon grass (*Cymbopogon citratus*) using betaine-based deep eutectic solvent (DES). **Phytochem. Anal.** 33, 831–837. <https://doi.org/10.1002/PCA.3132>. 2022.

NADER, T. T.; COPPEDE, J. S.; AMARAL, L. A.; FACCHIN, A. L.; PEREIRA, A. M. S.; FERREIRA, L. M. Avaliação *in vitro* da eficácia de extratos de plantas medicinais do cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolado de diferentes fontes de propriedades leiteira. **Arq. Inst. Biol.** 77 (3). 2010.

NAKAYAMA, K.; MURATA, S.; ITO, H.; IWASAKI, K.; VILLAREAL, M.O.; ZHENG, Y.W.; MATSUI, H.; ISODA, H.; OHKOHCHI N. Terpinen-4-ol inhibits colorectal cancer growth via reactive oxygen species. **Oncol. Lett.** 14, 2015–2024. <https://doi.org/10.3892/OL.2017.6370>. 2017.

NASCIMENTO, G. R. S.; CRUZ, C. A.; STELLA, A. E.; MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; VILELA, G. B.; MENDES, A. C. M.; DALL'ACQUA, P. C.; DE PAULA, E. M. N. Resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* sp. causadores de Mastite Bovina – revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, 6(1), 4375–4391. <https://doi.org/10.34119/bjhrv6n1-340> . 2023.

NETO, J. I. F. S.; OLIVEIRA, G. A. L. Mastite Bovina: Natureza Infeciosa E Impactos Na Produção Leiteira. **Diálogos: educação, saúde e direitos humanos na contemporaneidade**. Cap. 38. 525-539p. https://doi.org/10.36926/editorainovar-978-65-5388-133-4_038 . 2023.

OIKONOMOU, G.; MACHADO, V.S.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y.H.; BICALHO, R.C. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. **PLoS One** 7. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0047671> . 2012.

PAZINATTO BOITO, J.; SANTOS, R.C.; VAUCHER, R.A.; RAFFIN R.; MACHADO, G.; TONIN, A.A.; DA SILVA, A.S. Evaluation of tea tree oil for controlling *Rhipicephalus microplus* in dairy cows. **Vet. Parasitol.** 225, 70–72. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2016.05.031>. 2016.

PEIXOTO, E.C.T.M; PELANDRA, A. G.; RADIS, A. C.; HEINZEN, R. C. G.; VALÉRIO, M. A. Incidência de mastite bovina em animais homeopatizados. **Rev. Inst. "Cândido Tostes"**. V.64, n.367/368, p. 67-71, 2009.

RINI, P.; OHTANI, Y.; ICHIURA, H. Antioxidant, anti-hyaluronidase and antifungal activities of *Melaleuca leucadendron* Linn. leaf oils. **Journal of wood science**, v. 58, n. 5, p. 429-436, 2012.

SAAD, G.; LÊDA, P. H. O.; SÁ, I. M.; SEIXLACK, A. C. Fitoterapia contemporânea: tradição e ciência na prática clínica. 2 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2018. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527730433/>. Acesso em: 06 Set 2020.

SCHNEIDER, T. & KÖRBES, J. Efeitos terapêuticos do óleo de *Melaleuca*. **Reviva**. V. 1. N. 2. 2022.

SCHUCH, L. F. D.; WIEST, J. M.; COIMBRA, H. S.; PRESTES, L. S.; DE TONI, L.; LEMOS, J. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 161-169. 2008. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/968>. Acesso em: 26 jul. 2023.

SHAH, G.; CHAWLA, A.; BAGHEL, U. S.; RADHAR, S.; SINGH, P.S. Pharmacognostic standardization of leaves of *Melaleuca leucadendron*. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, n. 4, p. 143-148, 2013.

SHAPIRA, S.; PLEBAN, S.; KAZANOV, D.; TIROSH, P.; ARBER, N. Terpinen-4-ol: A novel and promising therapeutic agent for human gastrointestinal cancers. PLoS One 11. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0156540>. 2016.

SHARIFI-RAD, J.; SALEHI, B.; VARONI, E. M.; SHAROPOV, F.; YOUSAF, Z.; AYATOLLAHI, S. A.; ... & IRITI, M. Plants of the *Melaleuca* genus as antimicrobial agents: From farm to pharmacy. **Phytotherapy Research**, 31(10), 1475-1494. 2017.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol. Rev.** 59, 201–222. <https://doi.org/10.1128/MR.59.2.201-222.1995>. 1995.

SILVA, L. S. B.; PERASOLIA, F. B.; CARVALHO, K. V.; VIEIRA, K. M. V.; LOPES, M. T. P. L.; SOUZA, G. H. B. S.; SANTOS, O. D. H. S.; FREITAS, K. M. *Melaleuca leucadendron* (L.) L. flower extract exhibits antioxidant and photoprotective activities in human keratinocytes exposed to ultravioleta B radiation. *Free Radical Biology and Medicine*. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.022. 2020.

SILVEIRA, A. V. B. A.; BUENO, F. A.; ZAIDEN, L.; VENTURA, G. F.; SOUZA, C. M.; STELLA, A. E. Sensibilidade de bactérias causadoras de mastite bovina a extratos de plantas nativas do cerrado. **Veterinária e Zootecnia**. V. 30. 2023.

SIMÕES, C. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: **Artmed**, 2017. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713655/>. Acesso em: 06 Set 2020.

SINGH, N.; PUZHANKARA, L.; KEDLAVA, M.N.; RAMANARAYANAN, V. Effectiveness of tea tree oil versus chlorhexidine in the treatment of periodontal diseases: a systematic review. **Evidence-Based Dent.** 2022 1–6. <https://doi.org/10.1038/S41432-022-0259-6>, 2022.

SOUTHWELL, I.A.; LOWE, R.F. *Tea Tree: The Genus Melaleuca*. Series Medicinal and Aromatic Plants, Industrial Profiles, vol. 9. Amsterdam: **Harwood Academic Publishers**. 274 p. 1999.

SYARIFAH, I.; SURYANI, Y.; ADZANI, G.; KURNIAWAN, I.; TAUPIQURROHMAN, O. Pharmacophore Analysis Of Monoterpene *Melaleuca leucadendra* As An Inhibitor For 3clpro Of the Sars-cov-2. **Jurnal Biodjati**, 2(7), 259-267. <https://doi.org/10.15575/biodjati.v7i2.20496>. 2022.

TANAVAT, E.; KASEM, H.; TEPA, P.; PUSSADEE, S.; PAVINA, B.; PATTAMA, T.; KHONGSAK, P.; JOHN, D. Evaluation of four *Melaleuca* species for wood and non-wood production in Thailand. **Agr. Nat. Resour.** 56 (5). Bangkok, Tailândia: 1029–1040. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/anres/article/view/256785>. 2022.

THANERT, R.; GOLDMANN, O.; BEINEKE, A.; MEDINA, E. Host-inherent variability influences the transcriptional response of *Staphylococcus aureus* during in vivo infection. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS14268>. 2017.

TRAN, D.B.; DARGUSCH, P.; MOSS, P.; HOANG, T. V. An assessment of potential responses of *Melaleuca* genus to global climate change. **Mitig Adapt Strateg Glob Change** 18, 851–867 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11027-012-9394-2>. 2013.

TOYANG, N. J.; WANYAMA, J.; NUWANYAKPA, M.; DJANGO, S. Ethnoveterinary medicine: a practical approach to the treatment of cattle diseases in sub-Saharan Africa. 2 ed. Roosendaal, Netherlands: **Agromisa Foundation and CTA**. 88 p. 2007.

TULLIO, V.; ROANA, J.; SCALAS, D.; MANDRAS, N. Enhanced Killing of *Candida krusei* by Polymorphonuclear Leucocytes in the Presence of Subinhibitory Concentrations of *Melaleuca alternifolia* and “Mentha of Pancalieri” Essential Oils. **Molecules**. 24. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24213824>. 2019.

VIANNA, G.; DIEHL, V. B.; BURIN, M. R. Avaliação do potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Eugenia uniflora* sobre microorganismos causadores da mastite bovina. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 6, n. 1, p. 35-46, 17 abr. 2023.

WALLER, K.; BERNES, G.; THAMSBORG, S. M.; SUKURA, A.; RICHTER, S. H.; INGEBRIGTSEN, P. J.; HÖGLUND, J. Plants as de-worming agents of livestock in the nordic countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future, **Acta Veterinaria Scandinavica**, Uppsala, Sweden, v. 42, n. 1, p. 31 - 44, 2001.

WU, C. S.; CHEN, Y. J.; CHEN, J. J.; SHIEH, J. J.; HUANG, C. H.; LIN, P. S.; ... LIN, C. C. J. Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer in vitro and in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

YASIN, M.; YOUNIS, A.; RAMZAN, F.; JAVED, T.; SHABBIR, R.; NOUSHAHI, H.A.; SKALICKY, M.; ONDRISIK, P.; BRESTIC, M.; HASSAN, S.; SABAGH, A.E.L. Extraction of essential oil from river tea tree (*Melaleuca Bracteata* F. muell.): Antioxidant and antimicrobial properties. **Sustain.** 13. <https://doi.org/10.3390/SU13094827>. 2021.

ZHENG, X.; HAN, B.; KUMAR, V.; FEYAERTS, A.F.; VAN DIJCK, P.; BOSSIER P. Essential Oils Improve the Survival of Gnotobiotic Brine Shrimp (*Artemia franciscana*) Challenged With *Vibrio campbellii*. **Front. Immunol.** 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.693932>. 2021.

5 CAPÍTULO 1

DESREPLICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO EXTRATO DE *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae).

RESUMO

Os óleos essenciais do gênero *Melaleuca* (Myrtaceae) são amplamente estudados, devido à atribuição de atividades biológicas de interesse como as propriedades antimicrobianas, ação anti-inflamatória, antioxidantes entre outras. Entretanto, poucos estudos evidenciam a composição química dos extratos vegetais para espécies desse gênero. Objetivou-se analisar os constituintes fitoquímicos do extrato hidroalcolólico de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae), assim como aplicar ferramentas metabolômicas inovadoras com o intuito de investigar a sua diversidade de metabólitos secundários e avaliar o potencial bioativo dos extratos. Os extratos das folhas foram obtidos por maceração até o esgotamento e o material extrativo rotaevaporado foi utilizado para a obtenção dos extratos hidroalcolólicos brutos. Os extratos produzidos foram analisados por HPLC-DAD-ESI (+), empregando-se método abrangente e generalista. A partir desses dados foi realizado um estudo de otimização do processamento de dados e da construção da rede molecular a partir do Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS, Rede Mundial de Material Molecular de Produtos Naturais), resultando em redes robustas e anotações de alta qualidade. As análises dos cromatogramas obtidos demonstraram alta complexidade de compostos presentes nos extratos com cerca de 88 substâncias. Entretanto, por meio da comparação dos dados obtidos em bibliotecas espectrais de acesso livre disponíveis na plataforma GNPS, constatou-se 37 diferentes metabólitos secundários com potencial bioativo, os quais estão distribuídos em 11 superclasses, divididos em 20 classes, destacando-se 13 flavonoides, além de 9 triterpenos. A espécie *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) pode ser considerada fonte para uma ampla gama de atividades biológicas, devido à complexidade de compostos encontrados neste estudo, apresentou 20 compostos com atividade medicinal já descrita na literatura. Esses resultados aprofundam o entendimento sobre o potencial terapêutico dessa planta e abrem caminho para futuras aplicações na medicina e na pesquisa de novos compostos bioativos.

Palavras-chave: Extratos Hidroalcolólicos; *Melaleuca leucadendra*; Rede molecular

ABSTRACT

Essential oils from the *Melaleuca* genus (Myrtaceae) are widely studied, due to the attribution of biological activities of interest such as antimicrobial properties, anti-inflammatory action, antioxidants, among others. However, few studies demonstrate the chemical composition of plant extracts for species of this genus. The objective was to analyze the phytochemical constituents of the hydroalcoholic extract of *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae), as well as to apply innovative metabolomic tools in order to investigate its diversity of secondary metabolites and evaluate the bioactive potential of the extracts. The leaf extracts were obtained by maceration until exhaustion and the rotavaporated extractive material was used to obtain the crude hydroalcoholic extracts. The extracts produced were analyzed by HPLC-DAD-ESI (+), using a comprehensive and generalist method. Based on these data, a study was carried out to optimize data processing and construction of the molecular network using the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), resulting in robust networks and annotations of high quality. Analysis of the chromatograms obtained demonstrated a high complexity of compounds present in the extracts with around 88 substances. However, by comparing data obtained with freely accessible spectral libraries available on the GNPS platform, 37 different secondary metabolites with bioactive potential were found, which are distributed in 11 superclasses, divided into 20 classes, highlighting 13 flavonoids, in addition to 9 triterpenes. The species *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) can be considered a source for a wide range of biological activities, due to the complexity of compounds found in this study, with 20 compounds with medicinal activity already described in the literature. These results deepen the understanding of the therapeutic potential of this plant and pave the way for future applications in medicine and research into new bioactive compounds.

Keywords: Hydroalcoholic Extracts; *Melaleuca leucadendra*; Molecular network

INTRODUÇÃO

A busca por métodos eficientes e rápidos na descoberta de novos produtos naturais bioativos impulsionou o avanço das tecnologias analíticas de separação e análise espectral. O desenvolvimento de ferramentas computacionais também acelerou a identificação de compostos, permitindo comparações individuais entre os espectros adquiridos e os repositórios espectrais de compostos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; NETO *et al.*, 2016; NIELSEN *et al.*, 2011).

A investigação da química de produtos naturais, visando compreender eventos multifatoriais, tem se voltado para a utilização da análise estatística, bioinformática e quimiometria, além de abordagens alternativas para organizar, armazenar, mapear e analisar conjuntos complexos de dados com rapidez e confiabilidade (PILON *et al.*, 2021; WANT; METZ, 2017).

Apesar da análise individual de espectros ter contribuído para a identificação e desreplicação de diversas substâncias, esse procedimento continua demandando períodos extensos de verificação dos dados. Quando consideramos abordagens mais contemporâneas como a metabolômica, a situação se torna ainda mais complexa e impraticável (TITZ *et al.*, 2017; WANT; METZ, 2017).

Desta forma, por meio do estudo integrado dos componentes e comportamentos dinâmicos dos sistemas biológicos, combinando modelagem matemática e biologia experimental, é possível obter informações que seriam impossíveis de determinar com o estudo individualizado de cada componente (FUNARI *et al.*, 2013; NICHOLSON; LINDON, 2008; LEVESQUE; BENFEY, 2004; VON BERTALANFFY, 1975).

Nos últimos anos, o número de publicações envolvendo o conceito de metabolômica em química de produtos naturais tem crescido exponencialmente, evidenciando a importância da análise qualitativa e quantitativa dos eventos moleculares primários e secundários de um organismo para a elaboração do perfil metabólico (PILON *et al.*, 2021; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; LEROY; LEVIN; SALEK; STEINBECK, 2016; NETO *et al.*, 2016; VAN KERREBROECK; DE VUYST, 2014; NICHOLSON; LINDON, 2008).

A metabolômica pode ser empregada na compreensão do metabolismo secundário, identificação de relações taxonômicas e quimiosistemáticas, proporcionando uma visão integrada da composição bioquímica (LEVIN; SALEK,

2016; LEROY; VAN KERREBROECK; DE VUYST, 2014). Essa abordagem permite avaliar os efeitos biológicos de substâncias puras e matrizes complexas através da resposta metabólica (PILON *et al.*, 2021). Desta forma, é possível identificar os compostos responsáveis pela atividade biológica na matriz complexa e explorar possíveis interações sinérgicas e/ou antagônicas (DOS SANTOS *et al.*, 2017).

A desreplicação consiste na identificação de compostos conhecidos sem a necessidade de isolamento, geralmente por meio da análise por diferentes métodos espectroscópicos e da comparação com bases de dados. Assim, é usada para racionalizar o processo de isolamento de substâncias que apresentam dados espectroscópicos semelhantes aos compostos bioativos presentes na base de dados (GU *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013)

Na desreplicação, a matriz complexa é analisada por uma ou mais técnicas de detecção (geralmente associadas às técnicas de separação e aos bioensaios “in vitro” ou “in vivo” para obter dados físico-químicos, como absorção em determinado comprimento de onda, relação massa/carga, tempo de retenção etc. Os metabólitos de interesse (bioativos, por exemplo) são então comparados às bases de dados para detectar compostos já conhecidos, sem a necessidade de isolamento (PILON *et al.*, 2021; LANG *et al.*, 2008).

Objetivou-se neste estudo, analisar os constituintes fitoquímicos do extrato hidroalcoólico de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) com o intuito de investigar a sua diversidade de metabólitos secundários e avaliar o potencial bioativo dos extratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) em floração no campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE, Recife – Brasil (80° 7' 33" S, 350° 21' 14" W), as quais foram prensadas e encaminhadas ao Herbário Vasconcelos Sobrinho/UFRPE, para herborização. As identificações foram realizadas por especialistas, e as exsiccatas foram registradas no Herbário da UFRPE sob nº 56001 e nº 56002.

O processo de remoção do extrato bruto hidroalcoólico da folha de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) foi realizado por maceração das folhas e a remoção por solvente a frio. O extrato foi obtido a partir de folhas desidratadas em estufa de ar circulante (35-40°C). Após a desidratação, o material foi

pulverizado e colocado em um extrator, onde foi adicionado um volume de solvente hidroalcoólico a 70%, suficiente para homogeneização da mistura e completa imersão no solvente. A mistura colocada no extrator por 72 horas, sendo posteriormente filtrada e submetida a um evaporador rotatório sob pressão reduzida, aquecida entre 30-45 °C, sob agitação a 120 rotações por minuto (RPM), segundo Austregésilo-Filho *et al.* (2023)

Os extratos produzidos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência equipado com detector de arranjo de diodos, acoplado ao espectômetro de massa por ionização por electrospray no modo positivo (HPLC-DAD-ESI(+)-MS) (micrOTOF-QII) (BrukerDaltonics), utilizando um método abrangente e generalista (WU *et al.* 2020; MORAES; LAGO, 2003). Para tanto, utilizou-se acetonitrila (ACN) – ácido fórmico (HCO₂H) (0,1%) (v/v) (B) e água - HCO₂H (0,1%) (v/v) (A) como fase móvel, a uma vazão de 0,8 mL/min, volume de injeção 15 µL e o seguinte gradiente de eluição: 0 – 2 min (3% B); 2 – 20 min (3 – 100 % B); 20 – 23 min (100 % B); 23 – 26 min (100–3 % B), permanecendo em 3 % de fase móvel B durante 2 minutos após as análises em aquisição dos dados de massas (*Prerun*).

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no modo de ionização positivo, utilizando a taxa de espectros (*spectrate*) de 2,0 Hz e faixa de massa de 50 a 1300 *m/z*. Os parâmetros da fonte de ionização foram: voltagem do *End Plate Off set* de 450 V; voltagem do capilar 3,5 kV (modo positivo); nebulizador a 4,5 bar; vazão do gás de secagem de 9,0 L/min; temperatura do gás de secagem 200° C.

Para obter massas de alta resolução, o instrumento e os experimentos foram calibrados a partir de uma solução de padrão internode Na-TFA (400 mg/100 mL), ao final de cada análise. Os dados foram analisados usando o software DataAnalysis 4.3 (Bruker, Daltonik). As amostras foram preparadas a partir dos extratos secos, utilizando-se 1,0 mg de extrato em 1,0 mL do respectivo solvente de cada extração que foram filtradas com filtro de seringa com membrana filtrante de PTFE (0,22 µm), acondicionada em *vials* de vidro de 2,0 mL e, em seguida, analisadas. Após a otimização, os extratos foram obtidos e foram acondicionados em frascos pesados e vedados e colocados em freezer a -26° C.

Os dados adquiridos nas análises por HPLC-DAD-ESI-MS no modo de ionização positivo foram convertidos, separadamente, em arquivos Mzxml utilizando o software livre ProteoWizard - MSconvert (v.3, Proteowizard Software

Foundation, Palo Alto, CA, EUA) (Chambers *et al.*, 2012). Posteriormente, foram processados utilizando-se o software *MzMine*TM (v. 2.51, BMC Bioinformatics, Reino Unido). Os parâmetros utilizados no processamento foram otimizados para obter cromatogramas alinhados, deconvoluídos, com mínima influência de ruído e isótopos, e que representem ao máximo os extratos analisados.

Após o processamento foram exportados os arquivos de dados, contendo informações dos espectros de massas, assim como, um arquivo de dados contendo a matriz de dados de áreas dos picos, razões massa-carga (m/z) e tempos de retenção. Os arquivos gerados foram enviados para a Plataforma online da Rede Mundial de Material Molecular de Produtos Naturais (GNPS) (<https://gnps.ucsd.edu>, (WANG *et al.*, 2016) através do software WinSCP (<https://winscp.net/eng/index.php>) e utilizados para a construção das redes moleculares.

Os espectros de massas foram convertidos em vetores unitários e comparados por similaridade de cosseno. O algoritmo MS-Cluster foi aplicado para combinar espectros da mesma molécula com massas parentais semelhantes (0,5 Da) e pontuação de cosseno superior a 0,95 em espectros de consenso. Redes Espectrais compararam todos os pares de vetores possíveis dos espectros massas, considerando a tolerância de massa para picos de fragmentos (0,5 Da), tolerância de massa parental (1 Da), o número mínimo de picos correspondentes por alinhamento espectral e uma pontuação mínima de cosseno de 0,5. Quanto maior a pontuação do cosseno entre dois espectros, mais semelhantes serão os espectros massas e, mais semelhantes as moléculas (PILON *et al.*, 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cromatogramas de HPLC-DAD-ESI(+)-MS dos extratos hidroalcolóicos da folha de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) revelaram uma complexidade de 88 compostos distintos. Entretanto, após a submissão dos espectros de massas à GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>), seguido de visualização no Cytoscape 2.8.3 (NETO *et al.*, 2016; PILON *et al.*, 2021), o que possibilitou a identificação de 38 compostos com potencial bioativo, os quais foram classificados em relação às superclasses de produtos naturais como terpenos, flavonoides glicosilados, flavonoides aglicona e triterpenos.

Na tabela 1 estão apresentadas algumas das classes de produtos naturais, destacando as superclasses apocarotenoides, cromanos, octadecanóides, triterpenóides e ácidos fenólicos que apresentam potencial antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano.

Tabela 1. Parte dos metabólitos encontrados por HPLC-DAD-ESI(+) em *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae), destacando as superclasses apocarotenoides, cromanos, octadecanóides, ácidos fenólicos e triterpenóides.

Número	PN_Super Classe	PN_Classe	COMPOSTOS	Rt (min)	Íon Precursor (m/z)	MF	Cluster Index
1	Apocarotenoids	Megastigmanes	2-Cyclohexen-1-one, 4-[3-(beta-D-glucopyranosyloxy)-1-buten-1-yl]-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl	1,58	387,179	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	1445
2	Chromanes	Chromones	5,7-dihydroxy-2-methyl-8-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]chromen-4-one	1,05	355,082	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1264
3	Octadecanoids	Jasmonic acids	Sulfojasmonate	1,15	305,073	C ₁₂ H ₁₈ O ₇ S	919
4		Other Octadecanoids	trihydroxyoctadeca-10,15-dienoicacid	3,60	327,221	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	1082
5	Phenolic acids	Gallotannins	3,4,5-trihydroxy-6-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxyoxan-2-yl]methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate	0,98	483,087	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	1915
6		Phenolicacids	3-(Benzoyloxy)-2-hydroxypropyl beta-D-glucopyranosiduronicacid	1,96	373,092	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	1366
7			Vanillicacid - O-sulfonateHex	2,44	409,088	C ₁₄ H ₁₈ O ₁₂ S	1565
8	Sesquiterpenoids	Eremophilane Sesquiterpenoids	Naphtho[2,3-b]furan-9(4H)-one, 4,8-bis(acetyloxy)-4a,5,6,7,8,8a-hexahydro-3,4a,5-trimethyl	2,55	331,135	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	1120
9		Farnesane Sesquiterpenoids	trans-Nerolidol	7,62	205,182	C ₁₅ H ₂₆ O	82
10	Triterpenoids	Oleanane Triterpenoids	Glicirrizina	3,40	711,407	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₁	2334
11			(2alpha,3beta,5xi,9xi,18xi)-2,3,23-Trihydroxy-28-oxoolean-12-en-28-yl]-beta-D-glucopyranose	3,72	695,411	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	2314
12	Triterpenoids		Platanic Acid	4,83	459,318	C ₂₉ H ₄₆ O ₄	1811
13		Ursane Triterpenoids	Ácido Ursólico	5,77	437,314	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	1724
14			3-O-E-p-coumaroyl alphitolicacid	6,13	617,389	C ₃₉ H ₅₄ O ₆	2230
15			Sumaresinolic Acid	6,17	473,333	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	1879

16	Triterpenoids		Glochidone	6,39	423,333	C ₃₀ H ₄₆ O	1661
17			Uvaol	6,83	443,36	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	1751
18		Oleanane triterpenoids	4,5,9,9,13,20,20-heptamethyl-24-oxahexacyclo-tetracosan-10-ol	7,03	425,351	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	1682
19	Lignanes	Lignanadibenzil butirólactônicos	Niranthin		432.5130	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	
20		Neolignans	2-(2,6-dimethoxy-4-prop-2-enylphenoxy)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propan-1-ol	4,70	401,171	C ₂₃ H ₃₀ O ₇	1533
21	Apocarotenoids	Megastigmanes	glucopyranosyloxy)-1-buten-1-yl]-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl	1,58	387,179	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	1445
22			4',6'-Dimethoxy-2'-hydroxychalcone	4,65	285,095	N/A	773
23	Fatty esters	Wax monoesters	9Z,11E,13E-Octadecatrienoic acidethylester	7,86	307,242	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	946
24		Fatty alcohols	Docosanol	9,86	325,314	C ₂₂ H ₄₆ O	1072

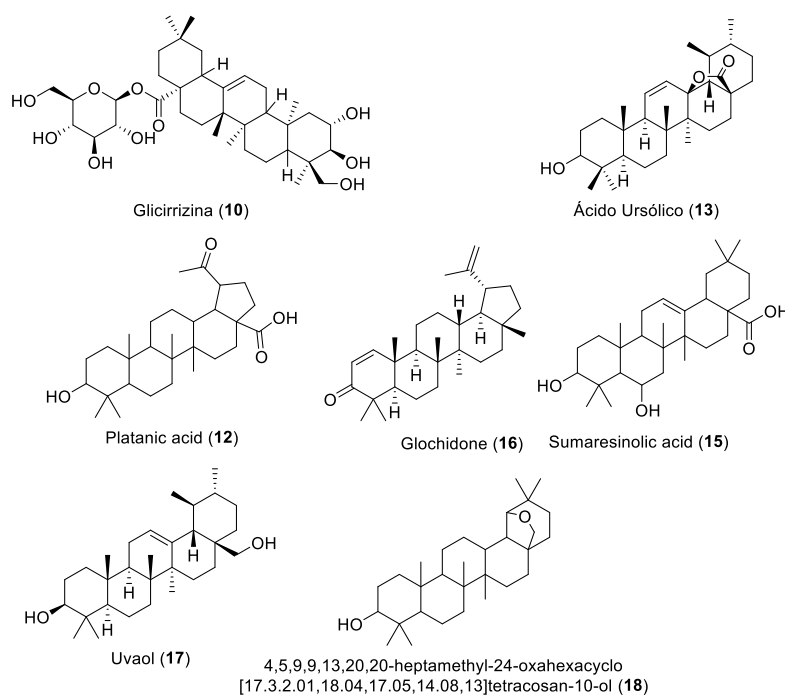
* RT – Tempo de retenção (minutos); MF – Fórmula Molecular. Fonte: Os autores (2024).

Na análise de HPLC-DAD-ESI(+)-MS do extrato hidroalcoólico verificou-se a presença de nove compostos pertencentes a classe de triterpenos, os quais apresentam diversas propriedades biológicas descritas na literatura, entretanto, poucos são as publicações que descreveram a presença de tais compostos em extratos de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae).

Desta forma, no extrato foram identificados os compostos 3-O-trans-p-coumaroyl-alphitolic acid (Tabela 1; entrada **14**) (3OTPCA), um triterpeno conhecido por ser citotóxico para células cancerígenas (MITSUHASHI *et al.*, 2017), assim como o ácido sumaresinólico (Tabela 1; entrada **15**). Estudos sugerem diversas atividades biológicas e medicinais desses compostos como atividade antioxidante e anti-inflamatórias; alguns destes indicam que o ácido sumaresinólico também pode ter propriedades anticancerígenas, inibindo o crescimento de células cancerígenas em determinadas condições. Existem evidências de que o ácido sumaresinólico pode exibir atividade antimicrobiana (SEN, 2020; AYELESO; MATUMBA; MUKWEVHO, 2017; TSAO; YIN, 2015 TSAI; YIN, 2008). A nirantina (Tabela 1; entrada **18**) consiste em outro composto que apresenta propriedades antitumorais e antioxidantes (CHOPAIDE *et al.*, 2021; JANTAN *et al.*, 2019; KASSUYA *et al.*, 2006).

A Figura 1 demonstra a forma molecular de alguns terpenos e sesquiterpenos presentes no extrato da folha de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) durante a análise de HPLC-DAD-ESI(+)-MS.

Figura1 – Estrutura molecular dos terpenos e sesquiterpenos presentes no extrato de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) na análise de HPLC-DAD-ESI(+)-MS.



Fonte: Os autores (2024)

Também foram identificados nos extratos de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae), o composto uvaol (Tabela 1; entrada 17) (Figura 1). Estudos sugerem que este pode apresentar diversas atividades medicinais como anti-inflamatória, antioxidante, efeitos cardiovasculares, incluindo a redução da pressão arterial (ZHU *et al.*, 2021; CARMO *et al.*, 2020; LOMBARDO *et al.*, 2018; TALHAOUI *et al.*, 2018). Outras pesquisas indicam que o uvaol pode ter propriedades anticancerígenas, inibindo o crescimento de células cancerígenas (GHORAI, 2020; TALHAOUI *et al.*, 2018). O ácido ursólico (Tabela 1; entrada 13) (Figura 1), tem apresentado propriedades anti-inflamatórias, anti-oxidantes e anti-câncer, inibindo o crescimento de células cancerígenas (LIU *et al.*, 2023; KANG *et al.*, 2022; MLALA *et al.*, 2019). Há evidências que sugerem ainda, efeitos benéficos em condições relacionadas ao diabetes, incluindo a regulação da glicose no sangue, além de poder ter benefícios para a saúde cardiovascular,

incluindo a redução do colesterol e a proteção contra danos ao coração, assim como demonstrou atividade contra alguns microrganismos, sugerindo um potencial papel como agente antimicrobiano (LIU *et al.*, 2023; WANG; HE, 2014).

Estudo recente demonstrou que o extrato de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) apresentou atividade antimicrobiana contra as cepas de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina (AUSTREGESILO-FILHO *et al.*, 2023) e tais resultados podem ser atribuídos à presença da glicirrizina (Tabela 1; entrada **10**), inicialmente identificada na raiz de *Glycyrrhiza glabra*, e que tem sido objeto de estudos devido às suas potenciais propriedades medicinais, destacando-se suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes. Além disso, alguns estudos sugeriram que a glicirrizina pode ter atividade antiviral, incluindo ação contra alguns vírus respiratórios, além de um potencial efeito gastroprotetor (PALAR *et al.* 2022; PEREIRA, *et al.* 2022)

A glicirrizina pode apresentar atividades com efeitos antibactericida (ZEECE, 2020); na pele, participa como um exímio agente anti-inflamatório contra citocinas inflamatórias (RAMOS-TOVAR; MURIEL, 2019), inibe a proliferação de bactérias, impedindo sua proliferação e de agentes estranhos (WAHAB *et al.*, 2021). Forma uma barreira de proteção contra as agressões, melhora a elasticidade da pele e restaura as fibras de colágeno (FRY, 2012). Estimula as células epidérmicas, acelerando o reparo tecidual e reduz o tempo de cicatrização de feridas e atua como antioxidantes, além de proteger a pele dos efeitos dos radicais livres (HUAN *et al.*, 2021).

A presença do platanic acid (Tabela 1; entrada **12**) (Figura 1) corrobora com os resultados no tratamento da mastite, uma vez que estudos têm demonstrado suas propriedades antimicrobiana, com atividade frente a alguns fungos e bactérias, além de atividade anti-inflamatórias e propriedades antioxidantes (GANAIE *et al.*, 2021; LOU *et al.*, 2021a, 2021b; AISHA *et al.*, 2012).

Na tabela 2 estão apresentados os 12 compostos pertencentes a superclasse dos flavonóides, além de 10 flavonóis que apresentam atividade biológica conhecida, sendo eles o myricetin, quercetin e kaempferol, assim como seu respectivos 3-O-glicosídeos (Tabela 2, Figura 2).

Tabela 2. Flavonoides encontrados por HPLC-DAD-ESI(+) no extrato hidroalcoólico de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae).

Número	PN_Super Classe	PN_Classe	COMPOSTOS	Rt (min)	Íon Precursor (m/z)	MF	Cluster Index	
25	Flavonoids	Flavonols	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[3,4,5-trihydroxy-6-[[3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one	2,43	597,111	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	2194	
26			quercetin 3-O-glucuronide	2,59	477,078	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	1894	
27			3-[4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	2,64	579,147	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	2163	
28			myricetin-3-O-rhamnoside	2,69	463,098	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	1821	
29			Quercetin	2,79	303,032	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	909	
30			Kaempferol-3-O-glucuronoside	2,83	461,081	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	1814	
31			Quercetin-3-O-rhamnoside	2,97	447,102	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	1759	
32			Kaempferol 3-O-rhamnoside	3,07	431,106	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	1704	
33			Kaempferol	3,21	285,043	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	771	
35			Flavones	Tricin	3,20	329,034	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	1094
35				Pinocembrine	4,17	257,065	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	429
36				naringenin	4,47	415,186	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	1620
37	Isoflavonoids	Chalcones	Cardamonin	4,65	285,095	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	773	
38			Daidzein-8-C-glucoside	2,87	417,094	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	1629	

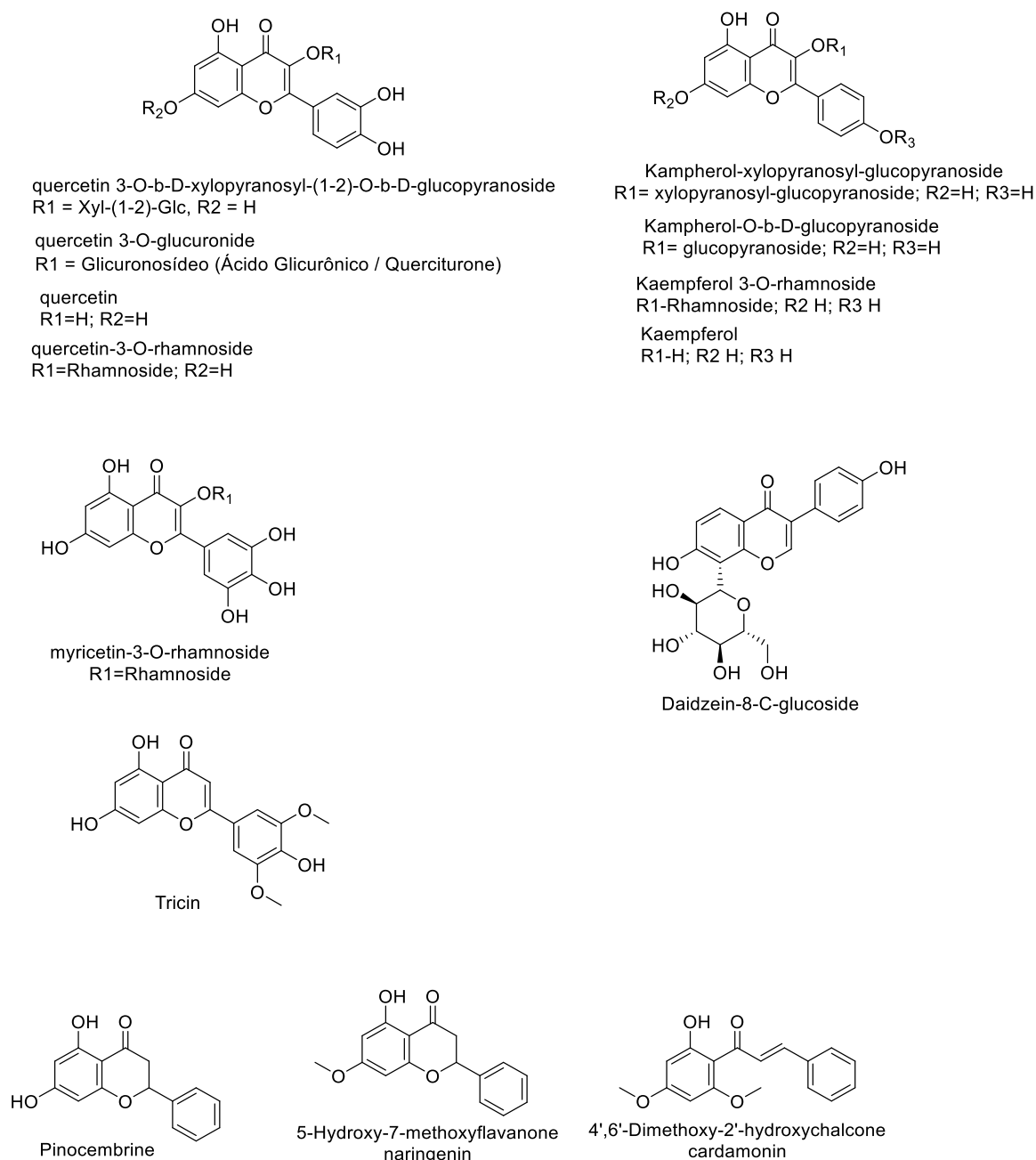
* RT – Tempo de retenção (minutos); MF – Fórmula Molecular.

Fonte: Os autores (2024)

Dentre os metabólitos do extrato de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) estão aqueles associados aos compostos pertencentes a superclasses dos flavonoides. A análise de HPLC-DAD-ESI(+)-MS revelou a presença 12 diferentes flavonoides, e alguns flavonoides glicosídeos, cujas estruturas são apresentadas na figura 2. Diversos flavonoides apresentam atividade antimicrobiana que podem ser atribuídos à presença do pinocembrina (Tabela 2 entrada **35**) (Figura 2), que pertence à classe das favonas encontrado em várias plantas (RUTTANAPATTANAKUL *et al.*, 2022; ZHU *et al.*, 2021; RASUL *et al.*, 2013). A pinocembrina demonstrou atividade antibacteriana e antifúngica em alguns estudos, além de apresentar efeitos benéficos no tratamento de distúrbios pulmonares como a asma, devido às suas propriedades anti-inflamatórias (ZHU

et al., 2021; RASUL *et al.*, 2013). Algumas pesquisas sugerem que a pinocembrina pode ter efeitos positivos na saúde cardiovascular, incluindo a redução da pressão arterial e a melhoria da função vascular (ZHU *et al.*, 2021; RASUL *et al.*, 2013).

Figura 2. Estrutura molecular dos flavonóides e seus respectivos glicosídeos encontrados nos extratos de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) na análise de HPLC-DAD-ESI(+).



Fonte: Os autores (2024)

O flavonóide myricetin-3-O-rhamnoside (Tabela 2, entrada **28**) (figura 2) possui capacidade antioxidante, o que significa que pode ajudar a neutralizar os radicais livres no corpo, contribuindo para a prevenção do estresse oxidativo e

possivelmente reduzindo o risco de doenças crônicas (MOTLHATLEGO *et al.*, 2020; THUAN *et al.*, 2013; SALCEDO, *et al.*, 2010). Pesquisas sugerem que o myricetin-3-O-rhamnoside pode ter propriedades anti-inflamatórias, o que pode ser útil no suporte à resposta do sistema imunológico e na redução de processos inflamatórios (IMRAN *et al.*, 2021; MOTLHATLEGO *et al.*, 2020; THUAN *et al.*, 2013). Alguns estudos indicam que o myricetin-3-O-rhamnoside pode ter propriedades anticancerígenas, demonstrando a capacidade de inibir o crescimento de células cancerígenas (IMRAN *et al.*, 2021; MARTINS *et al.*, 2019).

Outro flavonóide presente foi o quercetin (Tabela 2, entrada **29**) que na literatura demonstrou ter propriedades anti-inflamatórias, inibindo a liberação de substâncias pró-inflamatórias, sugerindo que pode ser útil no suporte à resposta imunológica e na redução da inflamação (AGHABABAEI; HADIDI, 2023; ; WANG *et al.*, 2022; ANAND DAVID; ARULMOLI; PARASURAMAN, 2016). Algumas pesquisas indicaram que o quercetin pode modular a resposta do sistema imunológico, aumentando a atividade de certas células do sistema imunológico e, assim, contribuir para a defesa contra infecções (AGHABABAEI; HADIDI, 2023; ANAND DAVID; ARULMOLI; PARASURAMAN, 2016). Outros estudos sugerem que o quercetin pode ter benefícios cardiovasculares, incluindo a redução da pressão arterial e a melhoria da saúde vascular (KIM; PARK, 2018). Pesquisas preliminares indicam que o quercetin pode ter propriedades anticancerígenas, inibindo o crescimento de células cancerígenas e induzindo a apoptose (AGHABABAEI; HADIDI, 2023; WANG *et al.*, 2022; ; KIM; PARK, 2018; ANAND DAVID; ARULMOLI; PARASURAMAN, 2016). Há evidências que sugerem que o quercetin pode ter efeitos neuroprotetores, auxiliando na proteção das células nervosas e possivelmente desempenhando um papel na prevenção de doenças neurodegenerativas (AGHABABAEI; HADIDI, 2023; WANG *et al.*, 2022; KIM; PARK, 2018). Este composto também demonstrou atividade antiviral, inibindo a replicação viral (AGHABABAEI; HADIDI, 2023; KIM; PARK, 2018). O quercetin pode influenciar positivamente o metabolismo e ajudar na gestão do peso (WANG *et al.*, 2022; KIM; PARK, 2018); o quercetin-3-O-rhamnoside (Tabela 2, entrada **31**), assim como a quercetina, o quercetin-3-O-rhamnoside possui várias atividades medicinais potenciais (ELLOUMI *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022).

O flavonoide kaempferol é conhecido por suas fortes propriedades antioxidantes, ajudando a combater o estresse oxidativo no corpo ao neutralizar

os radicais livres (JAN *et al.*, 2022; ŞÖHRETOĞLU; RENDA, 2020; WANG *et al.*, 2018; DORMÁN *et al.*, 2016). Essa atividade pode contribuir na prevenção de doenças relacionadas à idade e danos celulares. Estudos indicaram que o kaempferol possui propriedades anti-inflamatórias, podendo ajudar a modular a resposta imunológica e reduzir processos inflamatórios (PERIFERAKIS *et al.*, 2022; REN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018; PARAWIRA, 2009). O kaempferol tem sido associado a benefícios cardiovasculares, incluindo a redução da pressão arterial, melhoria da função vascular e redução do risco de doenças cardíacas (PUNIA BANGAR *et al.*, 2022; REN *et al.*, 2019), e propriedades anticancerígenas, inibindo o crescimento de células cancerígenas e induzindo a apoptose (PERIFERAKIS *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2018). Algumas pesquisas sugerem que o kaempferol pode ter atividade antiviral, inibindo a replicação viral (PERIFERAKIS *et al.*, 2022). Também foi demonstrado seu potencial efeito neuroprotetor, protegendo as células nervosas e reduzindo o risco de distúrbios neurodegenerativos (PUNIA BANGAR *et al.*, 2022; SILVA DOS SANTOS *et al.*, 2021). Ainda pode influenciar positivamente o metabolismo e ajudar na obesidade, embora mais estudos sejam necessários para compreender completamente esse efeito. O kaempferol-3-O-glucuronoside pode apresentar algumas atividades biológicas potenciais como antioxidante, anti-inflamatória, cardioprotetor, anticancerígeno, antiviral e neuroproteção (DENG *et al.*, 2021; FANG *et al.*, 2021; KHAJURIA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018).

Dentre os flavonoides presentes, o naringenin possui propriedades antidiabéticas, anticancerígenas, antimicrobianas, gastroprotetoras, imunomoduladoras, cardioprotetoras e neuroprotetoras. Essas propriedades são atribuídas principalmente às suas atividades antioxidantes e antiinflamatórias. As atividades antioxidantes se destacam devido a eliminação de radicais livres e a prevenção da peroxidação lipídica. Pode ainda, influenciar positivamente o metabolismo de lipídios, contribuindo na redução dos níveis de colesterol LDL (Lipoproteína de baixa densidade) e para a promoção de uma saúde metabólica melhor (UÇAR; GÖKTAŞ, 2023; BAI *et al.*, 2020; SALEHI *et al.*, 2019).

Dos metabólitos identificados o cardamonin é um flavonoide encontrado em várias plantas, que desempenha um papel no tratamento do câncer, na modulação do sistema imunológico, na inflamação e na morte de patógenos. Por meio da modulação das vias de sinalização celular, induz a apoptose em células malignas, além de interromper o ciclo celular, alterando a expressão proteínas reguladores durante a divisão das células malignas (BREAK *et al.*, 2018). Devido

ao seu potencial citotóxico relativamente seletivo contra células malignas do hospedeiro, o cardamonin está emergindo como um novo e promissor agente anticâncer em fase experimental (NAWAZ *et al.*, 2020; JAMES *et al.*, 2017; GONÇALVES; VALENTE; RODRIGUES, 2014).

Daidzein-8-C-glucoside é um fitoestrógeno, que tem uma estrutura semelhante ao estrogênio humano. Pode exercer atividade estrogênica fraca no corpo e, portanto, tem sido estudado em relação ao alívio de sintomas da menopausa e suporte à saúde óssea em mulheres pós-menopáusicas (BULTOSA, 2016; PATKAR; LEE; BURGESS, 2013). Como muitos compostos encontrados em plantas, a daidzein-8-C-glucoside possui propriedades antioxidantes (JOHNSON, 2001). Essa atividade antioxidante pode auxiliar a combater o estresse oxidativo no corpo e contribuir para a prevenção de danos celulares (WANG; MA; YANG, 2019). Algumas pesquisas indicam que a daidzein-8-C-glucoside pode ter propriedades anti-inflamatórias, ajudando a modular a resposta inflamatória do organismo (JOHNSON, 2001).

CONCLUSÃO

A análise por HPLC-DAD-ESI(+) e os dados das bibliotecas espectrais permitiram a desreplicação e identificação dos compostos presentes no extrato da planta e investigação química dos compostos bioativos. Foram identificados 20 compostos com distintos potenciais medicinais, evidenciando a existência de sinergias entre os componentes presentes. Esses resultados aprofundam o entendimento e potencial terapêutico desta planta e abrem caminho para futuras aplicações na medicina e na pesquisa de novos compostos.

REFERÊNCIAS

AGHABABAEI, Fatemeh; HADIDI, Milad. Recent Advances in Potential Health Benefits of Quercetin. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 7, p. 1–31, 2023. DOI: 10.3390/ph16071020.

AISHA, Abdalrahim F. A.; ABU-SALAH, Khalid M.; ALROKAYAN, Salman A.; SIDDIQUI, Mohammad J.; ISMAIL, Zhari; ABDUL MAJID, Amin Malik Shah. Syzygium aromaticum extracts as good source of betulinic acid and potential anti-breast cancer. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 335–343, 2012. DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000185.

ANAND DAVID, Alexander Victor; ARULMOLI, Radhakrishnan;

PARASURAMAN, Subramani. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. **Pharmacognosy Reviews**, v. 10, n. 20, p. 84–89, 2016. DOI: 10.4103/0973-7847.194044.

AUSTREGESILO-FILHO, Péricles; TSCHA, Mauriceia; FARIAS, Eulina; OLIVEIRA, Gibson; PEREIRA-JÚNIOR, José Antônio; MOTA, Rinaldo. Atividade antimicrobiana do extrato de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) em bactérias causadoras da mastite bovina. **Peer Review**, v. 5, n. 16, p. 115–128, 2023. DOI: 10.53660/772.prw2222.

AYELESO, Taiwo Betty; MATUMBA, Mashudu Given; MUKWEVHO, Emmanuel. Oleanolic acid and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in chronic diseases. **Molecules**, v. 22, n. 11, 2017. DOI: 10.3390/molecules22111915.

BAI, Yang et al. Pharmacokinetics and Metabolism of Naringin and Active Metabolite Naringenin in Rats, Dogs, Humans, and the Differences Between Species. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. March, p. 1–16, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.00364.

BREAK, Mohammed Khaled Bin et al. Discovery of a highly active anticancer analogue of cardamonin that acts as an inducer of caspase-dependent apoptosis and modulator of the mTOR pathway. **Fitoterapia**, v. 125, p. 161–173, 2018. DOI: 10.1016/j.fitote.2018.01.006.

CARMO, Julianderson; CAVALCANTE-ARAÚJO, Polliane; SILVA, Juliane; FERRO, Janylle; CORREIA, Ana Carolina; LAGENTE, Vincent; BARRETO, Emiliano. Uvaol Improves the Functioning of Fibroblasts and Endothelial Cells and Accelerates the Healing of Cutaneous Wounds in Mice. **Molecules (Basel, Switzerland)**, Switzerland, v. 25, n. 21, 2020. DOI: 10.3390/molecules25214982.

CHOPADE, R. Atul; SALUNKHE, R. Vijay; PATIL, A. Pramod; BURADE, R. Madhav; SOMADE, M. Prakash; MALI, N. Suraj; PANDEY, Anima. **Antinociceptive Investigations of Niranthin in Complete Freund's Adjuvant- induced Chronic Pain in Mice** *Recent Advances in Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/2772270816666220105122956>.

DE OLIVEIRA, Gibson Gomes; CARNEVALE NETO, Fausto; DEMARQUE, Daniel Pecoraro; DE SOUSA PEREIRA-JUNIOR, José Antônio; SAMPAIO PEIXOTO FILHO, Rômulo César; DE MELO, Sebastião José; DA SILVA ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes; LOPES, João Luiz Callegari; LOPES, Norberto Peoporine. Dereplication of Flavonoid Glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximiliani* by Untargeted Tandem Mass Spectrometry-Based Molecular Networking. **Planta medica**, Germany, v. 83, n. 7, p. 636–646, 2017. DOI: 10.1055/s-0042-118712.

DENG, Yang; MA, Ji; WENG, Xin; WANG, Yuqin; LI, Maoru; YANG, Tingting; DOU, Zhiyang; YIN, Zhiqi; SHANG, Jing. Kaempferol-3-o-glucuronide ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in high-cholesterol-diet-induced larval zebrafish and hepg2 cell models via regulating oxidation stress. **Life**, v. 11, n. 5, p. 1–12, 2021. DOI: 10.3390/life11050445.

DORMÁN, György; FLACHNER, Beáta; HAJDÚ, István; ANDRÁS, Csaba D. Chapter 21 - Target Identification and Polypharmacology of Nutraceuticals. *In*: GUPTA, Ramesh C. B. T. *Nutraceuticals* (org.). Boston: **Academic Press**, 2016. p. 263–286. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00021-8>.

DOS SANTOS, Vanessa Samúdio; MACEDO, Flávio Alves; DO VALE, Jean

Silva; SILVA, Denise Brentan; CAROLLO, Carlos Alexandre. Metabolomics as a tool for understanding the evolution of *Tabebuia sensu lato*. **Metabolomics**, v. 13, n. 6, 2017. DOI: 10.1007/s11306-017-1209-8.

ELLOUMI, Wiem; MAHMOUDI, Asma; ORTIZ, Sergio; BOUTEFNOUCHET, Sabrina; CHAMKHA, Mohamed; SAYADI, Sami. Wound healing potential of quercetin-3-O-rhamnoside and myricetin-3-O-rhamnoside isolated from *Pistacia lentiscus* distilled leaves in rats model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112574, 2022. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112574.

FANG, Ge; CHENG, Chuanjing; ZHANG, Manqian; MA, Xiaoyao; YANG, Shengnan; HOU, Xiaotao; DENG, Jiagang; HOU, Yuanyuan; BAI, Gang. The glucuronide metabolites of kaempferol and quercetin, targeting to the AKT PH domain, activate AKT/GSK3 β signaling pathway and improve glucose metabolism. **Journal of Functional Foods**, v. 82, p. 104501, 2021. DOI: 10.1016/j.jff.2021.104501.

FRY, J. C. 3 - Natural low-calorie sweeteners. *In*: BAINES, David; SEAL INGREDIENTS AND FLAVOURINGS, Richard B. T. **Natural Food Additives (org.)**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Woodhead Publishing, 2012. p. 41–75. DOI: <https://doi.org/10.1533/9780857095725.1.41>.

FUNARI, Cristiano Soleo; CASTRO-GAMBOA, Ian; CAVALHEIRO, Alberto José; DA SILVA BOLZANI, Vanderlan. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Quimica Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013. DOI: 10.1590/S0100-40422013001000019.

GANAI, Bilal Ahmad; SHAHID, Mir; RASHID, Auqib; ARA, Tabassum; AHMAD BANDAY, Javid; MALIK, Fayaz; BHAT, Bilal A. Platonic Acid-Aryl Enones as Potential Anticancer Compounds: Synthesis and Biological Profiling against Breast, Prostate and Lung Cancer Cell Lines. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 10, p. e2100292, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100292>.

GHORAI, Subrata. Medicinal properties of a naturally occurring pentacyclic dihydroxy triterpenoid uvaol. **Prayogik Rasayan**, v. 4, n. 4, p. 30–34, 2020. DOI: 10.53023/p.rasayan-20201025.

GONÇALVES, Luís Moreira; VALENTE, Inês Maria; RODRIGUES, José António. An overview on cardamonin. **Journal of medicinal food**, United States, v. 17, n. 6, p. 633–640, 2014. DOI: 10.1089/jmf.2013.0061.

GU, Haiwei; GOWDA, G. A. Nagan.; NETO, Fausto Carnevale; OPP, Mark R.; RAFTERY, Daniel. RAMSY: Ratio analysis of mass spectrometry to improve compound identification. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 22, p. 10771–10779, 2013. DOI: 10.1021/ac4019268.

HUAN, Changchao; XU, Yao; ZHANG, Wei; GUO, Tingting; PAN, Haochun; GAO, Song. Research Progress on the Antiviral Activity of Glycyrrhizin and its Derivatives in Licorice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. July, p. 1–10, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.680674.

IMRAN, Muhammad et al. Myricetin: A comprehensive review on its biological potentials. **Food Science and Nutrition**, v. 9, n. 10, p. 5854–5868, 2021. DOI: 10.1002/fsn3.2513.

JAMES, Shirley; APARNA, Jayasekharan S.; PAUL, Aswathy Mary; LANKADASARI, Manendra Babu; MOHAMMED, Sabira; BINU, Valsalakumari S.; SANTHOSHKUMAR, Thankayyan R.; RESHMI, Girijadevi; HARIKUMAR, Kuzhuvelil B. Cardamonin inhibits colonic neoplasia through modulation of

- MicroRNA expression. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-14253-8.
- JAN, Rahmatullah; KHAN, Murtaza; ASAF, Sajjad; LUBNA; ASIF, Saleem; KIM, Kyung-Min. Bioactivity and Therapeutic Potential of Kaempferol and Quercetin: New Insights for Plant and Human Health. **Plants (Basel, Switzerland)**, Switzerland, v. 11, n. 19, 2022. DOI: 10.3390/plants11192623.
- JANTAN, Ibrahim; HAQUE, Md Areeful; ILANGKOVAN, Menaga; ARSHAD, Laiba. An insight into the modulatory effects and mechanisms of action of phyllanthus species and their bioactive metabolites on the immune system. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. JULY, p. 1–19, 2019. DOI: 10.3389/fphar.2019.00878.
- JOHNSON, I. T. 6 - Antioxidants and antitumour properties. *In*: POKORNY, Jan; YANISHLIEVA, Nedyalka; GORDON, Michael B. T. Antioxidants in Food (org.). **Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition**: Woodhead Publishing, 2001. p. 100–123. DOI: <https://doi.org/10.1016/9781855736160.2.100>.
- KANG, Dong Young; SP, Nipin; JANG, Kyoung-Jin; JO, Eun Seong; BAE, Se Won; YANG, Young Mok. Antitumor Effects of Natural Bioactive Ursolic Acid in Embryonic Cancer Stem Cells. **Journal of Oncology**, v. 2022, p. 6737248, 2022. DOI: 10.1155/2022/6737248.
- KASSUYA, Cândida A. L.; SILVESTRE, Aline; MENEZES-DE-LIMA, Octávio Jr; MAROTTA, Denise Mollica; REHDER, Vera Lúcia G.; CALIXTO, João B. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*. Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. **European journal of pharmacology**, Netherlands, v. 546, n. 1–3, p. 182–188, 2006. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.07.025.
- KHAJURIA, Vidushi et al. Kaempferol-3-o-β-d-glucuronate exhibit potential anti-inflammatory effect in LPS stimulated RAW 264.7 cells and mice model. **International Immunopharmacology**, v. 57, p. 62–71, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.041>.
- KIM, Jae Kwang; PARK, Sang Un. Quercetin and its role in biological functions: An updated review. **EXCLI Journal**, v. 17, n. Table 1, p. 856–863, 2018. DOI: 10.17179/excli2018-1538.
- LANG, Gerhard et al. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: New methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1595–1599, 2008. DOI: 10.1021/np8002222.
- LEROY, F.; VAN KERREBROECK, S.; DE VUYST, L. MOLECULAR BIOLOGY | Metabolomics. *In*: BATT, Carl A.; TORTORELLO, Mary Lou B. T. **Encyclopedia of Food Microbiology** (Second Edition) (org.). Oxford: Academic Press, 2014. p. 780–787. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00377-3>.
- LEVESQUE, Mitchell P.; BENFEY, Philip N. Systems biology. **Current biology : CB**, England, v. 14, n. 5, p. R179-80, 2004. DOI: 10.1016/j.cub.2004.02.012.
- LEVIN, Nadine; SALEK, Reza M.; STEINBECK, Christoph. Chapter 11 - From Databases to Big Data. *In*: HOLMES, Elaine; NICHOLSON, Jeremy K.; DARZI, Ara W.; LINDON, John C. B. T. Metabolic Phenotyping in Personalized and Public Healthcare (org.). Boston: **Academic Press**, 2016. p. 317–331. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800344-2.00011-2>.

LI, Xin; JIN, Weili; ZHANG, Wenkai; ZHENG, Guodong. The inhibitory kinetics and mechanism of quercetin-3-O-rhamnoside and chlorogenic acid derived from *Smilax china* L. EtOAc fraction on xanthine oxidase. **International journal of biological macromolecules**, Netherlands, v. 213, p. 447–455, 2022. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.05.188.

LIU, Guanhui; QIN, Peng; CHENG, Xinying; WU, Lifei; WANG, Ruoning; GAO, Wei. Ursolic acid: biological functions and application in animal husbandry. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, n. October, 2023. DOI: 10.3389/fvets.2023.1251248.

LOMBARDO, Luca; GRASSO, Filomena; LANCIANO, Francesca; LORIA, Stefania; MONETTI, Emanuela. Chapter 2 - Broad-Spectrum Health Protection of Extra Virgin Olive Oil Compounds. *In*: ATTA-UR-RAHMAN, B. T. Studies in Natural Products Chemistry (org.) : **Elsevier**, 2018. v. 57p. 41–77. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00002-8>.

LOU, Hanghang; LI, Hao; ZHANG, Shengliang; LU, Hongyun; CHEN, Qihe. A Review on Preparation of Betulinic Acid and Its Biological Activities. **Molecules**, v. 26, p. 5583, 2021. a. DOI: 10.1007/978-94-011-4846-7_4.

LOU, Hanghang; LI, Hao; ZHANG, Shengliang; LU, Hongyun; CHEN, Qihe. A Review on Preparation of Betulinic Acid and Its Biological Activities. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 5583, 2021. b. DOI: 10.3390/molecules26185583.

MARTINS, Carla de Moura et al. Chemical Composition, Antifungal, and Cytotoxicity Activities of *Inga laurina* (Sw.) Willd Leaves. **The Scientific World Journal**, United States, v. 2019, p. 9423658, 2019. DOI: 10.1155/2019/9423658.

MITSUHASHI, Yohei; FURUSAWA, Yukihiro; ARADATE, Tadashi; ZHAO, Qing Li; MONIRUZZAMAN, Rohan; KANAMORI, Masahiko; NOGUCHI, Kyo; KONDO, Takashi. 3-O-trans-p-coumaroyl-alphitolic acid, a triterpenoid from *Zizyphus jujuba*, leads to apoptotic cell death in human leukemia cells through reactive oxygen species production and activation of the unfolded protein response. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–18, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0183712.

MLALA, Sithenkosi; OYEDEJI, Adebola Omowunmi; GONDWE, Mavuto; OYEDEJI, Opeoluwa Oyehan. Ursolic Acid and Its Derivatives as Bioactive Agents. **Molecules (Basel, Switzerland)**, Switzerland, v. 24, n. 15, 2019. DOI: 10.3390/molecules24152751.

MORAES, Maria Carolina B. Moraes; LAGO, Claudimir Lúcio. Espectrometria de massas com ionização por “ Electrospray aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organomatólicas. **Quim. Nova**, V. 26, n.. 4, 556-563. 2003. doi.org/10.1590/S0100-40422003000400019.

MOTLHATLEGO, Katlego E.; ABDALLA, Muna Ali; LEONARD, Carmen M.; ELOFF, Jacobus N.; MCGAW, Lyndy J. Inhibitory effect of *Newtonia* extracts and myricetin-3-o-rhamnoside (myricitrin) on bacterial biofilm formation. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2020. DOI: 10.1186/s12906-020-03139-4.

NAWAZ, Javaria et al. Cardamonin: A new player to fight cancer via multiple cancer signaling pathways. **Life Sciences**, v. 250, n. October 2019, p. 117591, 2020. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117591.

NETO, Fausto Carnevale; PILON, Alan C.; SELEGATO, Denise M.; FREIRE, Rafael T.; GU, Haiwei; RAFTERY, Daniel; LOPES, Norberto P.; CASTRO-GAMBOA, Ian. Dereplication of natural products using GC-TOF mass

spectrometry: Improved metabolite identification by spectral deconvolution ratio analysis. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 3, n. SEP, p. 1–13, 2016. DOI: 10.3389/fmolb.2016.00059.

NICHOLSON, Jeremy K.; LINDON, John C. Systems biology: Metabonomics. **Nature England**, 2008. DOI: 10.1038/4551054a.

NIELSEN, Kristian F.; MÅNSSON, Maria; RANK, Christian; FRISVAD, Jens Christian; LARSEN, Thomas O. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 11, p. 2338–2348, 2011. DOI: 10.1021/np200254t.

PALAR, Ali; Köprülü , RABIA, Edibe Parlar, ARLAN, Seyfullah Oktay, CAM, aliha Aşşenur, Özdoğan , FIDAM Pesen; Yumrutaş , ÖNDE; Üçkardeş, FATIN; RIOS, Miguel; MARTINEZ, José L. Extract of Glycyrrhiza glabraroot attenuates nociception in experimental pain models: The role of BKCa channels. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i7.30374> . 2022

PARAWIRA, Wilson. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 82–93, 2009. DOI: 10.1080/07388550902823674.

PATKAR, Ashwin A.; LEE, Jonathan C.; BURGESS, Douglas M. Chapter 56 - Medication for Cravings in Substance Use Disorders. *In*: MILLER, Peter M. B. T. Interventions for Addiction (org.). San Diego: **Academic Press**, 2013. p. 527–542. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398338-1.00056-7>.

PEREIRA, Leticia Pinheiro Aroucha; DURANS, Keyla Cristina Nogueira; FRÓES, Wemerson Lobato.; PIMENTA, Thayane Cruz; SILVA, Daniele Souza; BATISTA, Marisa Cristina Aranha.; CARVALHO, Mayara Soares Cunha. Produtos naturais utilizados na prevenção e/ou alívio dos sintomas da COVID-19: uma revisão. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento** , [S. l.] , v. 7, pág. e34511730374, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i7.30374. 2022

PERIFERAKIS, Argyrios et al. Kaempferol: Antimicrobial Properties, Sources, Clinical, and Traditional Applications. **International journal of molecular sciences**, Switzerland, v. 23, n. 23, 2022. DOI: 10.3390/ijms232315054.

PILON, Alan C.; VIEIRA, Natália C.; AMARAL, Juliano G.; MONTEIRO, Afif F.; DA SILVA, Ricardo R.; SPÍNDOLA, Laila S.; CASTRO-GAMBOA, Ian; LOPES, Norberto P. Molecular networks: An analysis on annotations and discovery of new assets. **Quimica Nova**, v. 44, n. 9, p. 1168–1179, 2021. DOI: 10.21577/0100-4042.20170777.

PUNIA BANGAR, Sneha; CHAUDHARY, Vandana; SHARMA, Nitya; BANSAL, Vasudha; OZOGUL, Fatih; LORENZO, Jose M. Kaempferol: A flavonoid with wider biological activities and its applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2022. DOI: 10.1080/10408398.2022.2067121.

RAMOS-TOVAR, Erika; MURIEL, Pablo. Chapter 9 - Phytotherapy for the Liver*. *In*: WATSON, Ronald Ross; PREEDY, Victor R. B. T. Dietary Interventions in Liver Disease (org.): **Academic Press**, 2019. p. 101–121. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814466-4.00009-4>.

RASUL, Azhar; MILLIMOUNO, Faya Martin; ALI ELTAYB, Wafa; ALI, Muhammad; LI, Jiang; LI, Xiaomeng. Pinocembrin: A novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/379850.

REN, Jie; LU, Yifei; QIAN, Yanhong; CHEN, Bozhou; WU, Tao; JI, Guang. Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, p. 2759–2776, 2019. DOI: 10.3892/etm.2019.7886.

RUTTANAPATTANAKUL, Jirapak; WIKAN, Nitwara; POTIKANOND, Saranyapin; NIMLAMOOL, Wutigri. Molecular Targets of Pinocembrin Underlying Its Regenerative Activities in Human Keratinocytes. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 8, p. 1–15, 2022. DOI: 10.3390/ph15080954.

SALCEDO, LUNA, J., CASTRO, MONTOYA, A. J., RICO, J. L., CAMPOS, GARCÍA, J. Optimization of Acid Hydrolysis. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 9, n. 1, p. 91–97, 2010.

SALEHI, Bahare; FOKOU, Patrick Valere Tsouh; SHARIFI-RAD, Mehdi; ZUCCA, Paolo; PEZZANI, Raffaele; MARTINS, Natália; SHARIFI-RAD, Javad. The therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2019. DOI: 10.3390/ph12010011.

SEN, Alaattin. Prophylactic and therapeutic roles of oleanolic acid and its derivatives in several diseases. **World journal of clinical cases**, United States, v. 8, n. 10, p. 1767–1792, 2020. DOI: 10.12998/wjcc.v8.i10.1767.

SILVA DOS SANTOS, Jéssica; GONÇALVES CIRINO, João Pedro; DE OLIVEIRA CARVALHO, Patrícia; ORTEGA, Manoela Marques. The Pharmacological Action of Kaempferol in Central Nervous System Diseases: A Review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. January, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2020.565700.

ŞÖHRETOĞLU, Didem; RENDA, Gülin. Chapter Eleven - Medicinal natural products in osteoporosis. *In*: SARKER, Satyajit D.; NAHAR, Lutfun B. T. Annual Reports in Medicinal Chemistry (org.). **Medicinal Natural Products: A Disease-Focused Approach**: Academic Press, 2020. v. 55p. 327–372. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2020.03.002>.

TALHAOUI, Nassima; TRABELSI, Najla; TAAMALLI, Amani; VERARDO, Vito; GÓMEZ-CARAVACA, Ana Maria; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, Alberto; ARRAEZ-ROMAN, David. Chapter 12 - Olea europaea as Potential Source of Bioactive Compounds for Diseases Prevention. *In*: ATTA-UR-RAHMAN, B. T. **Studies in Natural Products Chemistry** (org.): Elsevier, 2018. v. 57p. 389–411. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00012-0>.

THUAN, Nguyen Huy; PANDEY, Ramesh Prasad; THUY, Ta Thi Thu; PARK, Je Won; SOHNG, Jae Kyung. Improvement of regio-specific production of myricetin-3-O- α -L-rhamnoside in engineered Escherichia coli. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 8, p. 1956–1967, 2013. DOI: 10.1007/s12010-013-0459-9.

TITZ, B.; KNORR, A.; SEWER, A.; MARTIN, F.; IVANOV, N. V.; TALIKKA, M.; GONZALEZ SUAREZ, I.; PEITSCH, M. C.; HOENG, J. 2.18 - Systems Biology: Methods and Applications. *In*: CHACKALAMANNIL, Samuel; ROTELLA, David; WARD, Simon E. B. T. **Comprehensive Medicinal Chemistry I. I. I.** (org.). Oxford: Elsevier, 2017. p. 434–480. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12333-9>.

TSAI, Shih-Jei; YIN, M. C. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. **Journal of food science**, United States, v. 73, n. 7, p. H174-8, 2008. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00864.x.

TSAO, Shih-ming; YIN, Mei-chin. Antioxidative and Antiinflammatory Activities of Asiatic Acid, Glycyrrhizic Acid, and Oleanolic Acid in Human Bronchial

Epithelial Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 12, p. 3196–3204, 2015. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00102.

UÇAR, Kübra; GÖKTAŞ, Zeynep. Biological activities of naringenin: A narrative review based on in vitro and in vivo studies. **Nutrition Research**, v. 119, p. 43–55, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2023.08.006>.

VON BERTALANFFY, Ludwing. Teoria Geral dos Sistemas, Fundamentos, Teorias e Aplicações. Rio de Janeiro: **Vozes**, 1975.

WAHAB, Shadma et al. and Toxicology. **Activities, Biological Evidence, Clinica**, 2021.

WANG, Baoying; MA, Wenna; YANG, Huiyu. Puerarin attenuates hypoxia-resulted damages in neural stem cells by up-regulating microRNA-214. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 2746–2753, 2019. DOI: 10.1080/21691401.2019.1628040.

WANG, Guanzhen; WANG, Yuanhui; YAO, Liangliang; GU, Wei; ZHAO, Shengchao; SHEN, Ziyi; LIN, Zihan; LIU, Wei; YAN, Tingdong. Pharmacological Activity of Quercetin: An Updated Review. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, 2022. DOI: 10.1155/2022/3997190.

WANG, Jingqiu; FANG, Xianying; GE, Lin; CAO, Fuliang; ZHAO, Linguo; WANG, Zhenzhong; XIAO, Wei. Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0197563.

WANG, Mingxun et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016. DOI: 10.1038/nbt.3597.

WANG, Yanwen; HE, Yonghan. Ursolic acid, a promising dietary bioactive compound of anti-obesity. **The FASEB Journal**, v. 28, n. S1, p. 1045.40, 2014. DOI: https://doi.org/10.1096/fasebj.28.1_supplement.1045.40.

WANT, Elizabeth J.; METZ, T. O. MS Based Metabonomics. *In*: LINDON, John C.; TRANTER, George E.; KOPPENAAL, David W. B. T. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry** (Third Edition) (org.). Oxford: Academic Press, 2017. p. 926–935. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00030-3>.

WU, L.; WU, W., CAI, Y.; LI, C.; WANG, L. HPLC fingerprinting-based multivariate analysis of phenolic compounds in mango leaves varieties: Correlation to their antioxidant activity and in silico α -glucosidase inhibitory ability, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, V. 191, doi.org/10.1016/j.jpba. 2020.

YANG, Jane Y. et al. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686–1699, 2013. DOI: 10.1021/np400413s.

ZEECE, Michael. Chapter six - Flavors. *In*: ZEECE, Michael B. T. Introduction to the Chemistry of Food (org.): **Academic Press**, 2020. p. 213–250. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809434-1.00006-2>.

ZHU, Xinbing; LI, Rongnian; WANG, Chen; ZHOU, Shuo; FAN, Yujia; MA, Shuang; GAO, Didi; GAI, Nian; YANG, Jing. Pinocembrin Inhibits the Proliferation and Metastasis of Breast Cancer via Suppression of the PI3K/AKT

Signaling Pathway. **Frontiers in Oncology**, v. 11, n. July, p. 1–13, 2021. DOI: 10.3389/fonc.2021.661184.

6 CAPÍTULO 2

Atividade antimicrobiana de *Melaleuca* spp. (Myrtaceae) frente a isolados bacterianos causadoras da mastite bovina: uma análise cienciométrica (Publicado no periódico Conjecturas, Vol. 22, Nº 18. P..1012-1024. <https://doi.org/10.53660/CONJ-2240-2W83>. 2022)

RESUMO

Por definição, mastite é a inflamação da glândula mamária, que ocasiona alterações no leite e no tecido glandular mamário, do ponto de vista físico-químico e microbiológico. Antibióticos são comumente utilizados para tratar mastites em vacas leiteiras, dentre eles encontram-se os β -lactâmicos, representados principalmente pelas penicilinas e cefalosporinas. Nos problemas gerados pelo uso de antibióticos, tem-se desde a seleção de linhagens resistentes, até a presença de resíduos no leite, gerando problemas de saúde pública e ambientais, o que tem levado a busca por novas alternativas de tratamentos, principalmente com uso de produtos naturais. No presente trabalho foi realizada uma análise cienciométrica sobre a utilização de *Melaleuca* spp. contra mastite em cinco base de dados, sendo considerados como trabalhos científicos apenas artigos científicos, publicados em português, inglês e espanhol nos últimos 30 anos. Embora seja preciso análises futuras mais aprofundadas, os resultados além de mostrarem indícios sobre a ação antimicrobiana de *Melaleuca* spp. contra microrganismos causadores de mastite, evidenciam a potencialidade de gerar produção científica, bem como indicar os caminhos para redes de colaboração.

Palavras-chave: Mastite; Melaleuca; Ciencimetria; Atividade Antibacteriana

ABSTRACT

Mastitis is defined as inflammation of the mammary gland that results in physical-chemical and microbiological changes in the milk and mammary glandular tissue. Antibiotics, particularly β -lactams, such as penicillins and cephalosporins, are commonly used to treat mastitis in dairy cows. Among the problems caused by antibiotic use are the selection of resistant strains and the presence of residues in milk, which cause public health and environmental issues, leading to the search for new treatment alternatives, primarily with the use of natural products. A scientometric analysis was performed on the use of *Melaleuca* spp. against mastitis in five databases, with only scientific articles published in Portuguese, English, and Spanish in the last 30 years considered as scientific works. Although more in-depth future analyses are required, the findings, in addition to demonstrating evidence of *Melaleuca* spp. antimicrobial action against mastitis-causing microorganisms, show the potential to generate scientific production and indicate ways to form collaboration networks.

Keywords: Mastitis; Melaleuca; Scientometrics; Antibacterial Activity

INTRODUÇÃO

A principal afecção do gado leiteiro é a mastite, patologia multifatorial, que apresenta variadas etiologias, podendo ser causada por diferentes grupos de microrganismos, tais como: bactérias, vírus, fungos e algas, dentre estes destacam-se os estafilococos coagulase-positivas (SCP) e negativa (SCN), estando como principal o *Staphylococcus aureus* e várias espécies de SCN. É principal doença contagiosa nos rebanhos leiteiros e responsável por onerar a produção e a indústria de laticínios (LOPES; MANZI e LANGONI, 2018), sendo a mastite subclínica a maior responsável por perdas na indústria leiteira (ACOSTA *et al.*, 2016).

Segundo Langoni (2013), quando a bactéria se localiza na mama (glândulas) ela consome os componentes do leite e se propaga em alto nível.

Na maioria dos casos, a não efetividade do tratamento, muitas vezes leva ao uso indiscriminado de antimicrobianos, sem recomendações do médico veterinário, o que pode levar a um problema ainda maior, que é a seleção de microrganismos resistentes, que se tornam causadores de mastites crônicas (ARCANJO *et al.*, 2017).

Martin (2011) relata que os β -lactâmicos, os macrolídeos, os aminoglicosídeos, o cloranfenicol e as tetraciclinas estão entre os principais antimicrobianos administrados no rebanho leiteiro para tratamento da mastite. Destes, os β -lactâmicos representados pelas penicilinas e cefalosporinas são os mais utilizados no Brasil (quase 40%), e os resíduos destes antibióticos podem causar problemas de saúde no homem e em outros animais.

Uma alternativa é a busca por produtos naturais, que sejam efetivos e causem menos danos. Dentre as diferentes fontes de produtos naturais as plantas são consideradas promissoras, onde são feitos estudos iniciais a partir de extratos hidroalcoólicos no tratamento de mastites, como relatado por Schuch *et al.* (2008).

O presente trabalho visa realizar uma análise cienciométrica na perspectiva de detectar se a atividade antimicrobiana do gênero botânico *Melaleuca* (Myrtaceae) sobre mastite bovina representa um domínio de interesse.

METODOLOGIA

Para se analisar indicadores cientiométricos, foram feitas consultas nas bases de dados Scielo, Scopus, PubMed, Web of Science e Google Acadêmico, considerando como trabalhos científicos apenas artigos científicos. Foram considerados trabalhos publicados em português, inglês e espanhol, dos últimos 30 anos (de 1991 à 2021). A pesquisa foi realizada com as palavras e caracteres booleanos mastit AND Melaleuca.

Após a realização da busca os dados foram selecionados para eliminação de duplicidades de registros entre as bases. Nos casos em que houve detecção de duplicidade, só foi considerado o registrado na base que possuía o maior número de trabalhos elegíveis para o presente estudo.

Os trabalhos elegíveis foram refinados por meio da leitura de seus títulos e resumos, sendo a leitura de outras partes, como palavras-chave, introdução ou metodologia, realizada quando a abordagem da temática ou de algum fator não foi suficientemente clara. Nesta etapa foi verificado o tipo de trabalho realizado, o tipo de variável resposta utilizada nos trabalhos de pesquisa primária (p.ex., atividade antimicrobiana, atividade antifúngica, atividade antiviral), em qual país o trabalho foi realizado, e quando o país foi o Brasil, em qual estado brasileiro o trabalho foi realizado. Para fins de avaliação de tendência e quantitativos, foi verificada também a produção científica por ano, as revistas científicas e seus respectivos fatores de impacto (disponibilizados pela Clarivate em 2020) e as citações dos trabalhos.

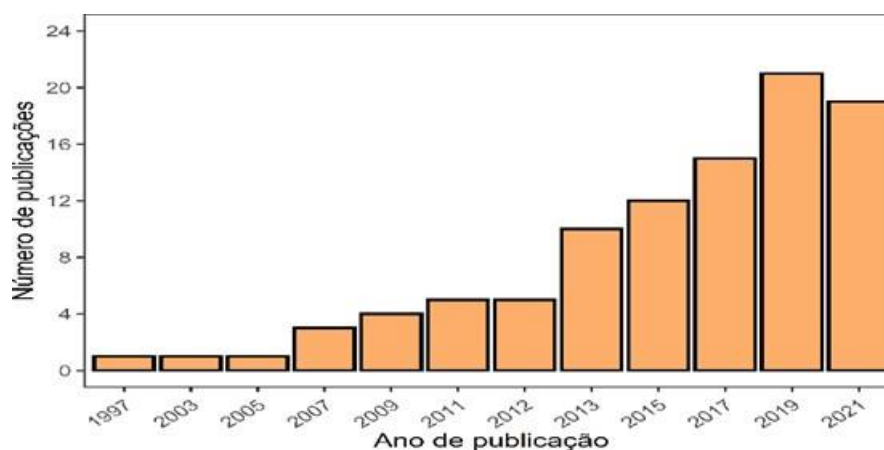
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos critérios adotados, as bases Scielo, PubMed e Web of Science não foram representativas, pois a base Scielo não apresentou resultados de busca, PubMed apresentou apenas um trabalho, o qual estava em duplicidade com a base Scopus, e Web of Science apresentou cinco trabalhos, todos em duplicidade também com a base Scopus. A base Scopus apresentou 176 registros de trabalhos e a base Google Acadêmico 521 trabalhos. Contudo, aplicando-se os critérios de categoria do trabalho, línguas e duplicidades, restaram 169 trabalhos científicos da base Scopus e 294 da base Google Acadêmico, totalizando 463 trabalhos científicos elegíveis para a análise cienciométrica.

Total de Artigos Publicados entre 1991 e 2021

Quanto ao número de publicações na base Scopus, observou-se um discreto crescimento no número de publicações (figura 1) iniciado em 1997, sendo que a partir de 2013 houve um crescimento significativo de publicações, estando em destaque o ano de 2019 (21,65%).

Figura 1: Número de artigos em relação ao ano na base de dados Scopus.

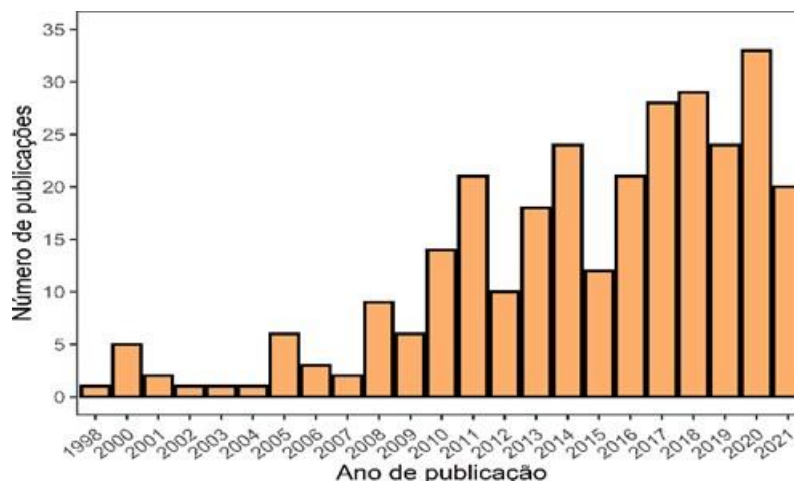


Fonte: Elaborado pelos autores, 2022

Na base Google Acadêmico, observou-se que a partir de 2000 iniciou-se um discreto acréscimo seguido de queda, estabelecendo uma tendência oscilatória (figura 2). Porém, mesmo mantendo-se a tendência, a partir de 2010

houve um crescimento significativo de publicações, destacando-se o ano de 2020 (11,34%).

Figura 2: Número de publicações em relação ao ano na base de dados Google Acadêmico.



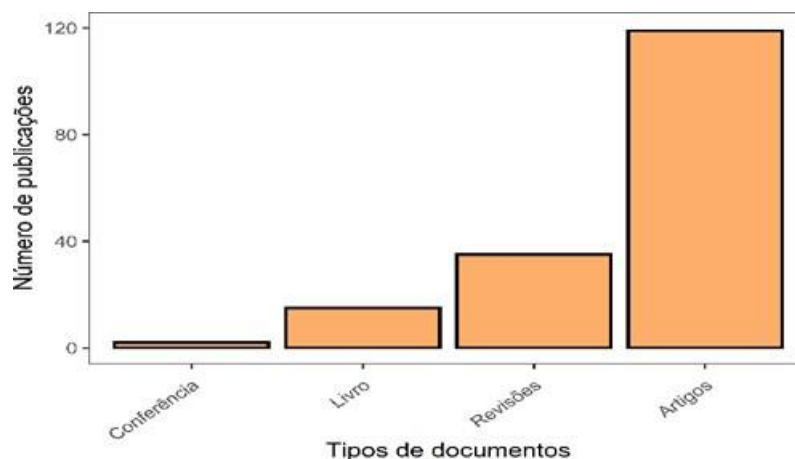
Fonte: Elaborado pelos autores, 2022

Em ambas as bases de dados, o crescimento do número de artigos científicos sobre o emprego de espécies do gênero botânico *Melaleuca* frente a bactérias causadoras de mastite a partir de 2010 pode estar relacionado com o que Brandão (2006) já havia detectado, ao relatar o surgimento de um consumidor cada vez mais exigente, buscando produtos saudáveis, livres de resíduos, possibilitados pela produção dentro de padrões agroecológicos. Esse tipo de produto, segundo Peixoto *et al.* (2009), tem que ser certificado, com base em um rol de exigências, como a não utilização de fertilizantes químicos e agrotóxicos na produção de alimentos para o rebanho e diminuição da utilização de antibióticos, justificando a busca por produtos naturais e a devida comprovação científica.

Comunicação formal sobre o tema nas bases de dados

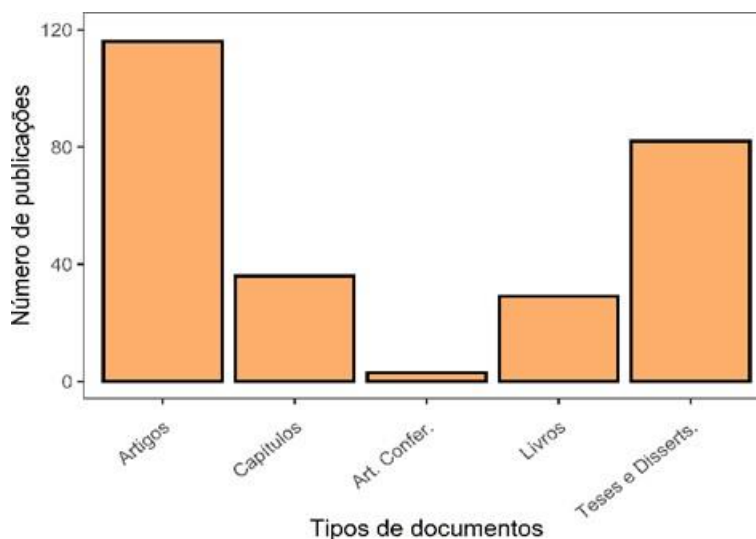
Constatou-se que, em ambas as bases de dados, o formato de artigo científico original foi majoritário (Figuras 03 e 04), representando 69,6% na base Scopus e 43,62% na base Google Acadêmico.

Figura 3: Quantidade de publicações por formato na base Scopus entre 1991 e 2021, que abordam a atividade antimicrobiana de *Melaleuca* sp. sobre bactérias causadoras de mastite



Fonte: Elaborado pelos autores, 2022

Figura 04: Quantidade de publicações por formato na base Google Acadêmico entre 1991 e 2021, que abordam a atividade antimicrobiana de *Melaleuca* sp. sobre bactérias causadoras de mastite



Fonte: Elaborado pelos autores, 2022

Os resultados demonstram, que pela busca em produzir trabalhos científicos e publicá-los na forma de artigos originais, buscando-se credibilidade e a rigidez científica, os pesquisadores, seus grupos de pesquisa e redes de colaboração são responsáveis não só pelo crescimento quantitativo do tema, como também da qualidade e confiabilidade, pois segundo Noronha *et al.* (2008),

a produção de artigos como forma de disseminação das pesquisas é validada pelos membros da comunidade científica, que são especialistas no tema.

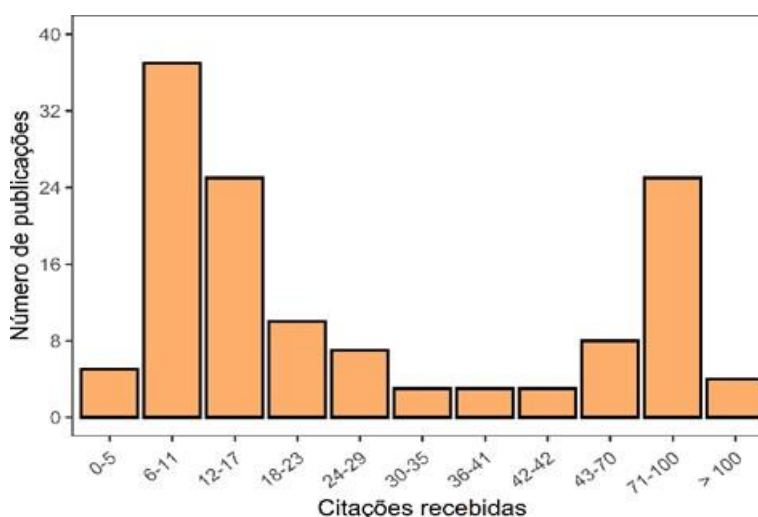
Outro aspecto importante da produção de artigos, como destacado por Cobo (2011), é que essa produção se torna uma ferramenta de aferição eficaz, fornecendo um panorama do desenvolvimento de uma determinada área de conhecimento, seja em abrangência mundial ou regional.

Citações recebidas pelos artigos analisados

Mesmo sabendo-se da lacuna entre o porquê o autor citou e o que se compreende sobre o porquê o autor citou, a indexação de citações é embasada na premissa de que a citação expressa a relação entre dois documentos (MACIAS-CHAPULA, 1998). No presente trabalho, consideramos as citações como uma forma de relação entre autores, além de indicar a importância de um artigo/autor para a área.

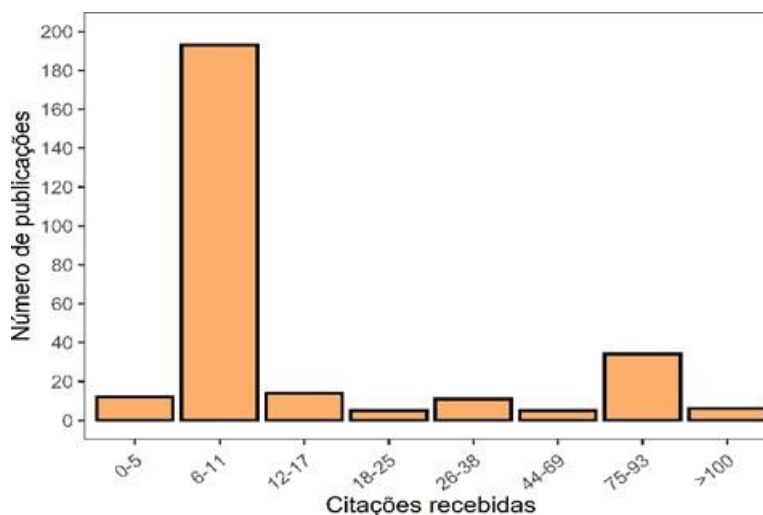
Nas bases consultadas, a maior parte dos artigos (69% na base Google Acadêmico e 28,5% na base Scopus) recebeu até 5 citações (Figuras 5 e 6), porém, em ambas, 4% dos trabalhos receberam mais de 100 citações.

Figura 5: Citações recebidas por artigos elegíveis na base Scopus



Fonte: Elaborado pelos autores, 2022

Figura 6: Citações recebidas por artigos elegíveis na base Google Acadêmico



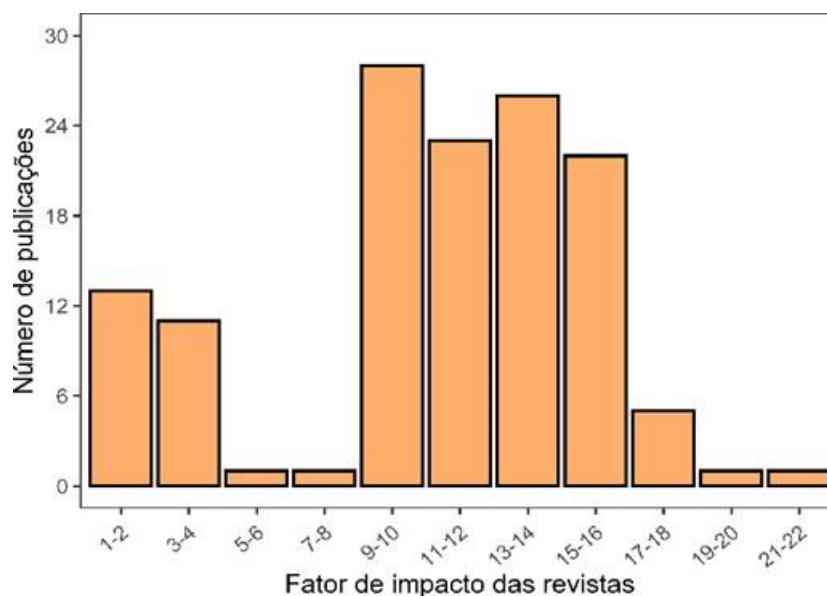
Fonte: Elaborado pelos autores, 2022

Apesar do tema estudado ser relativamente novo, a distribuição das citações entre os autores já demonstra uma maturidade crescente no aspecto científico. Segundo Macias- Chapula (1998) a ciência como um sistema social tem três funções primordiais: disseminar conhecimentos, assegurar preservação de padrões e atribuir créditos e reconhecer autores que contribuem para o desenvolvimento das ideias em diferentes campos.

As relações entre a citação e a referência, possibilitam a visualização de uma rede formada por deferências a autores e suas contribuições, onde os textos que citam e os citados se conectam por vínculos de ideias e autores (SILVEIRA e BAZI, 2008).

Mesmo havendo uma visão pragmática sobre a contribuição da citação na composição do fator de impacto, o aumento do número de publicações no período e o conseqüente crescimento das redes de citações torna o tema promissor, num caminhar em via de mão dupla com o fator de impacto, pois quanto mais criterioso for o artigo mais citado será. Muitas revistas não apresentaram fator de impacto por não estarem indexadas na base Web of Science pela Clarivate em 2021 ou ainda, por terem deixado de existir antes desse ano, mas mesmo assim, os artigos selecionados na base Scopus estão distribuídos entre revistas de fator de impacto entre 9 e 16 (Figura 7).

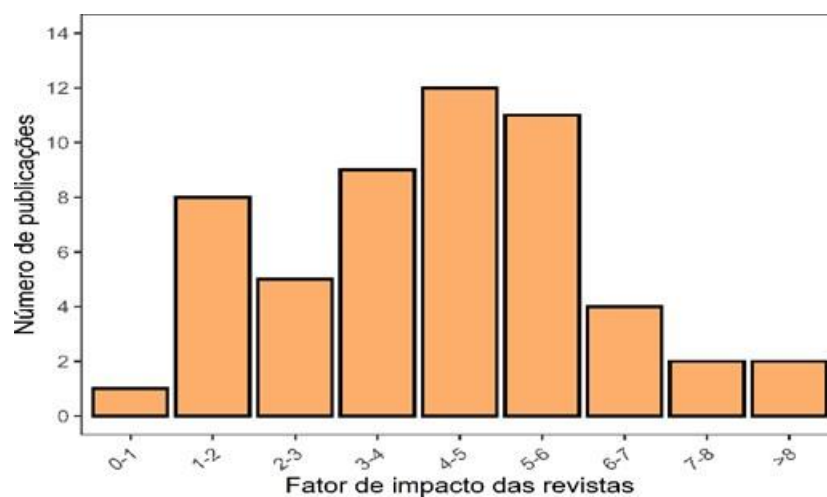
Figura 7: Fator de impacto das Revistas Científicas na base de dados Scopus.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2022

Na base Google Acadêmico (Figura 8), por armazenar um número menor de revistas indexadas, os artigos estão distribuídos em revistas de fator de impacto entre 1 e 6.

Figura 8: Fator de impacto das Revistas Científicas na base de dados Google Acadêmico.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2022

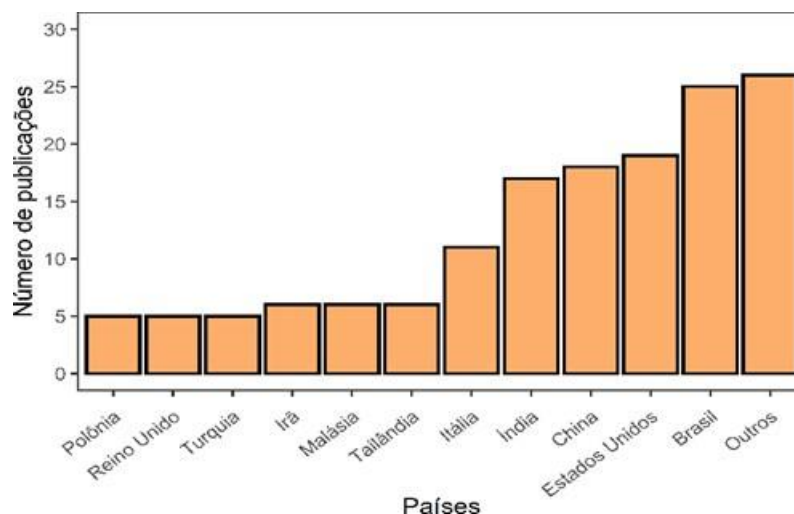
As publicações no período estudado, concentram-se em atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca* spp., como por exemplo os trabalhos de Carson et al. (2002), Chen et al. (2020) e Zhan et al. (2020), publicados em revistas com fator de impacto acima de 3, pois apresentam protocolos bem elaborados e uma rede de colaboração robusta, o que acarreta

muitas citações e citações recentes, aspectos que elevam fator de impacto, como relatado por Garfield (1994).

Distribuição geográfica das publicações

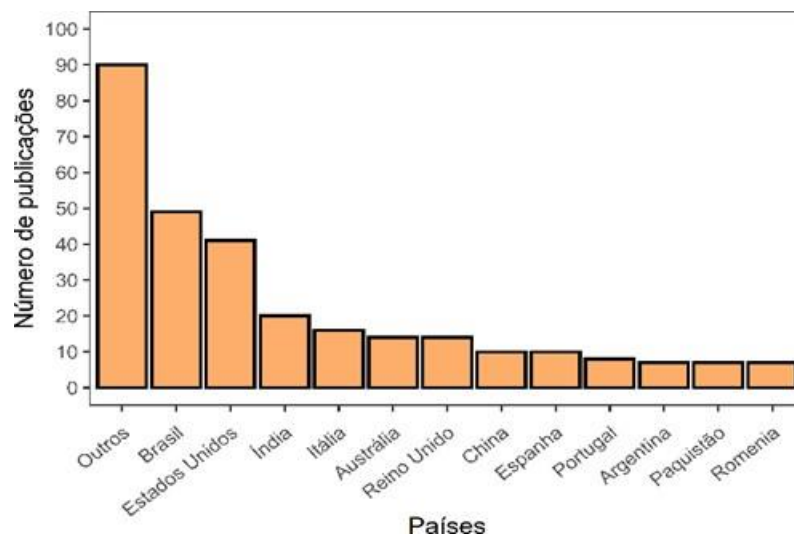
Em relação ao local onde os artigos foram produzidos, a análise mostrou que o Brasil se encontra numa posição de destaque em relação ao tema, tanto nos artigos da base Scopus (Figura 9) quanto nos artigos da base Google Acadêmico (Figura 10), ficando na frente de países como Estados Unidos, China, Índia e países da União Européia.

Figura 9: Origem dos artigos publicados entre 1991 e 2021 na base Scopus.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2022

Figura 10: Origem dos artigos publicados entre 1991 e 2021 na base Google Acadêmico.

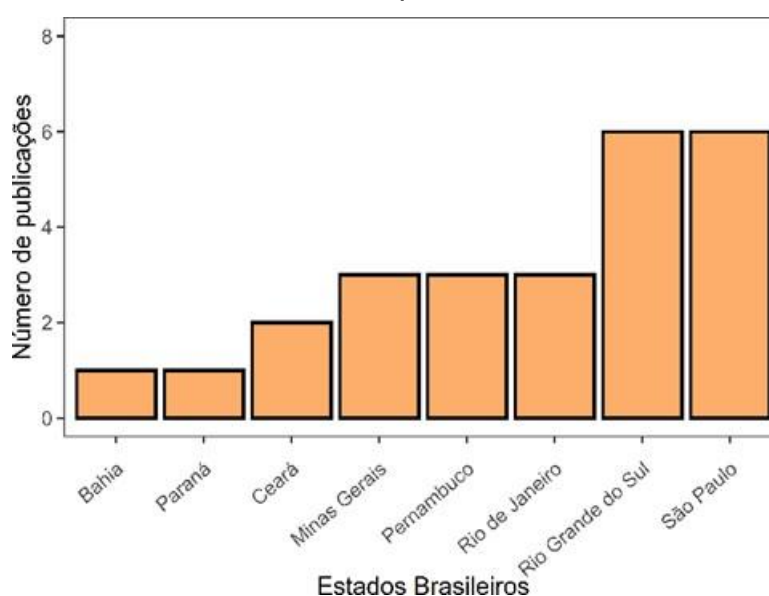


Fonte: Elaborado pelos autores, 2022

O Brasil ocupa a quarta posição na produção mundial de leite (IBGE, 2016) e mesmo assim domina o cenário de pesquisas relacionadas ao uso de *Melaleuca spp.* na prevenção ou controle da mastite bovina. Esta tendência provavelmente está ligada a uma crescente preocupação, não somente no aumento da produtividade, mas em relação a qualidade da produção do leite no Brasil, pois a detecção, mesmo em pequenas quantidades de resíduos de antibióticos levam ao descarte, evitando-se prejuízos á saúde pública (FERREIRA et al., 2014), o que leva a busca por novas abordagens para o controle e prevenção da mastite em vacas leiteiras (BASKARAN *et al.*, 2009).

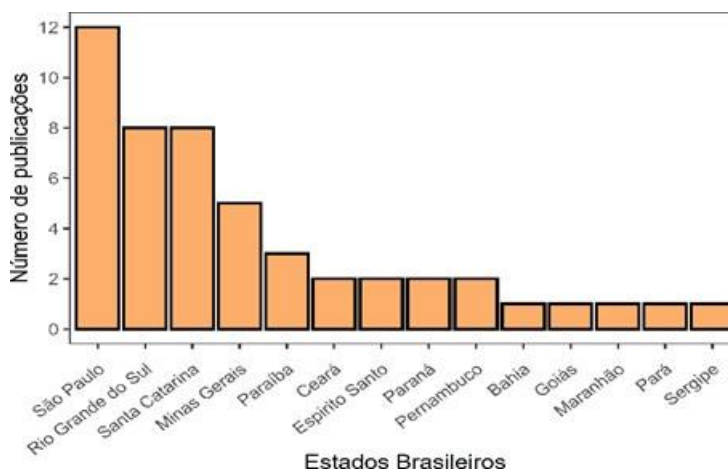
A tendência pela busca de formas alternativas no controle e prevenção da mastite, pode ser responsável pela distribuição da produção científica sobre o uso de *Melaleuca spp.* no controle e prevenção da mastite no Brasil. A produção de artigos por estados brasileiros, tanto na base Scopus (Figura 11), quanto na base Google Acadêmico (Figura 12), espelham as regiões de maior produção leiteira, destoando somente em relação à região Centro-Oeste que teve uma representatividade igual à região Norte. A captação de leite cru Segundo IBGE (2022), evidenciou a região Sudeste com a maior proporção (38,4%), seguida pelas regiões Sul (38,1%), Centro-Oeste (11,5%), Nordeste (8,3%) e Norte (3,7%).

Figura 11: Origem dos artigos publicados entre 1991 e 2021 no Brasil na base Scopus



Fonte: Elaborado pelos autores, 2022

Figura 12: Origem dos artigos publicados entre 1991 e 2021 no Brasil na base Google Acadêmico



Fonte: Elaborado pelos autores, 2022

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise cienciométrica demonstrou que estudos associando o tratamento e prevenção da mastite bovina ao gênero botânico *Melaleuca* (Myrtaceae) ainda são bastantes recentes e mesmo com a crescente produção científica nos últimos anos, não aparenta entrar em caducidade. Embora seja preciso análises futuras mais aprofundadas, os resultados além de mostrarem indícios sobre a ação antimicrobiana de *Melaleuca* spp. contra microrganismos causadores de mastite, evidenciam a potencialidade de gerar produção científica, bem como indicar os caminhos para formação de redes de colaboração.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira., v. 36, n. 07. p. 565-573, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700001>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- ARCANJO, A. H. M. et al. . Programa dos seis pontos de controle da mastite em rebanhos leiteiros. Gl. Sci Technol. v.10, n.1, p.78 – 88, 2017.
- BASKARAN et al. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. Journal of Dairy Science, v. 92, n. 4, p. 1423-1429, 2009
- BRANDÃO, M. G. L et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopocia. Revista Brasileira de Farmacognosia. v.16, n.3, pp. 408 - 420, 2006.

CARSON, C. F. et al. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CHEN, Z. et al. Tea tree oil prevents mastitis-associated inflammation in bovine mammary epithelial cells. *Frontiers in Veterinary Science*. v.7, p. 1–9. 2020

COBO, M. J. et al. Science mapping software tools: review, analysis and cooperative study among tools. *Journal of the American Society for Information Science and Technology*, New York, v. 62, n. 7, p. 1382–1402, 2011

FERREIRA, A. R. P., et al. Resíduos de antibióticos em leite in natura utilizado para processamento em laticínio localizado no município de Teresina – Piauí. *Acta Tecnológica*, v. 9, n.1, pp. 9–12, 2014.

GARFIELD, E. Dispelling a few common myths about journal citation impacts. *The Scientist*, v. 11, n. 3, p.11, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Abate de animais, produção de leite, couro e ovos. 2016. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abateleite-couro-ovos_201504_2.shtm. Acessado em: 30 out de 2021.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras*. v.33,n.5, p. 620-626. 2013.

LOPES, B. C.; MANZI, M. P.; LANGONI, H. Etiologia das mastites: pesquisa de micro-organismos da classe Mollicutes. *Vet. e Zootec*.v. 25, n.2, p. 173-179. 2018.

MACIAS-CHAPULA, C. A. O papel da infometria e da cienciometria e sua perspectiva nacional e internacional. *Ciência da Informação [online]*., v. 27, n. 2, pp. nd ,1998 . Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-19651998000200005>. Epub 21 Nov. 2021. ISSN 1518-8353. <https://doi.org/10.1590/S0100-19651998000200005>. Acesso em: 21 out. 2021.

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antibióticos em leite – Uma revisão. *Segurança Alimentar e Nutricional*. v.18, n.2, p. 80-87. 2011.

NORONHA, D. P.; MARICATO, J. M. Estudos métricos da informação: primeiras aproximações. *Encontros Bibli: Revista Eletrônica de Biblioteconomia e Ciência da*

Informação, s. n. esp. 1. sem., p. 116-128, 2008. Disponível em: DOI: 10.5007/1518- 2924.2008v13nesp1p116. Acesso em: 21 jul. 2022.

PEIXOTO, E.C.T.M et al. Incidência de mastite bovina em animais homeopatizados. *Rev. Inst. "Cândido Tostes"* . v.64, n.367/368, p. 67-71, 2009.

SCHUCH, L. F. D. et al. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 1, p. 161-169. 2008.

SILVEIRA, M. A. A.; BAZI, R. E. R. Rede de textos científicos na ciência da informação: análise cienciométrica da institucionalização de um campo científico. *DataGramaZero*, v. 9, n. 3, 2008. Disponível em: <http://hdl.handle.net/20.500.11959/brapci/6622>. Acesso em: 26 jul. 2022.

ZHAN, Kang et al. The protective roles of tea tree oil extracts in bovine mammary epithelial cells and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2020.

7 CAPÍTULO 3

Atividade antimicrobiana do extrato de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) em bactérias causadoras da mastite bovina (Publicado em Peer Review, 5(16), 115–128. <https://doi.org/10.53660/772.prw2222> . 2023)

RESUMO

O presente trabalho realizou avaliação fitoquímica e antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) em bactérias causadores da mastite bovina. Após identificação da planta foi realizado o preparo do extrato e submetido aos testes fitoquímicos e antibacterianos. A verificação da presença das classes metabólicas foi realizada por análise cromatográfica por técnicas tradicionais e para a verificação dos compostos por espectrometria de massas acoplada a eletrosplay HPLC-DAD-ESI(+)-MS/MS (micrOTOF-QII) (ESI-MS). Para avaliar a ação antibacteriana foram verificados a concentração inibitória (CIM) e a concentração bactericida mínima (MBC). Nos resultados verificou-se a presença de terpenos, flavonoides glicosilados, flavonoides aglicona, triterpenos, tanino e a espectrometria identificou 13 superclasses químicas com 88 compostos. O extrato apresentou atividade antimicrobiana contra as cepas de *Staphylococcus aureus* da mastite bovina demonstrando ser uma opção promissora no tratamento da doença.

Palavras-chave: Melaleuca; Mastite; Metabólitos; Antimicrobiano.

ABSTRACT

The present work carried out a phytochemical and antimicrobial evaluation of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) in bacteria that cause bovine mastitis. After identifying the plant, the extract was prepared and submitted to phytochemical and antibacterial tests. The verification of the presence of metabolic classes was performed by chromatographic analysis using traditional techniques and for the verification of compounds by mass spectrometry coupled to electrospray HPLC-DAD-ESI(+)-MS/MS (microTOF-QII) (ESI-MS). To evaluate the antibacterial action, the inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were verified. The results verified the presence of terpenes, glycosylated flavonoids, aglicone flavonoids, triterpenes, tannins and the spectrometry identified 13 chemical superclasses with 88 compounds. The extract showed antimicrobial activity against strains of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis, proving to be a promising option in the treatment of the disease.

Keywords: Melaleuca; Mastitis; Metabolites; Antimicrobial.

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma inflamação da glândula mamária de vacas leiteiras causada principalmente por bactérias patogênicas além de outros agentes infecciosos como fungos, vírus e parasitas presentes no ambiente da vaca (ESSA *et al.*, 2023). A doença é a mais frequente que afeta a produção de leite e compromete sua qualidade (AUSTREGÉSILO-FILHO *et al.*, 2022), é contagiosa nos rebanhos e onera a produção e a indústria de laticínios (LOPES *et al.*, 2018).

A doença pode ser transmitida diretamente de animal para animal, principalmente durante a ordenha, e é causada por bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (ACOSTA *et al.*, 2016). Já a outra forma de transmissão é causada por microrganismos presentes no ambiente da vaca, como *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis* (CALIMAN *et al.*, 2023).

Alta variação é observada na frequência dos patógenos da mastite entre os rebanhos e os locais. Estreptococos ambientais e coliformes as bactérias parecem ser os mais prevalentes causadores de mastite clínica, seguido por *Staphylococcus aureus*. As infecções por *S. aureus* são de difícil controle e costumam causar mastite subclínica, clínica e crônica (LI *et al.*, 2017). Esse patógeno tornou-se resistente a múltiplas drogas, facilitando a sua infiltração no sistema imunológico do hospedeiro (ASGHAR, 2014)

Possivelmente, a utilização descontrolada de antibióticos sem orientação do profissional veterinário pode ocasionar a seleção de microrganismos resistentes, gerando um entrave para o sistema de produção do leite. Dessa forma, é possível que esses agentes venham a ser responsáveis pelo desenvolvimento de mastites crônicas (ARCANJO *et al.*, 2017). Martin (2011) enuncia que os resíduos desses antibióticos podem provocar problemas de saúde tanto nos animais quanto nos seres humanos.

O tratamento convencional da mastite baseia-se no uso de antibióticos, porém, é crescente o interesse em alternativas terapêuticas como a fitoterapia, que pode ser utilizada como coadjuvante ou até mesmo substituir o uso de antibióticos.

Um estudo realizado por Nader *et al.* (2010) avaliou a eficácia da fitoterapia em vacas leiteiras com mastite. Os resultados indicaram que o tratamento foi capaz de reduzir a suscetibilidade da glândula mamária à infecção,

além de algumas plantas apresentarem potencial antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante.

Mendonça *et al.* (2021) também utilizaram a fitoterapia como tratamento da mastite bovina e Silveira *et al.* (2023) observaram que a utilização de extratos de plantas, apresentou atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante, contribuindo para a diminuição da incidência de mastite e melhoria da saúde do animal.

Hemaiswarya *et al.* (2008), Langeveld *et al.* (2014) e Magi *et al.* (2015) realizaram estudos relacionando a potencialidade dos compostos fitoquímicos e a possibilidade de reduzir o uso de antibióticos convencionais. Austregésilo-Filho *et al.* (2022b) enuncia que estudos sobre a eficácia de espécies do gênero *Melaleuca* (Myrtaceae) contra bactérias causadoras de mastite, têm se concentrado nos componentes químicos do óleo essencial.

Desta forma, o presente trabalho realizou a avaliação fitoquímica e atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) frente a isolados causadores da Mastite Bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

No campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE, foram coletadas sete (7) amostras da planta em floração. Este material foi prensado e encaminhado ao Herbário Vasconcelos Sobrinho/UFRPE, para herborização. Duplicatas foram enviadas para outras Instituições de Pesquisa e confirmadas as identificações por especialistas, as exsiccatas foram acondicionadas no Herbário da UFRPE registradas com nº 56001 e nº 56002.

No que diz respeito a elaboração do extrato bruto hidroalcoólico da folha de *Melaleuca leucadendra*, o método de extração compreendeu na maceração e extração por solvente a frio. O extrato foi preparado a partir de folhas desidratadas em estufa de ar circulante (35-40°), após a desidratação o material foi pulverizado e acondicionado em extrator e adicionado volume de solvente hidroalcoólico a 70% suficiente para a homogeneização da mistura e completa imersão no solvente. A mistura foi mantida no extrator por um período de 72 horas, sendo posteriormente filtrada e submetida a um evaporador rotatório sob pressão reduzida, aquecido entre 30-45 °C, sob agitação, a 120 rotações por minuto (RPM).

A partir do extrato bruto, foram realizados testes nos infusos para averiguar a existência de metabólitos secundários relevantes como: taninos (reação de cloreto férrico a 2%), flavonoides (teste de Shinoda), alcaloides (reação de Dragendorff e Mayer), terpenos e esteroides (reação de Liebermann-Buchard) e saponina pelo teste do índice de espuma. Foram efetuadas análises cromatográficas utilizando placas de gel de sílica G. (Merck) com e sem impregnação de fluorescência sódica 0,02%(Sigma), além de papel Whatman 3MM. As fases móveis selecionadas foram baseadas nas classes de substâncias testadas, de acordo com as técnicas tradicionais (COSTA, 2001; MARKHAM, 1982; WAGNER e BLADT, 1996; HARBONE, 1988).

Para a determinação dos compostos presentes no extrato foi realizado procedimento por espectrometria de massas acoplada a eletrosplay HPLC-DAD-ESI(+)-MS/MS (micrOTOF-QII) (ESI-MS), segundo métodos utilizados por Moraes e Lago (2003) e Wu *et al.* (2020), permitindo a análise de uma ampla faixa de compostos da planta a partir dos intervalos de massa específicos e suas estruturas moleculares, o que garantiu alta seletividade, sensibilidade e conhecimento de sua composição química.

Na avaliação da sensibilidade ao extrato foram utilizados isolados da bacterioteca do Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, as amostras referência foram: *Escherichia coli* ATCC 25929, *Escherichia coli* ATCC 33456, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, além de 20 amostras de *Staphylococcus aureus* (identificação 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 17, 23, 27, 50, 62, 63, 64, 75, 96, 119, 120, 125 e 195) coletados em diferentes animais com mastite bovina.

Para verificar a eficácia antibacteriana, utilizou-se o método de microdiluição em caldo, utilizando placas de microtitulação de 96 poços (K12-096, KASVI, CH), conforme descrito por Abu-Melha *et al.* (2019), seguindo as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Nos testes da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico a concentração inibitória mínima (CIM) foi uma medida para determinar a menor quantidade do extrato necessária para inibir o crescimento das amostras e a concentração bactericida mínima (MBC) avaliou a eficácia na eliminação completa das bactérias seguindo os métodos propostos por Cos *et al.* (2006) e Thomas *et al.* (2015). As densidades ópticas foram medidas por espectrofotometria a 600 nm e uma curva de crescimento foi construída após medições em 0 h e 12 h.

RESULTADOS

O perfil dos compostos metabólitos do extrato da folha de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) mostrou a presença de terpenos, flavonoides glicosilados, flavonoides aglicona, triterpenos e tanino, na mesma amostra não foram identificados saponina, alcaloides e cumarina (tabela 1).

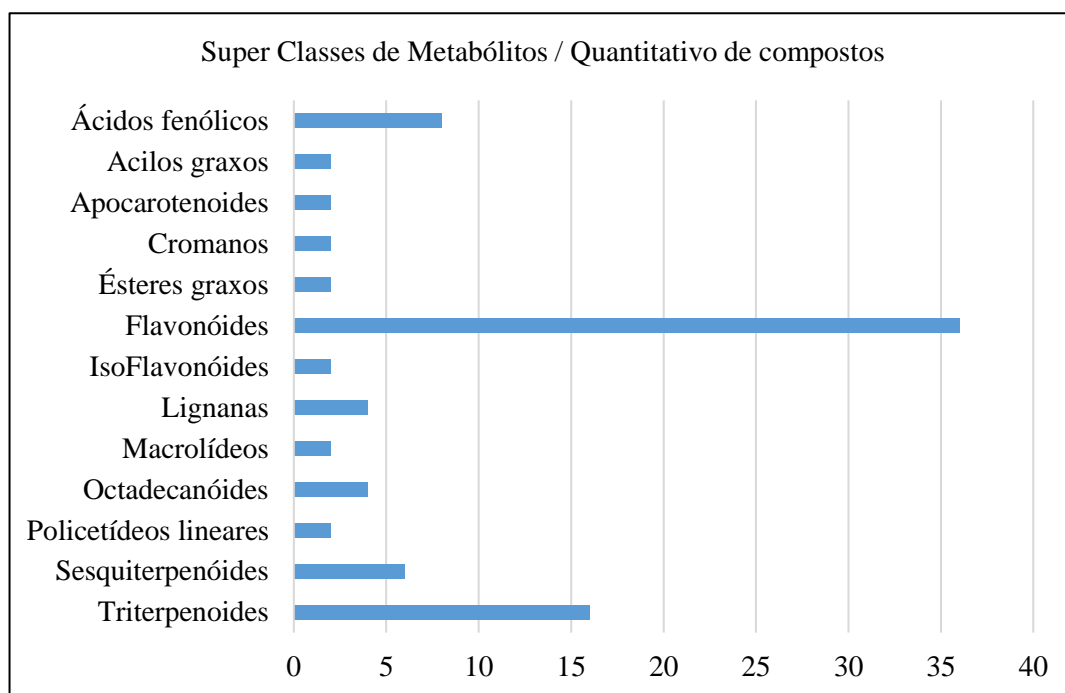
Tabela 1 - Relação dos compostos metabólitos secundários presentes no extrato da folha de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae).

Classes de Metabólitos	
Saponina	-
Alcaloide	-
Cumarina	-
Terpenos	+
Flavonoides Glicosilados	+
Flavonoides Aglicona	+
Triterpenos	+
Tanino	+

- : ausência, + : presença
 Fonte: Os autores (2023)

A análise da HPLC-DAD-ESI(+)-MS/MS (microTOF-QII) identificou nas anotações presentes 13 super classes químicas de metabólitos presente no extrato da folha de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae). A figura 1 apresenta as respectivas abundâncias dessas moléculas. Essas classes são as mais abundantes dentre os compostos anotados na rede molecular tendo apresentado 88 compostos metabólitos.

Figura 1 – Super Classes dos metabólitos e os respectivos quantitativos de compostos do extrato da folha da *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) identificados por HPLC-DAD-ESI(+)-MS/MS (microTOF-QII).



Fonte: os autores (2023)

Em relação às amostras de *Escherichia coli* (ATCC 25929 e ATCC 33456), foi observado que em nenhuma das concentrações testadas resultou em valores de MIC ou MBC, indicando que o extrato bruto da planta não apresentou atividade inibitória nem bactericida específica contra essas cepas. No entanto, as amostras de *Staphylococcus aureus*, foram obtidos resultados significativos, a amostra ATCC 25923 apresentou um MIC de 125 µg/ml e a MBC observada foi de 500 µg/ml. Por sua vez, a amostra ATCC 29213 demonstrou uma maior sensibilidade ao extrato bruto da planta com o MIC de 31,25 µg/ml. No entanto, a MBC foi igual em ambas as amostras (500 µg/ml) (Tabela 2)

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) do extrato da folha de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) contra isolados de *Escherichia coli* (ATCC 25929 e ATCC 33456) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e ATCC 29213).

Isolados	Microdiluição Extrato (µg/mL)										
	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25929	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 33456	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+		+	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	+	+	+		+	+	+	+	-	-	-

O valor do MIC é indicado pela linha preta vertical e o valor do MBC é indicado pelo símbolo negativo na área cinza. Fonte: os autores (2023).

Sobre as amostras de *Staphylococcus aureus*, as cepas 50, 96, 119, 125 e 195 não apresentaram atividade de concentração inibitória mínima, destacando-se a amostra 50 com resistência múltipla, já as amostras 96, 119, 125 e 195 obtiveram valores de MIC de 31,35; 62,5; 125; e 62,5 µg/ml, respectivamente. Sobre o restante das amostras, as 1 e 2 tiveram MICs de 3,91 e 7,81 µg/ml, as 4, 13, 14 e 17 com MICs acima de 15,63 µg/ml e as amostras 23, 62, 63, 64, 75 e 120 foram evidenciados MICs superiores a 31,25. Quanto as amostras com resultado de MBC, destacou-se a amostra 2 apresentando valor igual ao MIC de 3,91 µg/ml, as restantes ocorreram resultados que variaram de 31,25 a 1000 µg/ml (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) do extrato da folha de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) contra isolados de 29 amostras de *Staphylococcus aureus* (identificação 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 17, 23, 27, 50, 62, 63, 64, 75, 96, 119, 120, 125 e 195) coletados em diferentes animais com mastite bovina.

ISOLADOS	Microdiluição Extrato (µg/mL)									
	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 13	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 14	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 15	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 17	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 23	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 27	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 62	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 63	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 64	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 75	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 119	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 120	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 195	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

O valor do MIC é indicado pela linha preta vertical e o valor do MBC é indicado pelo símbolo negativo na área cinza. Fonte: os autores (2023)

DISCUSSÃO

A família Myrtaceae é reconhecida por suas propriedades medicinais e aromáticas, o gênero *Melaleuca* abriga espécies amplamente utilizadas na medicina tradicional. Seu perfil fitoquímico e antimicrobiano tem despertado grande interesse científico devido ao potencial terapêutico que essas plantas podem oferecer (CARSON *et al.*, 2006; HAMMER *et al.*, 1999; SCHNEIDER e KORBES, 2022).

A espécie *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) possui vários metabólitos secundários, dentre eles: terpenos, flavonoides glicosilados, flavonoides aglicona, triterpenos e taninos entre outros. Esses compostos têm mostrado uma variedade de atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas em vários estudos (SILVA *et al.*, 2020; SHAH *et al.* 2013, RINI *et al.* 2012).

Os metabólitos secundários encontrados nas folhas de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) têm sido associados a diversas atividades biológicas. Santos & Rodrigues, (2017) enunciam o potencial dos flavonoides como alternativa de atividade anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, antioxidante e hormonal. Alves & Moreira, (2021), citam que esses compostos apresentam uma considerável atividade inibitória contra diversas cepas de bactérias causadoras de mastite bovina, incluindo *Staphylococcus aureus*. Em consequência Bustanmante *et al.* (2010) ao investigaram o potencial antimicrobiano e fitoquímico frente a bactérias Gran positivas, Gran negativas e fungos citando a presença de flavonoides como metabólito presente na amostra.

Além dos flavonoides os triterpenos são uma classe de compostos naturais também encontrados em *Melaleuca leucadendra* e têm sido relatados por suas diversas propriedades, incluindo atividade antimicrobiana. Silva *et al.* (2020b) destacam várias citações em sua revisão sobre os triterpenos e suas bioatividades como: anti-inflamatória antimicrobiana, antidiapogênica e antinoceptiva.

Os metabólitos ácidos fenólicos, e outros metabólitos secundários são compostos bioativos encontrados em plantas com propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias.

De acordo com um estudo apresentado por Vizzoto *et al.* (2010), foi observado que os metabólitos ácidos fenólicos são eficazes contra bactérias e

apresentam grande importância na proteção contra fatores bióticos e abióticos diversos.

Embora vários autores testem compostos naturais como alternativas aos antimicrobianos, ainda serão necessários mais estudos científicos relevantes. A maioria das pesquisas menciona esses compostos em apenas um estudo, com ensaios clínicos escassos ou com dados limitados de eficácia. Lopes *et al.* (2020) frisa que é necessário realizar mais estudos sobre os componentes principais metabólitos e seu impacto na mastite bovina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise fitoquímica revelou a presença de vários metabólitos na planta *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae). Esses metabólitos incluem compostos fenólicos, terpenoides, flavonoides e outros compostos secundários. A identificação desses metabólitos é importante, pois eles podem estar relacionados às propriedades antimicrobianas da planta.

Os testes antimicrobianos realizados com o extrato das folhas de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) mostraram resultados promissores. O extrato demonstrou atividade contra os isolados causadores da mastite bovina. Isso indica que os metabólitos presentes na planta podem ter propriedades antimicrobianas eficazes contra esses patógenos.

A mastite bovina é uma doença comum e de grande impacto na indústria leiteira. O desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e prevenção se torna essencial para reduzir as perdas econômicas e garantir a saúde do rebanho. Nesse contexto, o extrato das folhas de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) apresenta potencial como uma opção terapêutica para o controle da mastite bovina, devido à sua atividade antimicrobiana.

Apesar dos resultados encorajadores desta pesquisa, é importante ressaltar a necessidade de estudos adicionais para explorar completamente o potencial terapêutico da *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) no tratamento da mastite bovina. Estudos futuros podem se concentrar na identificação e isolamento dos compostos ativos presentes no extrato, bem como na realização de ensaios de eficácia *in vivo* para avaliar a segurança e a eficácia do extrato em condições reais.

Esta pesquisa contribui para o campo da fitoterapia veterinária, fornecendo evidências científicas sobre as propriedades antimicrobianas da *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) contra isolados causadores da mastite bovina. A incorporação de extratos vegetais na prática veterinária pode oferecer uma alternativa viável aos antibióticos convencionais, reduzindo o uso excessivo de antibióticos e a resistência antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

ABU-MELHA, S.; EDREES, M. M.; SALEM, H. H.; KHEDER, N. A.; GOMHA, S. M.; ABDELAZIZ, M. R. Synthesis and biological evaluation of some novel thiazolebased heterocycles as potential anticancer and antimicrobial agents. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 1 -25, 2019.

ALVES, T. V.; MOREIRA, M. A. S. Fatores de risco para mastite bovina: tratamento convencional e ação de compostos extraídos de plantas. **UNICIÊNCIAS**. V. 25, n. 1, p. 20-25. 2021 DOI: 10.17921/1415-5141.2020v25n1p20-25. 2021.

ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G. D.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JUNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36(7), 565-573. 2016.

ASGHAR, A. H. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from tertiary care hospitals. **Pak J Med Sci**, v. 30, n. 4, 2014.

ARCANJO, M.; HERBERT, A. OLIVEIRA, P. C. S.; MOREIRA, L. C. JAYME, C. G.; SOARES, N. A.; OLIVEIRA, A. R.; PEREIRA, A. K.; NOGUEIRA, M. A. R. Programa dos seis pontos de controle da mastite em rebanhos leiteiros. **GI. Sci Technol**, Rio Verde, v.10, n. 01, p.78 – 88, jan/abr. 2017.

AUSTREGÉSILO-FILHO, P. T.; MOURA, G. J. B.; OLIVEIRA, G. G.; PEREIRA JR. J. A. S.; MOTA, R. A. M. Atividade antimicrobiana de *Melaleuca* spp. (Myrtaceae) frente a isolados bacterianos causadoras da mastite bovina: uma análise cienciométrica. **Conjecturas**, v. 22, n. 18, p. 1012-1024, 2022.

AUSTREGÉSILO-FILHO, P. T.; TSCHA, M. C.; FARIAS, E. T. N.; OLIVEIRA, G. G.; PEREIRA JR, J. A. S.; MOTA, R. A. Phytochemical investigation of hexanic extract of the *Melaleuca leucadendra* (l) l. Myrtaceae. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.8, n.8, p.59651-59658. 2022b

BUSTAMANTE, K. G. L.; LIMA, A. D. F.; SOARES, M. L.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; BARA, M. T. F. ; PIMENTA, F. C. ; PAULA, J. R.

Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae. **Rev. bras. plantas med.** V.12, n, 3. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000300012>. 2010.

CALIMAN, M. F.; GASPAROTTO, P. H. G.; RIBEIRO, L. F. Principais impactos da mastite bovina: Revisão de literatura. **Getec**, V.12, n.37, p.91-102. 2023.

CARSON, C. F.; HAMMER, T. V.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 607-625, 2006.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 29, n. 2, p. 112, 2018.

COS, P.; VIETINCK, A. J.; MAES, L.; BERGHE, D. V. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J. Heterocycl. Chem*, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 3.

ESSA, B.; AL-SHARIF, M.; ABDO, M.; FERICEAN, L.; ATEYA, A. New Insights on Nucleotide Sequence Variants and mRNA Levels of Candidate Genes Assessing Resistance/Susceptibility to Mastitis in Holstein and Montbéliarde Dairy Cows. **Journals Veterinary Sciences**. V. 10. Issue 1. 10.3390/vetsci10010035. 2023.

HAMMER, K.A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x. 1999.

HARBONE, J. B. **Textbook of phytochemical methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. London: Chapman and Hall. p. 21-72. 1998.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639–652, doi: 10.1016/j.phymed.2008.06.008. 2008.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J. A.; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 40, p. 76–94, 2014.

LI, T.; LU, H.; WANG, X.; GAO, Q.; DAI, Y.; SHANG, J. Molecular Characteristics of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis between

2014 and 2015. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 7, 2017.

LOPES, T. S.; FONTOURA, P. S.; OLIVEIRA, F. A.; RIZZO, F. A.; SILVEIRA, S.; STRECK, A. F. Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis,

Research in Veterinary Science, V. 131. p. 186-193.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>. 2020.

LOPES, B. C.; MANZI, M. P.; LANGONI, H. Etiologia das mastites: pesquisa de micro-organismos da classe Mollicutes. **Vet. e Zootec.** 25(2): 173-179. jun.; 2018.

MAGI, G.; MARINI, E.; FACINELLI, B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. **Front. Microbiol.**, v. 6, 2015.

MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoids identification. London, **Academic Press**. 1982.

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antibióticos em leite – Uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 80-87, 2011.

MENDONÇA, A. T.; CARVALHO, G. A.; INÁCIO, M. C. P; PEREIRA, M. A. Avaliação antimicrobiana da eficácia dos extratos hidroalcoólicos da pitangueira e da goiabeira, in vitro, contra *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. **Rev Augustus**. 27(54):59–77. 2021.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por “ Electrospray aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Quim. Nova**, V. 26, n.. 4, 556-563. 2003.

NADER, T. T.; COPPEDE, J. S.; AMARAL, L. A.; FACCHIN, A. L.; PEREIRA, A. M. S.; FERREIRA, L. M. Avaliação *in vitro* da eficácia de extratos de plantas medicinais do cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolado de diferentes fontes de propriedades leiteira. **Arq. Inst. Biol.** 77 (3). 2010.

RINI, P.; OHTANI, Y.; ICHIURA, H. Antioxidant, anti-hyaluronidase and antifungal activities of *Melaleuca leucadendron* Linn. leaf oils. **Journal of wood science**, v. 58, n. 5, p. 429-436, 2012.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão Macapá, **Estação Científica**. v. 7, n. 3, p. 29-35, set./dez. 2017.

SCHNEIDER, T. & KÖRBES, J. Efeitos terapêuticos do óleo de *Melaleuca*. **Reviva**. V. 1. N. 2. 2022.

SHAH, G.; CHAWLA, A.; BAGHEL, U. S.; RADHAR, S.; SINGH, P.S. Pharmacognostic standardization of leaves of *Melaleuca leucadendron*. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, n. 4, p. 143-148, 2013.

SILVA, L. S. B.; PERASOLIA, F. B.; CARVALHO, K. V.; VIEIRA, K. M. V.; LOPES, M. T. P. L.; SOUZA, G. H. B. S.; SANTOS, O. D. H. S.; FREITAS, K. M. *Melaleuca leucadendron* (L.) L. flower extract exhibits antioxidant and photoprotective activities in human keratinocytes exposed to ultravioleta B radiation. *Free Radical Biology and Medicine*. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.022. 2020.

SILVA, F. C. O.; FERREIRA, M. K. A.; SILVA, A. W.; MATOS, M. G. C.; MAGALHÃES, F. E. A.; SILVA, P. T.; BANDEIRA, P. N.; MENEZES, J. E. S. A.; SANTOS, H. S. Bioatividades de Triterpenos Isolados de Plantas: Uma Breve Revisão. *Rev. Virtual Quim.* V. 12, n. 1, 234-247. DOI: 10.21577/1984-6835.20200018. 2020b.

SILVEIRA, A. V. B. A.; BUENO, F. A. ZAIDEN, L.; VENTURA, G. F.; SOUZA, C. M.; STELLA, A. E. Sensibilidade de bactérias causadoras de mastite bovina a extratos de plantas nativas do cerrado. **Veterinária e Zootecnia**. V. 30. 2023.

THOMAS, V.; JONG, A.; MOYAERT, H.; SIMJEE, S.; GARCH, F. E.; MORRISSEY, I.; MARION, H.; VALLÉ, M. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 46, n. 1, p. 13-20, 2015.

VIZOTTO, M.; KROLOW A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 16 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316). 2010.

WU, L.; WU, W., CAI, Y.; LI, C.; WANG, L. HPLC fingerprinting-based multivariate analysis of phenolic compounds in mango leaves varieties: Correlation to their antioxidant activity and in silico α -glucosidase inhibitory ability, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, V. 191, doi.org/10.1016/j.jpba. 2020.

WAGNER, H., BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. New York, **Springer**. 1996.

8 CAPÍTULO 4

Phytochemical investigation of hexanic extract of the *Melaleuca leucadendra* (L) I. Myrtaceae (Publicado em Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.8, n.8, p.59651-59658. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n8-310> . 2022)

ABSTRACT

Studies on the effectiveness of species of the genus *Melaleuca* (Myrtaceae) against mastitis-causing bacteria, particularly *Staphylococcus aureus*, have focused on the chemical components of the essential oil. The goal of this work was to use GC-MS analysis to characterize the phytochemical composition of the hexane extract from *Melaleuca leucadendra* (L) L. leaves. There was evidence of 37 secondary metabolites, including 2-Hexadecen-1-ol, Nerolidol B (Cis or Trans), Heneicosan, Vitamin E, 3, 7, 11, and 15-Tetramethyl-, and [R-[R*,R*-(E)]]. Squalene, Cyclopropanemethanol, Gamma-Sitosterol, (-)-Caryophyllene Oxide, and Neophytadiene. The plant *Melaleuca leucadendra* (L) L. can be regarded as a source of nonpolar compounds with promise for the treatment of mastitis because of the significance and the wide range of biological activities documented in the literature on the compounds found in this study.

Keywords: Myrtaceae, *Melaleuca leucadendra*, mastitis, hexanic extract, GC-MS.

RESUMO

Estudos sobre a eficácia de espécies do gênero *Melaleuca* (Myrtaceae) contra bactérias causadoras de mastite, principalmente *Staphylococcus aureus*, têm se concentrado nos componentes químicos do óleo essencial. O objetivo deste trabalho foi utilizar a análise GC-MS para caracterizar a composição fitoquímica do extrato hexânico das folhas de *Melaleuca leucadendra* (L) L.. Houve evidência de 37 metabólitos secundários, incluindo 2-Hexadecen-1-ol, Nerolidol B (Cis ou Trans), Heneicosan, Vitamina E, 3, 7, 11 e 15 -Tetrametil-, e [R-[R*, RÉ]]. Esqualeno, Ciclopropanometanol, Gama-Sitosterol, Óxido de (-)-Cariofileno e Neofitadieno. A planta *Melaleuca leucadendra* (L) L. pode ser considerada uma fonte de compostos apolares promissores para o tratamento da mastite devido à importância e ampla gama de atividades biológicas documentadas na literatura sobre os compostos encontrados neste estudo.

Palavras-chave: Myrtaceae, *Melaleuca leucadendra*, mastite, extrato hexânico, CG-EM.

INTRODUCTION

The genus *Melaleuca* belongs to the Myrtaceae family, native to Australia and the Indian Ocean Islands,¹ and has been used in the treatment of infections by *Staphylococcus aureus*, the main etiologic agent of mastitis.²

Dairy production in Brazil represents a large portion of agricultural production and mastitis is responsible for considerable losses in this productive sector, mainly with annual expenses with antibiotics due to the emergence of multidrug-resistant strains.²

Many reports on activity against *S. aureus* of extracts and oils of *Melaleuca alternifolia* (L) L. are found in the literature, however *M. leucadendra* is poorly studied for this purpose and in relation to chemical compounds of the nonpolar fraction that may represent a source of compounds with therapeutic properties.³ Therefore, a more comprehensive understanding of the nonpolar components of *Melaleuca* spp., both volatile and fixed fractions, is required.

OBJECTIVE

The aim of this study was the phytochemical characterization of hexanic extract from the leaves of *Melaleuca leucadendra* (L) L. using analysis by GC-MS and identify substances with promise for treating mastitis.

MATERIALS AND METHODS

BOTANICAL MATERIAL

Melaleuca leucadendra was collected in the Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife campus, state of Pernambuco, Northeast of Brazil (8°00'59.8"S 34°56'44.3"W). Identification and deposition at PEUFR-Hebário Professor Vascelos Sobrinho/UFRPE, under PEUFR- n. 56001 and PEUFR-n.56002.

HEXANIC EXTRACT OBTENTION

Leaves of *Melaleuca leucadendra* were ground in a Willey mill and then 40 mg of the material was subjected to extraction using 2 mL of hexano (HPLC

grade - Merck®) for 30 minutes in an ultrasonic bath (Unique brand, model USC-1400). The samples were evaporated in an N₂ gas dryer and 2 mg of the extracts were dissolved in 2 mL of hexano for analysis with gas chromatography coupled to mass spectroscopy (GC-MS).

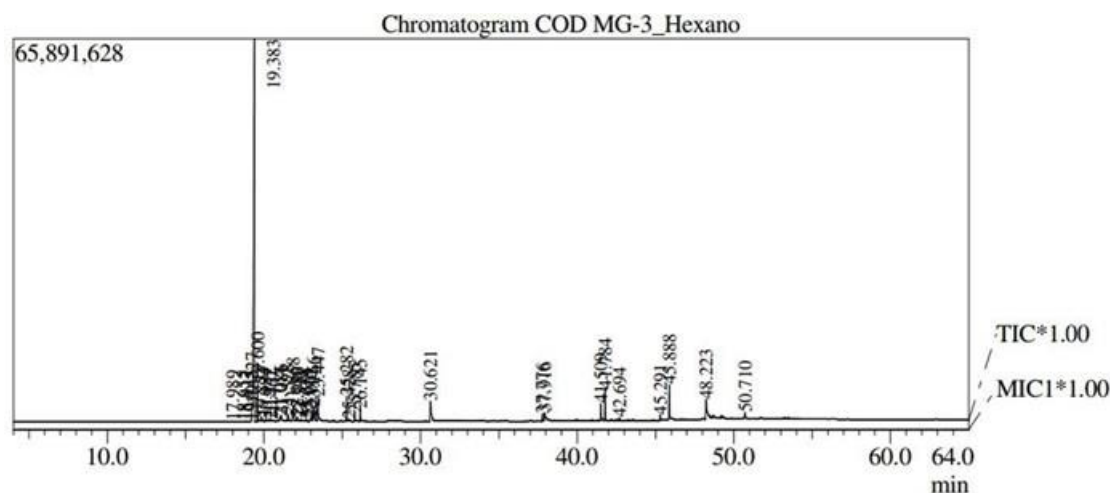
CG-MS ANALYSIS

The hexanic extracts from the leaves were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using a Shimadzu GCMS model QP2010 instrument in a system operated by electron impact (70 eV) and the injector temperature was set at 260 °C with a split ratio of 1:5. A DB5-MS column [30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm (5% cross-linked phenylmethylpolysiloxane)] was used (Agilent J & W GC Columns), with helium as the carrier gas, a column flow of 1.3 mL/min, an injection volume of 1 μL, the injector temperature at 260 °C and pressure of 97.4 kPa. A mixture of (C₉-C₂₀, C₂₁-C₄₀) linear hydrocarbons was injected under the same conditions to identify the components. The spectra obtained were compared with the equipment database (FFNSC1.3.lib, WILEY7.LIB, NIST08s.LIB, MY LIBRARY.lib).

RESULTS AN DISCUSSION

In the GC-MS chromatogram (Fig. 1), 37 peaks were found, corresponding to 37 chemical compounds (Tab. 1), that contain antipyretic, analgesic, anti-inflammatory, antibacterial, and antioxidant properties.^{1,4} The larger areas were: Nerolidol B (Cis or Trans) (55.84%), that enhances antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*,⁵ antileishmanial Activity;⁶ Heneicosane (42,69%), that possesses antimicrobial activity;⁷ Vitamin E (4.44%), a powerful antioxidant;^{8,9,10} 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]- (4.53%), with anticancer activity reports;^{11,12,13} gamma-sitosterol (3.79%), It has anti-diabetic properties;¹⁴ Cyclopropanemethanol (3.51%), anti-amoebic agents¹⁵ and features of anesthetic;¹⁶ Squalene (3.36%), It has been shown to have antioxidative action, anti-neurodegenerative disease activity, immune system potentiation, anti-hepatic steatosis activity, and antimutagenic activity;^{17,18} (-)-Caryophyllene oxide (3.21%), which has anti-inflammatory and analgesic properties and is effective against onychomycosis^{19,20} and Neophytadiene (2.79%), which exhibits antibacterial properties.^{21, 22}

Fig. 1 - GC-MS chromatogram of the hexanic extract from the leaves of *Melaleuca leucadendra* (L.) L.



Source: Prepared by the authors

Tab. 1- Compounds identified in the hexanic extract from the leaves of *Melaleuca leucadendra* (L.) L. by GC-MS

Peak	Retention time (min.)	Area%	Compound
1	17.989	0.04	Farnesol
2	18.655	0.06	2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl (MW222) C ₁₅ H ₂₆ O
3	18.817	0.10	Bisabolol oxide A - (MW238) C ₁₅ H ₂₆ O ₂
4	19.145	0.01	Epoxy-inalooloxide (MW186) C ₁₀ H ₁₈ O ₃
5	19.227	0.90	Citronellylacetone - (MW196) C ₁₃ H ₂₄ O
6	19.383	55.84	Nerolidol B (Cis or Trans) (MW222) C ₁₅ H ₂₆ O
7	19.600	3.51	Cyclopropanemethanol, .alpha.,2-dimethyl-2-(4-methyl-3 (MW182) C ₁₂ H ₂₂ O
8	19.854	0.59	(-)-Caryophyllene oxide (MW220) C ₁₅ H ₂₄ O
9	20.084	0.15	Veridiflorol (MW222) C ₁₅ H ₂₆ O
10	20.372	0.20	Nerolidol-Epoxyacetate (MW296) C ₁₇ H ₂₈ O ₄
11	20.461	0.10	Humulene epoxide II (MW220) C ₁₅ H ₂₄ O
12	21.014	0.46	Citronellylacetone (MW196) C ₁₃ H ₂₄ O
13	21.086	0.72	alpha.-Bisabolol (MW222) C ₁₅ H ₂₆ O
14	21.528	0.92	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl- (MW222) C ₁₅ H ₂₆ O
15	21.858	2.29	(-)-Caryophyllene oxide (MW220) C ₁₅ H ₂₄ O
16	22.089	0.25	alpha.-Bisabolol (MW222) C ₁₅ H ₂₆ O
17	22.136	0.31	alpha.-Bisabolol (MW222) C ₁₅ H ₂₆ O
18	22.321	0.15	Octadecanoic acid, 2-oxo-, methyl ester (MW312) C ₁₉ H ₃₆ O ₃
19	22.679	0.20	2,7-Octadiene-1,6-diol, 2,6-dimethyl- (MW170) C ₁₀ H ₁₈ O ₂
20	22.915	0.23	Nerolidol (MW222) C ₁₅ H ₂₆ O
21	23.002	0.51	(-)-Caryophyllene oxide (MW220) C ₁₅ H ₂₄ O
22	23.166	2.37	Nerolidol A (Cis or Trans) (MW222) C ₁₅ H ₂₆ O
23	23.447	3.21	(-)-Caryophyllene oxide (MW220) C ₁₅ H ₂₄ O
24	25.282	2.79	Neophytadiene (MW278) C ₂₀ H ₃₈
25	25.428	0.21	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl- ((MW268) C ₁₈ H ₃₆ O
26	25.785	0.92	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol (Phytol Trans) (MW296) C ₂₀ H ₄₀ O
27	26.145	1.23	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]- (MW296) C ₂₀ H ₄₀ O

28	30.621	4.53	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]-(Phytol) (MW296) C ₂₀ H ₄₀ O
29	37.776	0.85	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester (MW390) C ₂₄ H ₃₈ O ₄
30	37.916	1.40	Flemichapparin (MW270) C ₁₆ H ₁₄ O ₄
31	41.509	1.69	Decanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester (MW426) C ₂₆ H ₅₀ O ₄
32	41.784	3.36	Squalene (MW410) C ₃₀ H ₅₀
33	42.694	42.69	Heneicosane (MW296) C ₂₁ H ₄₄
34	45.291	0.60	Hexacosane (MW366) C ₂₆ H ₅₄
35	45.888	4.44	Vitamin E (MW430) C ₂₉ H ₅₀ O ₂
36	48.223	3.79	gamma.-Sitosterol (MW414) C ₂₉ H ₅₀ O
37	50.710	0.78	Phytol acetate (MW338) C ₂₂ H ₄₂ O ₂

Source: Prepared by the authors

CONCLUSIONS

In the present study, chemical constituents that have activity against *Staphylococcus aureus* proven in the literature were evidenced, such as: Nerolidol B (Cis or Trans), Heneicosane, Neophytadiene, among others. Thus, the results will serve as a basis for future studies aimed at biomonitored fractionation for the isolation of apolar compounds effective in the treatment of mastitis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Centro Universitário FACOL - UNIFACOL and Departamento de Medicina Veterinária of the UFRPE for their support in carrying out this work. As well as Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) from Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo for carrying out the GC-MS analysis.

REFERENCES

- PATRAMURTI, C.; AMIN, R.; NASTITI, C.M.R.R.; HARIONO, M. A Review on the Potency of *Melaleuca leucadendron* leaves solid waste in wood preservation and its *in silico* prediction upon biological activities. **International Journal of Forestry Research**, ID: 8885259, p. 1–13, 2020. doi: <https://doi.org/10.1155/2020/8885259>
- BELONI, M. V.; M., A. S.; OLIVEIRA, L. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente a agentes causadores da mastite bovina**. In *Tópicos Especiais Em Ciência Animal IX*, p. 262, 2020.

3. WINSKA, K.; MACZKA, W.; ŁYCZKO, J.; GRABARCZYK, M.; CZUBASZEK, A.; SUMMY, A. Essential Oils as Antimicrobial Agents Myth or Real Alternative?. **Molecules**, v. 24, n. 11, p.1-22, 2019. doi: 10.3390/molecules24112130. PMID: 31195752
4. SOHOO, A. B.; KAMBOH, A.A.; LEGHARI, R.A.; ABRO, S.H.; KOREJO, N.A.; SOOMRO, J. Individual and Combined Antibacterial Activity of plant Essential Oils and Antibiotics Against Bacterial Isolates of Mastitis. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**. v.17, n. 2, p 22-28, 2019.
5. BREHM-STECHER, B. F.; JOHNSON, E.A. Sensitization of Staphylococcus aureus and Escherichia coli to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apertone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.47, n.10. p.3357– 3360, 2003. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3357-3360.2003>
6. ARRUDA, D.C.; D'ALEXANDRI, F.L.; KATZIN, A.M.; ULIANA, S.R.B. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v 49, n.5, p.1679–1687, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1679-1687.2005>
7. VANITHA, V.; VIJAYAKUMAR, S.; NILAVUKKARASI, M.; PUNITHA, V.N.; VIDHYA, E.; PRASEETHA, P.K. Heneicosane—A novel microbicidal bioactive alkane identified from Plumbago zeylanica L. **Industrial Crops & Products**. v. 154, 2020, Article 112748. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112748>
8. SCHNEIDER, Claus. Chemistry and biology of vitamin E. **Molecular Nutrition Food Research**. v. 49, p. 7 – 30, 2005. doi: 10.1002/mnfr.200400049
9. BURTON, G.W. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. **Annual Review of Nutrition**. v.10, p. 357-382, 1990.
10. YAMAUC, R. Vitamin E: Mechanism of its antioxidant activity. **Food Science and Technology. International Tokyo**. V. 3, n. 4, p. 301-309, 1997. Doi: [10.3136/fsti9596t9798.3.301](https://doi.org/10.3136/fsti9596t9798.3.301)
11. FURUMOTO, T.; WANG, R.; OKAZAKI, K.; HASAN, A.F.M.F.; ALI, M.I.; KONDO, A.; FUKUI, H. Antitumor Promoters in Leaves of Jute (Corchorus capsularis and Corchorus olitorius). **Food Science and Technology Research**. v.8, n.3, p 239–243, 2002. doi: <https://doi.org/10.3136/fstr.8.239>
12. SELVAN, P. S.; VELAVAN, S. Analysis of bioactive compounds in methanol extract of Cissus vitifolia leaf using gc-ms technique. **Rasayan journal of chemistry**. v.18, n. 4., p. 443-447, 2015.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise fitoquímica revelou a presença de diversos metabólitos na planta *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae), como compostos fenólicos, terpenoides, flavonoides e outros compostos secundários. A identificação desses metabólitos é de grande importância, uma vez que eles podem estar relacionados às propriedades antimicrobianas da planta, essa diversidade química é extremamente promissora, pois sugere que a planta pode ser uma rica fonte de compostos.

Os testes antimicrobianos realizados com o extrato das folhas de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) apresentaram resultados promissores, demonstrando atividade contra os patógenos causadores da mastite bovina. Esses resultados indicam que os metabólitos presentes na planta podem oferecer propriedades antimicrobianas eficazes contra essa doença, apontando para a possibilidade de novas abordagens terapêuticas para o controle dessa doença de impacto significativo na indústria leiteira.

A mastite bovina é uma doença comum que causa grande impacto na produção de leite. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e prevenção se torna essencial para reduzir as perdas econômicas e garantir a saúde do rebanho. O extrato das folhas de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) mostra-se promissor como uma opção terapêutica para o controle da mastite bovina, devido à sua atividade antimicrobiana contra os patógenos responsáveis por essa enfermidade.

Apesar dos resultados encorajadores dessa pesquisa, é importante destacar a necessidade de estudos adicionais para explorar completamente o potencial terapêutico da *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) no tratamento da mastite bovina. A identificação e isolamento dos compostos ativos presentes no extrato são essenciais para compreender o mecanismo de ação e o espectro de atividade antimicrobiana dessa planta. Além disso, ensaios de eficácia *in vivo* serão importantes para validar a segurança e a eficácia do extrato em condições reais.

Essa pesquisa contribui significativamente para o campo da fitoterapia veterinária, fornecendo evidências científicas sobre as propriedades antimicrobianas da *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) contra *Staphylococcus aureus* causadores da mastite bovina. A utilização de extratos vegetais na prática veterinária pode oferecer uma alternativa viável aos antibióticos convencionais, contribuindo para a redução do uso excessivo de antibióticos e da resistência antimicrobiana.