



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MARIA CAROLINE NORTE

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE CASCA DE NOZ
PECÃ SOB CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE MASTITE
BOVINA: COMPARAÇÃO DE EFICÁCIA SOB DIFERENTES
PARÂMETROS FÍSICO- QUÍMICOS**

REALEZA

2024

MARIA CAROLINE NORTE

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE CASCA DE NOZ
PECÃ SOB CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE MASTITE
BOVINA: COMPARAÇÃO DE EFICÁCIA SOB DIFERENTES
PARÂMETROS FÍSICO- QUÍMICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Medicina Veterinária da Universidade
Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para
obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Dalila Moter Benvegnú

REALEZA

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Norte, Maria Caroline

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE CASCA DE NOZ
PECÃ CONTRA CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE
MASTITE BOVINA: COMPARAÇÃO DE EFICÁCIA SOB DIFERENTES
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS / Maria Caroline Norte. --
2024.

21 f.

Orientadora: Dr.^a Dalila Moter Benvegnú

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina Veterinária, Realeza, PR, 2024.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. extratos de noz-pecã. 3.
solvente. 4. granulometria. 5. método de extração. I.
Benvegnú, Dalila Moter, orient. II. Universidade Federal
da Fronteira Sul. III. Título.

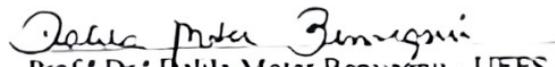
MARIA CAROLINE NORTE

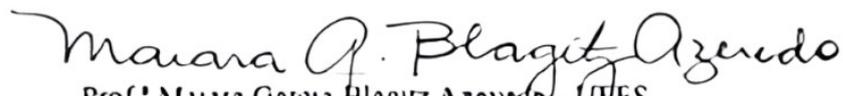
**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE CASCA DE NOZ
PECÃ SOB CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE MASTITE
BOVINA: COMPARAÇÃO DE EFICÁCIA SOB DIFERENTES
PARÂMETROS FÍSICO- QUÍMICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Médico Veterinário.

Este trabalho de conclusão foi defendido e aprovado pela banca em 06/12/2024.

BANCA EXAMINADORA


Prof.ª Dr.ª Dalila Motez Benvenuto - UFFS
Orientadora


Prof.ª Mariana Garcia Blagitz Azevedo - UFFS
Avaliadora


Vitória Karolini Betim Fieldkircher Cass
Avaliadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me dar vida e coragem para seguir em frente, mesmo nos momentos mais sombrios. Ele foi minha luz, sustentando-me e transformando cada desafio em aprendizado e força para vencer batalhas que só consegui superar por sua presença constante.

Aos meus pais, minha eterna gratidão por me darem a vida e sacrificarem tanto para que eu alcançasse este momento. Trabalharam incansavelmente, enfrentando dificuldades para me permitir sonhar. Foram minha fortaleza, oferecendo amor, apoio e ensinamentos que me prepararam para o mundo.

À minha orientadora, professora Dalila, e à minha coorientadora, Bruna, minha admiração e gratidão. Obrigada por acreditarem em mim, pela paciência e pelos ensinamentos que levarei para sempre. Vocês me inspiraram profundamente.

À minha avó Maria, minha segunda mãe, obrigada por seu amor e dedicação ao me criar, para que meus pais pudessem trabalhar. Sua presença, mesmo de longe, moldou quem sou hoje. Também agradeço aos meus avós maternos, vô Egídio e vó Cecilda, e ao meu vô Pedro, que sempre estarão em meu coração, guiando-me espiritualmente.

Às amigas Xaiane, Maevi, Bruna, Juliana, Larissa e Jaine, minha família escolhida, obrigada por estarem comigo nos altos e baixos. Vocês trouxeram apoio, alegria e aprendizado, tornando essa jornada especial.

Ao Bruno, amigo e irmão, obrigada por sua presença constante e por ser meu porto seguro em tantos momentos.

À minha cachorrinha Pandora, por ser minha companheira fiel, trazendo conforto e amor incondicional, mesmo nos dias mais desafiadores.

E ao Andrei, meu namorado, obrigada por chegar no fim da caminhada e estar presente em cada momento. Você é o apoio e o amor que eu precisava, e espero que continuemos celebrando juntos cada conquista.

A todos, meu mais profundo agradecimento por serem parte essencial dessa trajetória.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE CASCA DE NOZ PECÃ CONTRA CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE MASTITE BOVINA: COMPARAÇÃO DE EFICÁCIA SOB DIFERENTES PARÂMETROS FÍSICO- QUÍMICOS

Maria Caroline Norte¹
Dalila Moter Benvegnú²

RESUMO

O Brasil, terceiro maior produtor mundial de leite, registrou um crescimento de 2,1% na produção láctea no terceiro trimestre de 2023, atingindo 24,52 bilhões de litros anuais, conforme dados da Conab. A mastite, infecção comum na bovinocultura leiteira, continua sendo um desafio significativo devido à redução da produtividade e ao aumento de custos. Entre os principais agentes etiológicos da mastite, destaca-se *Staphylococcus aureus*, conhecido por sua resistência a diversos antimicrobianos. Isso destaca a necessidade urgente de alternativas terapêuticas eficazes e sustentáveis. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de extratos hidroalcoólicos e aquosos da casca de noz-pecã (*Carya illinoensis*) contra cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, explorando a influência de variáveis como o tipo de solvente (hidroalcoólico e aquoso), granulometria do material vegetal (pó e tamanho médio de partícula) e diferentes métodos de extração (soxhlet ou infusão). Para isso, foram preparadas as amostras com foco na obtenção de compostos fenólicos e flavonoides, cujas atividades antimicrobianas já haviam sido relatadas na literatura. As cepas bacterianas foram submetidas aos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para determinação da eficácia antimicrobiana dos extratos. Os resultados demonstraram que os extratos hidroalcoólicos apresentaram maior eficiência antimicrobiana, com CIM de até 6,94 µg/mL e CBM proporcionalmente mais baixas, independentemente da granulometria. Em contraste, os extratos aquosos, especialmente os extraídos por cafeteira, apresentaram CIM superiores e menor eficácia. Esses achados indicam que o tipo de solvente utilizado tem um impacto significativo na atividade antimicrobiana, sendo os extratos hidroalcoólicos mais eficientes devido à maior solubilização de compostos bioativos. Este estudo contribui de forma preliminar para o desenvolvimento de alternativas sustentáveis no manejo de infecções bacterianas em animais de produção, destacando o uso de subprodutos agroindustriais como fontes de compostos antimicrobianos naturais.

Palavras-chave: Microorganismos, fitoterapia, resistência antimicrobiana, microbiologia, granulometria, extração.

1 INTRODUÇÃO

A produção de leite no Brasil apresentou um crescimento de 2,1% no terceiro trimestre de 2023 em relação ao mesmo período do ano anterior, atingindo um total de 24,52 bilhões de

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza, e-mail: mariacarolinenorte@gmail.com

²Doutora em Farmacologia pela Universidade Federal de Santa Maria e docente da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza, e-mail: dalila.benvegnu@uffs.edu.br

litros anuais, consolidando o país como o terceiro maior produtor global (Conab, 2024). No entanto, a mastite bovina permanece como um desafio crítico para a indústria leiteira, impactando qualidades na produtividade e aumentando os custos operacionais. Essa condição, caracterizada pela inflamação da glândula mamária, muitas vezes resulta em perdas econômicas importantes, incluindo descarte de leite, custos com medicamentos e serviços veterinários, além de comprometer a qualidade do produto final (Costa *et al.*, 2013; Maiochi *et al.*, 2019).

A mastite pode ser apresentada como clínica, com sinais visíveis de alterações e alterações no leite, ou subclínica, sem manifestações externas, mas associadas à redução na produção e qualidade do leite e aumento da contagem de células somáticas (Busanello *et al.*, 2016; Gasparotto *et al.*, 2016). Dependendo da origem dos microrganismos, também pode ser categorizada em contagiosa, quando a transmissão ocorre principalmente entre o período de ordenha, e ambiental, em que os patógenos estão no ambiente e infectam os animais, especialmente quando há comprometimento imunológico (Ruegg, 2018). Além disso, o uso de antimicrobianos para o tratamento da doença é uma preocupação crescente, devido à presença de resíduos no leite, que afeta a segurança alimentar e os processos industriais (Ferreira *et al.*, 2014; Maiochi *et al.*, 2019).

Staphylococcus aureus é um dos principais patógenos associados à mastite bovina, destacando-se por sua notável resistência aos antimicrobianos convencionais, esse fenômeno é mediado por diversos mecanismos, como a produção de enzimas e a formação de biofilmes (Buldain *et al.*, 2018). Os biofilmes, compostos por uma matriz polimérica, oferecem uma camada protetora para as colônias bacterianas, dificultando a ação dos antibióticos e tornando o tratamento mais desafiador (Buldain *et al.*, 2018; Notcovich *et al.*, 2018). Além disso, o agente tem a capacidade de empregar elementos genéticos móveis, facilitando a disseminação de genes de resistência, o que pode aumentar sua prevalência e complicar ainda mais o controle da infecção (Coombs *et al.*, 2020).

A resistência antimicrobiana é um grave problema de saúde global, com sérias implicações no tratamento de infecções bacterianas, apontado pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2015) devido ao uso inadequado de antimicrobianos como um dos principais responsáveis pela seleção de cepas resistentes, promovendo o surgimento de mecanismos de resistência, como mutações genéticas e a transferência horizontal de genes entre bactérias (Moritz *et al.*, 2016; Bittencourt *et al.*, 2022). Esse processo não apenas compromete a eficácia dos tratamentos, mas também aumenta o risco de transmissão de resistência para outras espécies, incluindo seres humanos e animais (Kang *et al.*, 2024).

Diante da crescente resistência antimicrobiana, novas abordagens terapêuticas são essenciais, e a fitoterapia tem emergido como uma alternativa promissora. Compostos vegetais, como os encontrados na casca da noz-pecã (*Carya illinoensis*), têm demonstrado propriedades antimicrobianas significativas, incluindo a capacidade de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* (Sales *et al.*, 2014;). O uso de extratos naturais de plantas medicinais tem ganhado destaque, principalmente por sua eficácia no combate a infecções resistentes, oferecendo uma alternativa viável e sustentável aos antimicrobianos convencionais (Moura *et al.*, 2020).

Além disso, tais subprodutos são fontes naturais de compostos bioativos e conservantes, e sua utilização não só contribui para o manejo sustentável de resíduos

industriais, mas também apresenta uma solução de baixo custo, impactando positivamente a viabilidade econômica de produtos finais (Caxambu *et al.*, 2015). Nesse contexto, a noz-pecã se destaca como uma alternativa viável, especialmente devido ao aumento de sua produção no Brasil, particularmente na região Sul, onde as plantações vêm crescendo, beneficiadas pela alta demanda e pelos atrativos preços do produto (Boscardin; Costa, 2018).

A noz-pecã (*Carya illinoensis*) é originária dos Estados Unidos e México e pertencente à família Juglandaceae. Destaca-se como uma árvore de grande porte, com tronco retilíneo e copa elíptica, podendo atingir alturas consideráveis. Sua casca e fruto possuem uma abundância de compostos bioativos, como ácidos fenólicos, lipossolúveis, fibras e vitaminas, que conferem propriedades antioxidantes e diversos benefícios à saúde humana (Alasalvar; Salvadó; Ros, 2020; Atanasov *et al.*, 2018). Tais atributos têm incentivado pesquisas sobre o potencial terapêutico do extrato da casca de noz-pecã, abordando tanto sua eficácia quanto sua segurança (Amaral *et al.*, 2019; Arciello *et al.*, 2021; Dórame-Miranda *et al.*, 2021; Leon-Bejarano *et al.*, 2020; Villasante, *et al.* 2020).

A obtenção de compostos bioativos presentes na casca envolve técnicas de separação, que são fundamentais para isolar os metabólitos de interesse. Este processo consiste na transferência seletiva de compostos sólidos para uma fase líquida, geralmente mediada por um solvente (Oliveira *et al.*, 2016). Em procedimentos contínuos, muitas vezes associados a aquecimento, o solvente atua dissolvendo os compostos-alvo, enquanto a matriz sólida é progressivamente esgotada. Nesse contexto, a escolha do solvente é determinante para a eficiência do processo, influenciando diretamente a extração e a qualidade dos compostos obtidos (Santos, 2018).

Nesse processo, o uso de solventes como água, etanol e misturas hidroalcoólicas tem resultados promissores mostrados. O etanol, por exemplo, é exclusivamente reconhecido por seu caráter anfílico, que permite a remoção de substâncias polares e apolares, além de seu ponto de ebulição favorável (78,3°C), facilitando a posterior recuperação do solvente (Martins *et al.*, 2020). Já a água é frequentemente utilizada devido à sua baixa toxicidade e eficácia na proteção de produtos bioativos com potencial antimicrobiano, como flavonoides (Da Silva *et al.*, 2023). Estudos indicam que a mistura hidroalcoólica a 70% apresenta um equilíbrio ideal para a degradação de compostos fenólicos, resultando em maior rendimento e potencial farmacológico (Martins *et al.*, 2020).

Entre os métodos que empregam esses solventes, destaca-se o Soxhlet, uma técnica de remoção contínua baseada em percolação cíclica, desenvolvida em 1879 e amplamente utilizada até os dias atuais. Reconhecido por sua alta eficiência na recuperação de compostos bioativos, o processo permite a reutilização do solvente por meio de rotaevaporador, o que favorece a sustentabilidade e a redução de custos. No entanto, o Soxhlet apresenta algumas desvantagens, como o elevado consumo de energia e o tempo prolongado de remoção, além da limitação de uso em materiais com compostos termolábeis, devido ao aquecimento contínuo do extrato, o que pode comprometer a integridade dessa substância. Apesar das limitações, o Soxhlet permanece como uma técnica de referência no ambiente laboratorial, sendo frequentemente comparado com métodos modernos devido à sua eficácia comprovada e confiabilidade (Sousa; Gasparoti; Paula, 2022).

As infusões de chá e ervas são amplamente consumidas devido à sua diversidade, fragrância, sabor e aos benefícios à saúde que proporcionam, como indicado em diversos estudos (Coz-Bolaños *et al.*, 2018; Ortega-Vidal *et al.*, 2019).

Em busca de alternativas mais práticas, métodos como a extração utilizando cafeteira têm ganhado destaque. Esse processo é realizado de maneira simples, com o uso de solventes como água ou etanol, permitindo a extração de compostos bioativos de forma rápida e com baixo custo, sendo uma opção viável para obtenção de extratos em escalas menores. Embora a eficiência e o controle das condições de extração possam ser limitados, o uso da cafeteira apresenta-se como uma técnica acessível, especialmente para quem não dispõe de equipamentos laboratoriais sofisticados. Estudos indicam que métodos alternativos, como a maceração e a extração por cafeteira, têm se mostrado eficazes, particularmente em condições de extração em pequena escala (GreensyBio, 2023).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de

extratos hidroalcoólicos e aquosos da casca de noz-pecã (*Carya illinoensis*) por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) contra cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina, explorando a influência de variáveis como o tipo de solvente (hidroalcoólico e aquoso), granulometria do material vegetal (pó e tamanho médio de partícula) e diferentes métodos de extração (soxhlet ou infusão), para fins de otimização da eficácia antimicrobiana.

2 METODOLOGIA

2.1 CADASTRO NO SISGEM

O estudo foi registrado no sistema eletrônico do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), ao utilizar o patrimônio genético de microrganismos e obteve o número de cadastro A4262EE.

2.2 INÓCULO

Foram utilizadas 20 cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de casos de mastite bovina, gentilmente cedidas pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). As amostras bacterianas foram identificadas e preservadas em ultrafreezer a -80°C em meio de congelamento composto por caldo triptona de soja enriquecido com 10% de glicerol, armazenadas em microtubos estéreis.

2.3 PREPARO DO EXTRATO BRUTO DA CASCA DE NOZ PECÃ

O preparo do extrato foi realizada no Laboratório de Química Orgânica da UFFS – Campus Realeza, com o objetivo de extrair compostos da casca da noz-pecã, utilizando protocolos descritos por Amaral et al. (2019). Foram testados diferentes métodos de extração, variando a granulometria das cascas e a composição dos solventes, para obter extratos hidroalcoólicos e

aquosos. A metodologia foi organizada em dois grupos principais (grupo 1 e grupo 2) e subdividida em três protocolos de extração.

Inicialmente, as cascas de noz-pecã foram selecionadas por uniformidade visual, lavadas com água corrente e secas em estufa a 40°C por 24 horas. A granulometria das cascas foi ajustada conforme cada protocolo, utilizando diferentes métodos de moagem.

Os experimentos foram divididos inicialmente em dois tipos de extratos, usando diferentes solventes e depois subdivididos em distintos protocolos:

Grupo 1 - Extrato Hidroalcoólico : Utilizou-se uma solução de 50% etanol e 50% água destilada. Foram pesados 40 gramas de casca de noz-pecã para cada 75 mL de água destilada e 75 mL de etanol.

Grupo 2 - Extrato Aquoso : Utilizou-se apenas água destilada como solvente (100%).

Para cada extração, foram pesados 40 gramas de casca para cada 150 mL de água destilada.

Dentro de cada grupo, os extratos foram obtidos usando três protocolos diferentes:

Protocolo 1: O processo de extração foi realizado de forma a maximizar a eficiência e minimizar o consumo de solvente. Para isso, em cada ciclo da operação, o material vegetal foi exposto a solvente renovado, garantindo uma extração mais eficaz. Inicialmente, as cascas foram trituradas manualmente com o auxílio de gral e pistilo até alcançar uma granulometria média uniforme. Em seguida, a extração foi conduzida por 4 horas em um extrator Soxhlet, utilizando solventes aquosos e hidroalcoólicos, resultando em dois tipos distintos de extratos.

Protocolo 2: As cascas foram inicialmente trituradas em um moinho de facas elétrico, equipamento que utiliza lâminas rotativas para reduzir o material a partículas menores, até atingir uma textura de pó moderado. Em seguida, o material foi peneirado em malha nº 3 para garantir uniformidade na granulometria. Após a pesagem do pó obtido, o processo de extração foi conduzido utilizando o extrator Soxhlet por um período de 6 horas. Este método, amplamente utilizado para extrações contínuas, permite a circulação do solvente sobre o material vegetal em ciclos repetidos, garantindo uma maior eficiência na extração de compostos desejados. Foram gerados dois tipos de extratos: aquosos e hidroalcoólicos, adequados para diferentes análises posteriores.

Protocolo 3: Após a moagem das cascas no moinho de facas elétrico, com peneiramento em malha nº 3 para obter uma granulometria uniforme, a extração foi realizada conforme o segundo protocolo, utilizando o método de infusão. Nesse processo, o pó das cascas foi submetido ao calor em uma cafeteira da marca Cadence por um período de 10 minutos, permitindo que os compostos bioativos fossem extraídos de maneira eficiente tanto para os extratos aquosos quanto hidroalcoólicos.

2.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O estudo foi conduzido na Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Realeza, no Laboratório 1 (sala 310), destinado a pesquisas em microbiologia e imunologia e certificado para o nível de biossegurança 2. Esse laboratório é equipado para atender às exigências práticas de estudos com microrganismos, como bactérias, fungos e vírus, além de investigações sobre respostas imunológicas relacionadas a esses agentes. Todo o material utilizado na pesquisa foi esterilizado por autoclavação para evitar contaminação cruzada com outros microrganismos. O extrato estudado não foi autoclavado, a fim de preservar seus compostos bioativos, com função antimicrobianos.

2.4.1 Padronização do incóculo

Inicialmente, 0,01 mL da cultura foi transferido para um tubo contendo 5 mL de caldo Muller Hinton (MH) estéril e incubado em condições aeróbicas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, alíquotas da solução de cada tubo foram gradualmente adicionadas a tubos com 10 mL de solução salina 0,9% estéril, até atingirem a faixa padrão de 0,08 a 0,13 Ångstrom a 625 nm.

Para controle visual e espectrofotométrico, foi preparado um tubo contendo 10 mL de solução salina 0,9% estéril em caldo Muller Hinton (MH), sem a cultura inicial. As amostras foram analisadas utilizando um espectrofotômetro, permitindo a comparação precisa entre as amostras bacterianas e o controle.

2.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Foram adicionados 50 µL do meio de cultura Muller-Hinton em cada poço de uma microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 50 µL dos extratos em triplicata na primeira fileira. A partir dessa mistura, foi realizada uma diluição em série por meio da pipetagem de 50 µL a partir da fileira “A” até a fileira “G”. Ao final da diluição, foram pipetados 10 µL de cada inóculo padronizado aos poços da microplaca, que foi incubada em aerobiose a 37°C por 24 horas para análise dos resultados. Foi realizado controle negativo do extrato (CN – meio de cultura MH e extrato) e controle positivo bacteriano (CP – meio de cultura MH e inóculo bacteriano).

Após o período de incubação, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada por meio da leitura da densidade óptica a 605 nm, utilizando o equipamento ELISA Multiskan FC da Thermo Scientific. Procedeu-se à comparação entre as densidades ópticas (DO) dos poços de controle negativo e dos poços de teste para avaliação da eficácia inibitória.

2.4.3 Confirmação da CIM com revelador resazurina

Foram adicionados 15 µL do revelador Resazurina a 0,01%, (R7017, Sigma-Aldrich®) aos poços da microplaca previamente incubados para avaliar a presença de metabolismo microbiano. Após a incubação da placa com Resazurina em aerobiose a 37°C de 30 minutos à 1 hora, a ausência de metabolismo microbiano foi indicada pela coloração azul, enquanto a presença de metabolismo foi evidenciada pela coloração rosa, conforme descrito por Coban (2012). O primeiro poço azul de uma linha, considerando a direção da linha H até a linha A, representou a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

2.4.4 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Após a identificação do poço correspondente à Concentração Inibitória Mínima (CIM), procedeu-se à semeadura do material a partir dos seguintes poços: um com concentração superior e dois com concentrações inferiores à CIM, conforme indicado pela coloração de resazurina, do próprio poço da CIM. A semeadura foi realizada com alça de

platina 0,1 µL em placas contendo ágar Muller Hinton estéril. Em seguida, as placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada como a menor concentração do extrato capaz de erradicar a atividade bacteriana, comprovada pela ausência de crescimento bacteriano em placa após a incubação.

2.4.5 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prism®.

Inicialmente, uma análise estatística descritiva foi conduzida para calcular a média, mediana, desvio padrão da média e intervalos interquartis. Em seguida, a normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Portanto, uma vez que os dados se distribuíram de forma não paramétrica, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste post hoc de Mann-Whitney. Um nível de significância de $p < 0,05$ foi adotado para determinar diferenças estatisticamente significantes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram utilizados diferentes métodos de extração da casca de noz-pecã a fim de verificar se há diferenças significantes no efeito antimicrobiano do extrato em cepas de *S. Aureus* isolados de casos de mastite bovina. Para isso foram utilizados solventes aquoso e hidroalcolico, casca em pó e granulada e equipamentos como cafeteira e Soxlet.

Os extratos obtidos apresentaram diferenças visíveis na coloração e no odor. O extrato hidroalcolico exibiu uma aparência mais turva, com coloração avermelhada e odor alcoólico característico, enquanto o extrato aquoso apresentou coloração amarronzada e odor intenso.

Quanto aos efeitos antimicrobianos podemos observar na Tabela 1 e Tabela 2 os resultados obtidos no teste de CIM e CBM respectivamente comparados com a forma de obtenção.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Extratos da Casca de Noz-Pecã: Comparação entre Solventes, Métodos de Extração e Granulometrias

Solvente	Granulometria	Extração	CIM			
			N	Mediana (50°)	Q1 (25°)	Q3 (75°)
Aquoso	Pó	Cafeteira	20	83,30 a	27,80	111,00
		Soxlet	20	6,94 b	6,94	13,89
	Granulado	Soxlet	20	27,89 b	27,78	55,56
Hidroalcolico	Pó	Cafeteira	20	55,60 a	55,56	111,00
		Soxlet	20	6,94 b	3,47	13,89
	Granulado	Soxlet	20	13,89 b	6,94	13

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Resultados representados pela letra "a" correspondem ao pior desempenho, observado no extrato obtido pelo método de infusão por cafeteira, independentemente do solvente, em relação à concentração inibitória mínima. Resultados com letras iguais, representados pela letra "b", não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Tabela 2 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) de Extratos da Casca de Noz-Pecã: Efeitos de Solventes, Métodos de Extração e Granulometrias

Solvente	Granulometria	Extração	CBM			
			N	Mediana	Q1	Q3
Aquoso	Pó	Cafeteira	20	69,40 a	27,80	111,00
		Soxlet	20	13,89 b	6,94	34,70
	Granulado	Soxlet	20	27,78 b	27,78	55,56
Hidroalcoólico	Pó	Cafeteira	20	55,56 a	55,56	111,00
		Soxlet	20	6,94 b	5,21	27,78
	Granulado	Soxlet	20	13,89 b	6,94	27,78

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Legenda: Valores seguidos por letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A letra "a" representa o pior resultado, observado no extrato obtido pelo método de infusão por cafeteira, independentemente do solvente, na concentração bactericida mínima. Valores com a mesma letra, representados por "b", não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Os extratos hidroalcoólicos apresentaram maior atividade antimicrobiana em comparação aos aquosos, evidenciando a relevância do solvente na eficiência de extração dos compostos bioativos. A análise dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) confirma que os extratos hidroalcoólicos obtidos pelo método de Soxhlet, tanto na granulometria pó quanto granulado, foram os mais eficazes, com CIMs e CBMs mais baixos, como pode ser visualizado nos quadros 1 de CIM e 2 de CBM. O maior efeito dos extratos hidroalcoólicos possivelmente deve-se à melhor solubilização de compostos bioativos, independentemente da granulometria. Assim, o resultado sugere que a utilização do Soxhlet combinado com solvente hidroalcoólico é o mais eficiente para extrair compostos bactericidas da casca de noz-pecã.

Este estudo demonstrou que o método de extração tem impacto significativo na atividade antimicrobiana dos extratos da casca de noz-pecã (*Carya illinoensis*). Em especial, a casca é rica em substâncias como ácido gálico, ácido clorogênico, ácido p-hidroxibenzóico, galato de epigallocatequina e galato de epicatequina, reconhecidas por suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Do Prado *et al.*, 2014). O método de Soxhlet mostrou-se superior à infusão em cafeteira em todos os cenários avaliados, independentemente do tipo de solvente (aquoso ou hidroalcoólico) ou da granulometria da amostra. Por outro lado, a granulometria (pó ou granulado) não influenciou significativamente os resultados, indicando que esse fator não altera a eficiência na extração dos compostos bactericidas.

Os resultados obtidos neste estudo estão em concordância com os achados de Garda *et al.* (2021), que evidenciaram a eficácia antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da casca

de noz-pecã contra *Staphylococcus aureus*. Foi observado que 96% das amostras (n=24) foram inibidas na concentração de 15%, e 4% (n=1) na concentração de 7,5%, com valores consistentes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para todas as cepas comprovadas. De maneira semelhante, os extratos hidroalcoólicos obtidos neste estudo tiveram valores baixos de CIM e CBM, destacando-se como mais eficazes em comparação aos aquosos.

Os resultados deste estudo também reforçam os achados de Brito *et al.* (2015), que investigaram o potencial antibacteriano do extrato aquoso da casca de noz-pecã, observando efeito bactericida em concentrações de 15% e 20% (v/v) contra diversas cepas bacterianas, exceto *Staphylococcus aureus*, que apresentou apenas efeito bacteriostático. No entanto, embora os autores tenham destacado a atividade antimicrobiana do extrato aquoso, os resultados obtidos neste estudo indicam que os extratos hidroalcoólicos, especialmente os extraídos pelo método Soxhlet, apresentaram menor Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), refletindo uma maior eficácia antimicrobiana.

A diferença nos resultados pode ser explicada pelo fato de que, no estudo de Brito *et al.* (2015), foi utilizado o extrato aquoso, enquanto este estudo utilizou extratos hidroalcoólicos, que são mais eficientes na extração de compostos bioativos, especialmente aqueles solúveis em solventes orgânicos. Além disso, o método Soxhlet, utilizado neste estudo, permite uma extração mais completa e eficaz dos compostos ativos presentes na casca de noz-pecã, resultando em uma maior concentração de substância antimicrobiana no extrato.

Caxambu *et al.* (2016), observaram a atividade antimicrobiana do extrato aquático da casca de noz-pecã, especificamente contra cepas de *Staphylococcus aureus*. Esses autores reportaram a formação de halos de inibição ao redor das áreas tratadas com o extrato aquoso, diminuindo significativamente uma atividade antimicrobiana. No entanto, os extratos hidroalcoólicos obtidos neste estudo revelaram maior eficácia, com menores valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), evidenciando que o solvente hidroalcoólico é mais eficiente na proteção de produtos bioativos com ação antimicrobiana superior. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de que o extrato aquoso é limitado na solubilização de compostos lipofílicos e hidrofílicos, enquanto o solvente hidroalcoólico, por ser polar e apolar, consegue extrair uma gama mais ampla de metabólitos bioativos.

Neira-Vielma *et al.* (2022), também investigaram o potencial antimicrobiano do extrato de casca de noz-pecã, mas com métodos diferentes. Foi utilizado o método de disco difusão, gerando resultados qualitativos com halos variando entre 1,67 mm e 5,67 mm. Em contrapartida, este estudo utilizou as técnicas de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), que fornecem dados quantitativos mais precisos sobre a eficácia antimicrobiana, permitindo determinar a concentração exata necessária.

Filho *et al.* (2022), também investigaram a atividade antimicrobiana do extrato de casca de noz-pecã, embora com diferenças no método de avaliação. Nesse estudo, foi destacada a eficácia antimicrobiana do extrato de casca de noz-pecã, especialmente contra *Staphylococcus aureus*. No entanto, enquanto esses autores observaram a atividade bactericida do extrato a 20% (v/v), o presente estudo encontrou resultados mais promissores com os extratos hidroalcoólicos extraídos pelo método Soxhlet. Além disso, a dificuldade na visualização da zona de inibição observada por Filho *et al.* pode ser atribuída à turbidez do extrato, um fator que não interferiu nos resultados deste estudo, que utilizou métodos quantitativos de CIM e CBM.

Estudos envolvendo outros extratos vegetais também podem ser encontrados na literatura. Um estudo desenvolvido por Filho *et al.* (2023), que investigou a ação

antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *Melaleuca leucadendra* contra *Staphylococcus aureus*, destacou a superioridade da eficácia antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos em relação aos aquosos. Embora as fontes vegetais e os microrganismos investigados sejam diferentes, ambos os estudos reforçam a eficácia dos extratos hidroalcoólicos como agentes antimicrobianos, destacando a importância do solvente e do método de extração na obtenção de compostos bioativos ativos contra patógenos relevantes.

Miranda *et al.* (2015) também avaliou a atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Ambos os estudos evidenciam a eficácia de extratos obtidos com solventes orgânicos, como etanol e metanol, na extração de compostos bioativos com atividade antimicrobiana. No entanto, uma diferença notável é que, enquanto os extratos hidroalcoólicos da casca de noz-pecã apresentaram atividade significativa contra diversas cepas bacterianas, incluindo *Staphylococcus aureus*, os extratos etanólicos frescos de *Montrichardia linifera* não demonstraram atividade inibitória contra a mesma bactéria, sugerindo que a eficácia antimicrobiana pode variar dependendo da planta, do solvente utilizado e do método de extração.

Santana *et al.* (2015) relatam um efeito antimicrobiano significativo do extrato de jatobá contra *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, com um CBM de 125,3 µg/mL. Assim como o extrato de jatobá apresentou eficácia em concentrações relativamente baixas (CBM de 125,3 µg/mL), os extratos hidroalcoólicos de casca de noz-pecã também apresentaram alta atividade antimicrobiana, com valores de CBM significativamente menores, especialmente quando extraídos pelo método Soxhlet. Embora as concentrações de CBM para o extrato de noz-pecã sejam mais baixas, apresentam maior potência antimicrobiana.

Por fim, os resultados obtidos neste estudo de casca de noz-pecã apresentam algumas semelhanças em relação ao estudo de Fernandes *et al.* (2022) sobre *Lippia origanoides*. Ambos os estudos indicam um potencial antimicrobiano promissor dos extratos vegetais, com eficácia observada contra *Staphylococcus aureus*. No entanto, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e bactericidas mínimas (CBM) dos extratos de noz-pecã foram significativamente mais baixas do que as observadas para *Lippia origanoides*. Essa diferença pode ser explicada pela composição fitoquímica distinta entre as plantas, com a casca de noz-pecã apresentando compostos bioativos mais eficientes em concentrações mais baixas e ao uso do método Soxhlet.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos hidroalcoólicos preparados pelo método Soxhlet, especialmente na granulometria de pó, apresentaram os melhores desempenhos, com valores reduzidos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Esses dados reforçam a importância do método de extração e do solvente na obtenção de produtos bioativos com maior eficácia antimicrobiana. Os extratos aquosos, embora promissores, tiveram eficácia inferior, destacando o potencial do solvente hidroalcoólico na solubilização de uma gama mais ampla de metabólitos secundários.

Apesar dos resultados promissores, é fundamental que futuras pesquisas avancem para estudos *in vivo*, avaliando a eficácia, segurança e estabilidade do extrato em condições reais de produção. A investigação de parâmetros como biodisponibilidade, efeitos colaterais e impactos na microbiota natural dos animais será essencial para validar sua aplicação prática. Além disso, a padronização dos métodos de degradação e formulação será necessária para garantir a reprodutibilidade e a escalabilidade do produto em diferentes contextos produtivos. A continuidade dos estudos nessa área poderá estabelecer o extrato

como um componente-

chave na estratégia de manejo da mastite bovina, trazendo benefícios diretos tanto para os produtores quanto para a saúde animal e a sustentabilidade do setor.

5 REFERÊNCIAS

^ACOSTA, A. C. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 36, n. 7, p. 565-573. 2016. doi: 10.1590/S0100-736X2016000700001.

^BCOSTA, A. C. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p.565-573, jul. 2016.

ALASALVAR, C.; SALVADÓ, J. S.; ROS, E. Bioactives and health benefits of nuts and dried fruits. **Food Chemistry**, v. 314, p. 126-192, 2020.

AMARAL, A. A. et al. Antioxidant Evaluation of Extracts of Pecan NutShell (*Carya illinoensis*) in Soybean Biodiesel B100. **Global Challenges**, v. 3, n. 11, p. 1900001, 2019.

ARCIELLO, A. et al. Development and characterization of antimicrobial and antioxidant whey protein-based films functionalized with Pecan (*Carya illinoensis*) nut shell extract. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 29, n. February, p. 100710, 2021.

ATANASOV, A. G. et al. Pecan nuts: A review of reported bioactivities and health effects. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 246–257, 2018.

BITTENCOURT, T. L. **Papel da autofagia da célula hospedeira no controle da carga bacilar em pacientes multibacilares e na patogênese da reação tipo 1 na hanseníase**. 2022. Tese (Doutorado), 2022.

BRITO, G. C. **Atividade antibacteriana de extrato aquoso da casca de Noz-Peça [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em [Curso]) – Universidade Federal da Fronteira Sul, 2015.

BOSCARDIN, J.; COSTA, E. C. A noqueira-pecã no Brasil: uma revisão entomológica. **Ciência Florestal**, v.28, 2018.

BULDAIN, D. et al. Combination of Cloxacillin and Essential Oil of *Melaleuca armillaris* as an Alternative Against *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Veterinary Science**, 2018.

BUSANELLO, M.; et al. Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6545–6553, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12042>.

CAXAMBU, S. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato aquoso de casca de noz- pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] em folhas de alface minimamente processadas. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Histórico mensal de leite .

Disponibiliza: rhttps : //www.conab.gov .br /info -agro/analisa -do-mercado -agropecuário - e - extrativista /analisa-do -mercado /histórico -mensal -de -leite /item /baixar /51948_0331f9ed61967d5721b3c5a7d06edf27.

COZ-BOLAÑOS, X. et al. Moringa infusion (Moringa oleifera) rich in phenolic compounds and high antioxidant capacity attenuate nitric oxide proinflammatory mediator in vitro.

Industrial Crops and Products, v. 118, p. 95–101, ago. 2018.

DA SILVA, E. V. C., et al. Obtenção e caracterização do extrato aquoso de geoprópolis da abelha *Melipona fasciculata*. **Peer Review**, v. 5, n. 25, p. 60-71, 2023.

PRADO, A. C. P. do et al. Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] shell. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 552–561, 2014.

DÓRAME-MIRANDA, R. F. et al. Encapsulation of Sardine Oil by Electrospraying with Gliadins and Pecan Nutshell Extracts for its Stabilization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, n. 3, p. 457–470, 2021.

FERNANDES, M. **Atividade antimicrobiana de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) contra *Staphylococcus* spp. causadores de mastite bovina**. 2022. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Recife, 2022.

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, p. 9–12, 2014.

FILHO, A. V.; AVILA, L. B.; LACORTE, D. H.; MARTINY, T. R.; ROSSETO, V.; MORAES, C. C.; DOTTO, G. L.; CARRENO, N. L. V.; DA ROSA, G. S. Resíduos agroindustriais brasileiros como potencial recurso de compostos bioativos e suas atividades antimicrobiana e antioxidante. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 6876, 13 out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27206876>.

GARDA, C. M. A. et al. Atividade antimicrobiana de extrato hidroalcoólico de casca de noz pecã em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. 2021.

GASPAROTTO, P.H.G. et al. Principais gêneros bacterianos causadores de mastite isolados no laboratório de microbiologia veterinária do Hospital Veterinário do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná/RO. **Veterinária em Foco**, v.14, p.60–74, 2016

GREENSKYBIO. **The art of extraction: a comprehensive guide to maceration, Soxhlet, ultrasonic, and supercritical fluid methods**. Disponível em: <https://www.greenskybio.com/extraction-methods>. Acesso em: 27 nov. 2024.

KANG, H. J. et al. Prevalência de patógenos e resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados em leite de mastite bovina na Coreia do Sul, 2018-2022. **Journal of Veterinary Medical Science**, 11 out. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1292/jvms.24->

0239.

LEON-BEJARANO, M. et al. Physical, barrier, mechanical, and biodegradability properties of modified starch films with nut by-products extracts. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 1–17, 2020.

MAIOCHI, R.; RODRIGUES, R.; WOSIACKI, S. Principais métodos de detecção de mastites clínicas e subclínicas de bovinos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 1237–1251, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.18677/EnciBio_2019A104.

MIRANDA, J. A. L. et al. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4 suppl 3, p. 1142-1149, 2015.

OLIVEIRA, L. A. R.; MACHADO, R. D.; RODRIGUES, A. J. L. Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da Unidade Oncológica de Anápolis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 1, p. 32–40, 2014.

ORTEGA-VIDAL, J., et al. Phenolic profile and antioxidant activity of *Jasania glutinosa* herbal tea. Influence of simulated gastrointestinal in vitro digestion. **Food Chemistry**, v. 287, p. 258–264, 2019.

MOURA, A. C. de; BENVENÚ, D. M.; BRITO, G. C. de; SOARES, I. A. Atividade antibacteriana de extrato aquoso da casca de noz-pecã. **Revista Faz Ciência**, v. 21, n. 34, p. 88, 2020.

NEIRA-VIELMA, A. A., et al.. Síntese verde de nanopartículas de prata usando extratos de casca de noz-pecã (*Carya illinoensis*) e avaliação de sua atividade antimicrobiana. **Antibióticos (Basileia)**. 2022 25 de agosto;11(9):1150. doi: 10.3390/antibioticos11091150.

NOTCOVICH, S. et al. Biofilm-Forming Potential of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in New Zealand. **Veterinary Sciences**, v. 5, n. 1, p.8-15, 19 jan. 2018.

RUEGG, P. L. Making Antibiotic Treatment Decisions for Clinical Mastitis. *Veterinary Clinics of North America*. **Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 413–425, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.06.002>.

SALES, et al. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 2014.

SANTANA, T. C. de. **Uso do extrato de folhas do Jatobá (*Hymenaea martiana* Hayne) na redução das contagens de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em leite cru**. 2015. 52 f. Dissertação (Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2015.

SANTOS, T. A. **Avaliação de diferentes métodos e solventes de extração sobre a composição fenólica e centesimal, atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos dos frutos da *Momordica charantia* L.** 2018. 1 CD-ROM. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, 2018.

VILLASANTE, J.; MARTIN-LUJANO, A.; ALMAJANO, M. P. Characterization and application of gelatin films with pecan walnut and shell extract (*Carya illinoensis*). **Polymers**, v. 12, n. 6, 2020.