



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ESTUDO DA AÇÃO DOS EXTRATOS DE *Mimosa tenuiflora*
(WILD) POIRET E *Piptadenia stipulacea* (BENTH) DUCKE
SOBRE CEPAS MICROBIANAS ISOLADAS DE MASTITE EM
BÚFALAS**

ANDRÉIA VIEIRA PEREIRA

**Patos – PB
2010**

ANDRÉIA VIEIRA PEREIRA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ESTUDO DA AÇÃO DOS EXTRATOS DE *Mimosa tenuiflora*
(WILD) POIRET E *Piptadenia stipulacea* (BENTH) DUCKE
SOBRE CEPAS MICROBIANAS ISOLADAS DE MASTITE EM
BÚFALAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia, área de concentração em Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido.

**Orientador:
Prof. DSc. Onaldo Guedes Rodrigues**

**Patos – PB
2010**

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CAMPUS DE PATOS-UFCG

P436e

2010

Pereira, Andréia Vieira.

Estudo da ação dos extratos de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke sobre cepas microbianas de mastite em búfalas / Andréia Vieira Pereira. - Patos: CSTR/UFCG, 2010.

100p.: il.

Inclui bibliografia.

Orientadora: Onaldo Guedes Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 - Mastite - Bubalina - Dissertação. 2 - Fitoterapia. 3 - Microbiologia. I - Título.

CDU: 618.19-002



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

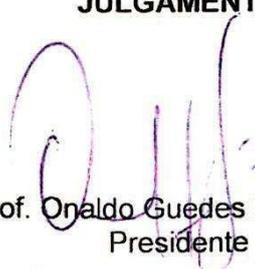
**TÍTULO: "ESTUDO DA AÇÃO DOS EXTRATOS DE *Mimosa tenuiflora* (WILD)
POIRET E *Piptadenia stipulacea* (BENTH) DUCKE SOBRE CEPAS
MICROBIANAS ISOLADAS DE MASTITES DE BÚFALAS"**

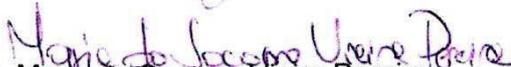
AUTORA: ANDRÉIA VIEIRA PEREIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. ONALDO GUEDES RODRIGUES

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO

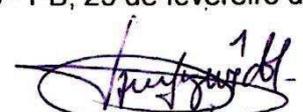

Prof. Onaldo Guedes Rodrigues
Presidente


Profa. Maria do Socorro Vieira Pereira
1º Examinadora


Profa. Maria das Graças Veloso Marinho
2º Examinadora


Prof. Edinaldo Queiroga de Lima
3º Examinador

Patos - PB, 23 de fevereiro de 2010


Prof. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva
Coordenador

DEDICO

Ao Deus todo poderoso, pela força e saúde que sempre me proporcionou nesta caminhada e em toda minha vida, pelos momentos felizes durante esses anos e também pelos não tão bons, que me fizeram crescer.

OFEREÇO

*A minha filha Andressa Vieira, meu presente de Deus,
por todo amor, compreensão e força para superar a
distância que nos separava. A minha mãe, e irmãs o
melhor exemplo da minha opção pela fitoterápia e outras
terapias, herança legada de suas sabedorias.*

AGRADECIMENTOS

Este espaço que reservo para lembrar tantas pessoas que fazem parte da minha História, talvez seja o melhor momento de toda minha dissertação, pois faço uma retrospectiva de minha vida e descubro quantas oportunidades tive de conhecer pessoas, de viver momentos, de superar dificuldades.

À minha mãe Maria Nazareth Vieira por ser simplesmente o que é: força, determinação, coragem e amor;

As minhas queridas irmãs Maria do Socorro Vieira e Jozinete Vieira por serem tão batalhadoras e acreditarem em mim, por estarem sempre do meu lado me apoiando e me encorajando nessa caminhada e, sobretudo pelos ensinamentos de profissão tão importantes para minha formação acadêmica e profissional, que de maneira nobre e sábia estendem a todos que as cercam;

Ao meu orientador Prof. Dr. Onaldo Guedes Rodrigues, agradecimentos são poucos para demonstrar a sua importância em minha vida;

Ao meu amigo Prof. Dr. Ednaldo Queiroga de Lima pela grande colaboração, apoio, confiança, amizade, respeito ao meu trabalho;

Uma profunda gratidão ao pesquisador Prof. Dr. Aderbal Marcos pela oportunidade de desenvolver este trabalho com todo o apoio material e humano;

Ao Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota (UFRPE) grande exemplo de ser humano, pela contribuição na minha formação profissional;

Ao Professor Dr. Leonildo Bento (UFRPE) pelos conhecimentos passados sobre micologia e amizade;

A Elizabeth Sampaio pelo companheirismo, convivência harmônica e descontraída, por ter me mostrado que o conhecimento adquirido não deve ficar retido a um só indivíduo mais tem que ser repassado, pois, só assim conquistamos nossos objetivos com a consciência de não sermos egoístas para que possamos viver em paz;

Às amigas Karla Aparecida, Tatiane Kelly, Dona Fátima Barbosa, Fátima Rosana, Michelly Vieira, Denise Aline, Débora Laurentino, Katiuscia Menezes e ao amigo Luiz Fernando que sempre me deram força, principalmente nos momentos difíceis, e que com certeza levarei no meu coração por toda minha vida;

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal da UFCG, Alexandre e Otávio; a Damião, Joselito e “Seu Bill” pela imensa ajuda na coleta do material vegetal;

Aos animais, essas criaturas tão especiais, que foram de suma importância para realização desta pesquisa;

A todos aqueles que de alguma maneira me ajudaram e não estou citando individualmente.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudo cedida durante o curso.

Muito Obrigada!

*“Qualquer coisa que você saiba fazer ou pensa que
saiba, comece!*

*A ousadia guarda em si o gênio, o poder e a magia da
realização.*

Por isso tente!!!

Goethe

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE GRÁFICOS.....	iii
CAPÍTULO 1- Revisão de Literatura - Estudo da ação dos extratos de <i>Mimosa tenuiflora</i> (Wild) Poiret e <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth) Ducke sobre cepas microbianas isoladas da glândula mamária de bubalinos.....	15
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1. Considerações gerais sobre Búfalas.....	20
2.1.1. Búfalas da raça Murrah.....	21
2.2. Considerações gerais sobre mastite.....	22
2.3. Considerações gerais sobre <i>Staphylococcus</i>.....	25
2.4. Considerações gerais sobre Jurema Preta (<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd) Poiret).....	27
2.5. Considerações gerais sobre <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth) Ducke.....	29
2.6. Considerações gerais sobre Taninos.....	30
3. REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO 2- Estudo comparativo da atividade antimicrobiana (<i>in vitro</i>) de extratos de <i>Mimosa tenuiflora</i> (Wild) Poiret e <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth) Ducke.....	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1 Obtenção do Extrato Etanólico.....	45
2.2 Quantificação do TTC (Teor de Taninos Condensados) do extrato de <i>Mimosa tenuiflora</i> e <i>P. stipulacea</i>.....	46
2.3 Aquisições de amostras de <i>Staphylococcus</i> de animais infectados.....	47

2.4	Ensaio comparativos.....	47
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1	Resultados dos ensaios com o extrato de jurema preta e jurema branca.....	48
3.2	Resultados dos Ensaio com os Antibióticos Comerciais.....	51
4.	CONCLUSÃO.....	53
5.	REFERÊNCIAS.....	54
	CAPÍTULO 3- Taninos de Jurema preta: Atividade antimicrobiana sobre	
	<i>Staphylococcus aureus</i> de origem bovina.....	59
	RESUMO.....	59
	ABSTRACT.....	60
1.	INTRODUÇÃO.....	61
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1	Espécie estudada.....	62
2.2	Preparo das cascas para extração dos taninos.....	63
2.3	Extração das substâncias tânicas das cascas.....	63
2.4	Extração para quantificação das substâncias tânicas.....	63
2.5	Extrações das substâncias tânicas para avaliação da atividade antimicrobiana.....	65
2.6	Aquisição das Amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> de Origem Bovina.....	65
2.7	Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	66
2.8	Análise estatística.....	66
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.	CONCLUSÃO.....	72
5.	REFERÊNCIAS.....	73
	CAPÍTULO 4- Avaliação comparativa “in vivo” com o extrato de jurema preta e	
	antibiótico sintético em búfalas (<i>Bubalus bubalis</i>) com mastite	
	clínica.....	77
	RESUMO.....	77
	ABSTRACT.....	78
1.	INTRODUÇÃO.....	79
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	80
2.1	Coleta e preparação do material.....	80
2.2	Avaliação microbiológica do leite.....	80
2.3	Cinética bactericida e determinação da atividade antimicrobiana “in vitro” de	

	<i>Mimosa tenuiflora</i> (Wild) Poiret.....	81
2.4	Avaliação clínica das glândulas mamárias.....	82
2.4.1	Contagem de células somáticas (CCS).....	82
2.4.2	Contagem de células somáticas indireta (CMT).....	82
2.5	Avaliação física das glândulas mamárias e leite.....	82
2.6	Ensaio farmacológico agudo com o extrato de <i>Mimosa tenuiflora</i> (Wild) Poiret.....	83
2.7	Ensaio de irritação dérmica com o extrato de <i>Mimosa tenuiflora</i> (Wild) Poiret.....	83
2.8	Procedimentos preparatórios para o tratamento com antibiótico e extrato de <i>Mimosa tenuiflora</i> (Wild) Poiret.....	85
2.9	Contagem rápida de <i>Staphylococcus aureus</i> pelo método Petrifilm®	85
3.	Análise estatística.....	85
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4.1	Resultado da cinética bacteriana e atividade antimicrobiana “ <i>in vitro</i> ” de <i>Mimosa tenuiflora</i> (Wild) Poiret.....	86
4.2	Resultado do ensaio farmacológico agudo com o extrato de <i>Mimosa tenuiflora</i> (Wild) Poiret.....	87
4.3	Resultado do ensaio de irritação dérmica com o extrato de <i>Mimosa tenuiflora</i> (Wild) Poiret.....	88
4.4	Resultado do método Califórnia para mastite (CMT – TCM).....	90
4.5	Resultado do exame microbiológico.....	91
5.	CONCLUSÃO	94
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	ANEXOS	100

LISTA DE TABELAS

	Pág.
CAPITULO 2	
TABELA 1 - Percentual de atividade antimicrobiana de antibióticos comerciais sobre cepas de <i>Staphylococcus sp.</i>	52
CAPITULO 3	
TABELA 2 - Sensibilidade de bactérias <i>S. aureus</i> a solução tânica (mg/ml) de casca do caule de <i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.....	69
TABELA 3 - Sensibilidade de bactérias <i>S. aureus</i> a antibióticos sintéticos pelo teste de difusão em disco (2mg/disco).....	70
CAPITULO 4	
TABELA 4 - Definições da irritação e da corrosão dérmica avaliando formação de eritemas e escarras.....	84
TABELA 5 - Definições da irritação e da corrosão dérmica avaliando formação de edemas.....	84
TABELA 6 - Cinética bacteriana frente ao extrato hidroalcoólico de <i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir. sobre as amostras isoladas de bovinos de <i>S. aureus</i>	86
TABELA 7 - Resultados da DL ₅₀ do extrato de <i>Mimosa tenuiflora</i> em camundongos.....	88
TABELA 8 - Classificação e média dos índices de irritação cutânea em camundongos submetidos ao protocolos OECD 404 com extrato de <i>M. tenuiflora</i> na diluição de 1:4.....	89
TABELA 9 - Classificação e média dos índices de irritação cutânea em camundongos submetidos ao protocolos OECD 404 com extrato de <i>M. tenuiflora</i> na diluição de 1:8.....	89
TABELA 10 - Escores de Califórnia Mastitis Test dos grupos tratados com o extrato de <i>M.tenuiflora</i> e antibiótico.....	90
TABELA 11 - Médias e desvio padrão da avaliação microbiológica do leite de búfalas pelo método Petrifilm.....	92

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1	Pág.
FIGURA 1- Búfalas da raça Murrah (Alagoas/AL- 2008).....	21
FIGURA 2- Búfalas da raça Murrah (Alagoas/AL- 2008).....	22
FIGURA 3- Búfalas da raça Murrah com Tetos saudáveis.....	23
FIGURA 4- Búfalas da raça Murrah com mastite clínica.....	23
FIGURA 5- <i>Staphylococcus aureus</i> (UFRPE/LDIC- 2008).....	25
FIGURA 6- <i>Mimosa tenuiflora</i> (UFCEG/CSTR- 2008).....	27
FIGURA 7- <i>Piptadenia stipulacea</i> (BR 230).....	29
FIGURA 8- Taninos isolados de <i>Mimosa tenuiflora</i>	30
CAPITULO 2	
FIGURA 9- Atividade antimicrobiana do extrato de <i>M. tenuiflora</i> sobre cepas de <i>Staphylococcus sp.</i>	49
FIGURA 10- Atividade antimicrobiana do extrato da casca de <i>P. stipulacea</i>	49
FIGURA 11- Atividade antimicrobiana de antibióticos comerciais sobre cepas de <i>Staphylococcus sp.</i>	52
CAPITULO 3	
FIGURA 12- Atividade antimicrobiana de solução tânica extraída da casca de <i>M. tenuiflora</i>	67
FIGURA 13- Contagem de colônias pelo método Petrifilm nos lotes experimentais com extrato de <i>M.tenuiflora</i>	92
FIGURA 14- Contagem de colônias pelo método Petrifilm nos lotes experimentais com o antibiótico Cefquinoma.....	93

LISTA DE GRÁFICOS

CAPITULO 3

- GRÁFICO 1** - Concentração Inibitória Mínima (halos de inibição em mm) em meio sólido da solução tânica (mg/ml) de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. sobre *Staphylococcus aureus*..... 67
- GRÁFICO 2**- Concentração Inibitória Mínima (halos de inibição em mm) em meio sólido de **GEN**-Gentamicina; **AMO** – Amoxicilina; **CIP** – Ciprofloxacina; **PNM** – Penicilina+Novobiocina; **CFQ** – Cefquinome; sobre *Staphylococcus aureus*..... 68
- GRÁFICO 3**- Concentração Inibitória Mínima (halos de inibição em mm) em meio sólido de **FLF** – Florfenicol; **AZI** – Azitromicina; **ERI** – Eritromicina; **NBT** - Neomicina+Bacitracina+Tetraciclina; **ENO** – Enrofloxacin sobre *Staphylococcus aureus*..... 68

CAPÍTULO 1

PEREIRA, Andréia Vieira. **Estudo da ação dos extratos de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke sobre cepas microbianas isoladas da glândula mamária de bubalinos.** Patos, PB: UFCG, 2010. 100p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido).

RESUMO

A bubalinocultura tem sido penalizada com várias doenças, muitas delas semelhantes àquelas que ocorrem em bovinos, como a mastite, geralmente de difícil resolução levando à perdas econômicas. Por outro lado, o uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro de ação tem aumentado a resistência microbiana, tornando-se cada vez mais difícil o seu tratamento. Novos meios alternativos têm sido buscados no tratamento das infecções microbianas, neste contexto este trabalho objetivou avaliar uma nova alternativa de controle da mastite em bubalinos com plantas do Semi-árido paraibano; Jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret) e jurema branca (*Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke). Foram usadas cascas de Jurema preta e branca coletadas em árvores da Universidade Federal de Campina Grande/CSTR e rodovia que liga Patos a Campina Grande. A obtenção do extrato etanólico foi feita a quente por evaporação rotativa. Foram isolados e quantificados os taninos da *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* e realizada avaliação antimicrobiana destes sobre *Staphylococcus aureus*. A curva bacteriana frente aos extratos foi avaliada pelo método de Peyret. Foram realizados ensaios farmacológicos agudos (DL₅₀) e de sensibilidade cutânea com extratos etanólicos para avaliar seus possíveis efeitos tóxicos. A atividade antimicrobiana “*in vitro*” foi realizada com amostras de *S. aureus* e *Staphylococcus* ssp. coletadas de leite de búfalas e vacas com mastite clínica e subclínica. Os ensaios foram realizados em duplicatas e o resultado final foi determinado pela média aritmética dos halos de inibição. Para a determinação da atividade antimicrobiana “*in vivo*”, foi avaliado o tratamento de quartos mamários provenientes de animais em diferentes estágios de lactação, com mamite detectada por meio de métodos diretos de contagem de células. O tratamento foi instituído por 5 dias, com administração por via intramamária do extrato e antibiótico sintético. As amostras de leite dos animais em tratamento foram coletadas nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 5 após o início do tratamento, acompanhados da realização de CMT, cultura isolamento e identificação dos microorganismos conforme citado anteriormente, assim como contagem do número de colônias identificadas.

Palavras-chave: Fitoterapia, plantas nativas, mastite, bubalinocultura.

PEREIRA, Andréia Vieira. **Study of the action of extracts of *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret and *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke on microbial strains isolated from the mammary glands of buffaloes.** Patos, PB: UFCG, 2010. 100p. (Dissertation – Magister Science in Animal Science – Agroforestry Systems in Semi-arid).

ABSTRACT

The buffaloes livestock has been penalized with various diseases, many of them similar to those found in cattle, such as mastitis, usually difficult to resolve leading to economic losses. Moreover, the indiscriminate use of broad-spectrum antimicrobial action has increased microbial resistance, making it increasingly difficult to treat. New alternative means have been sought in the treatment of microbial infections, in this context, this study aimed to evaluate a new alternative for control of mastitis in buffaloes with plants of the semi-arid in Paraíba state; Jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret) and Jurema branca (*Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke). We used shells of Jurema preta and Jurema branca collected of trees from farms in the de Campina Grande Federal University and Patos highway that connects to Campina Grande. Getting the ethanol extract was made with cold rotary evaporation. Were isolated and quantified the tannins *M. tenuiflora* and *P. stipulacea* and antimicrobial evaluation performed on these *Staphylococcus aureus*. The curved front of the bacterial extracts was assayed by Peyret method. Pharmacological tests were conducted acute (DL50) and skin sensitivity to ethanol extracts to evaluate their possible toxic effects. The antimicrobial activity was performed in vitro with strains of *S. aureus* and *Staphylococcus spp.* collected milk from buffaloes and cows with clinical and subclinical mastitis. The tests were performed in duplicates and the final result will be determined by the arithmetic mean of the inhibition halos. For the determination of antimicrobial activity *in vivo*, will be assessed the treatment of mammary glands from animals at different stages of lactation with mastitis detected by the CMT. The treatment was instituted for 5 days with administration intramammary of formulated product. Samples of milk from treated animals were collected on days 0, 1, 2, 3, 4, 5 after initiation of treatment, accompanied by the performance of CMT, culture, isolation and identification of microorganisms as previously mentioned, as well as counting the number colonies identified.

Keywords: Phytotherapy, native plants, mastitis, buffaloes livestock.

1 INTRODUÇÃO

A mastite é a principal afecção da glândula mamária, causando grandes perdas na produção de leite de búfalas (SINGH & SINGH, 1994). Na produção e industrialização do leite, a mastite é um dos fatores que mais reduz a qualidade e a quantidade do produto, afetando acentuadamente a produção leiteira mundial, pela redução na capacidade produtora dos rebanhos infectados (SILVA, 1999a) pela queda na qualidade do produto final com diminuição no rendimento industrial para fabricação de derivados e pelas alterações na composição do leite mamático.

Esta doença pode se apresentar, na dependência da intensidade da resposta inflamatória, em mastites clínicas ou ambientais e em subclínicas ou contagiosas com uma prevalência de 17,5% para mastite clínica e de 24,4% para mastite subclínica na espécie bubalina (SINGH & SINGH, 1994). Independentemente da forma de apresentação, a etiologia bacteriana assume um lugar de destaque na epidemiologia do processo infeccioso. Acometem o maior número de matrizes produtivas, principalmente aquelas onde o agente etiológico é o *Staphylococcus aureus*, as quais se apresentam na forma subclínica crônica, a mais contagiosa e que não são facilmente controladas por antimicrobianos (GONÇALVES, 2006). Outros microrganismos podem também estar envolvidos neste processo infeccioso, possivelmente os fungos e leveduras, as algas e mais raramente, os vírus (LANGONI, 1999).

Os *S. aureus* ao penetrarem, no interior da glândula mamária burlam as defesas celulares, são fagocitados por neutrófilos, permanecendo viáveis no interior destes e ao destruí-los, iniciam novas infecções (GONÇALVES, 2006). Possuem grande poder invasor dos tecidos com capacidade de encistamento, formando focos encapsulados profundos e de difícil acesso a antibióticos que não possuam boa dispersão, o que favorece o desenvolvimento de processos crônicos e subclínicos (FERNANDES, 2006).

O tratamento prolongado com antibióticos elimina as bactérias, permanecendo a infecção por leveduras, muito mais resistentes a estes fármacos, associando a fatores como doenças crônicas, imunodebilitantes, metabólicas, presença prévia de infecções por vírus ou bactérias, alimentos ricos em glicose e maltose, deficiências vitamínicas, senilidade e stress, causando um desequilíbrio bactéria/fungo que favorece o desenvolvimento e a multiplicação sem controle do microrganismo, tornando-o um agente infeccioso (JUNGERMAN E SCHWARTZMAN, 1972; FEO, 1973; CRUZ, 1985). O uso indiscriminado de medicamentos sem a realização de testes preliminares de sensibilidade “*in vitro*” pode na maioria das vezes

resultar em tratamentos inadequados e ocasionar agravamento do processo, determinando o desenvolvimento de resistência microbiana (CULLOR, 1993).

O uso inadequado de antimicrobianos provocou, a partir da década de 70, um processo de aceleração do aparecimento de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos, especialmente nos ambientes hospitalares causando sérios problemas de resistência dos microrganismos (WAGENLEHNER & NABER, 2006). No entanto insucesso do tratamento também pode relacionar-se a capacidade de sobrevivência intracelular de algumas bactérias e também a alterações anatomopatológicas induzidas por certas infecções impedindo o acesso do medicamento no foco (BARRAGY, 1994).

Além dos os altos custos com o tratamento há uma preocupação crescente com a presença de resíduos de antibióticos no leite, gerando uma busca por métodos alternativos viáveis para a abordagem clássica dos antibióticos, através do estabelecimento de uma nova política de exploração das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos focada na geração local de renda e exploração sustentável da biodiversidade que resultariam numa considerável economia de recursos públicos e possível geração de divisas (BORN, 2000).

O uso de plantas medicinais com fins terapêuticos remonta ao início da civilização, confundindo-se com nossa história, desde o momento em que o homem despertou para as suas necessidades, começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para o próprio benefício (NOVAIS et al., 2003). A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química o que constituem os vegetais como uma excelente fonte de busca de novas drogas antimicrobianas (NOVAIS et al., 2003). O que proporcionou avanços na área científica, permitindo o desenvolvimento de fitoterápicos mais seguros e eficazes, assim como de uma forte tendência de procura, pela população, por terapias menos agressivas, especialmente quando destinadas ao atendimento primário à saúde (YUNES; PEDROSA; CECHINELI FILHO, 2001).

Metodologicamente os estudos sobre as propriedades curativas de plantas medicinais são particularmente complexos, uma vez que algumas plantas com atividades terapêuticas reconhecidas cientificamente, não apresentam a mesma atividade em qualquer das frações de seus extratos. Isto provavelmente ocorre devido à complexa rede de sinergismos entre as diversas substâncias que compõe a planta em si que conferem o determinado poder curativo (VASCONCELOS et al., 2002).

Diante da necessidade de se encontrar novas alternativas, que sejam capazes de controlar a ação de microorganismos, buscou-se realizar um trabalho que viabilize um maior conhecimento do potencial das espécies existentes na região, e que, principalmente, nos permita contribuir para identificação e isolamento de novas substâncias com atividades biológicas definidas. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais de *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke *in vitro* e *in vivo* em animais positivos para mastite clínica e subclínica.

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações gerais sobre Búfalas

O Brasil é uma demonstração da adaptabilidade do búfalo a condições de manejo e ambiente totalmente diferente (ZAVA, 1984). Dos bubalinos introduzidos no Brasil, quatro raças são reconhecidas oficialmente pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos: Carabao, Jafarabadi, Mediterrânea e Murrah. Sendo a primeira introdução de búfalos no Brasil em 1890 pelo Dr. Vicente Chermont de Miranda, que consistiu na compra de búfalos Carabao ou Rosilhos para Ilha de Marajó, raça que apresenta aptidão para produção de carne e tração e as demais para carne e leite (NASCIMENTO & CARVALHO, 1993). Em 1895, também fizeram uma importação de búfalos italianos (ROSA, et. al., 2007). Segundo Silva et al. (2003) e Mariante et al. (2003), o rebanho bubalino nacional é representado por cerca de 3,5 milhões de cabeças, concentrando-se no Pará ao redor de um milhão e meio de animais. Dados mais atualizados da ANUALPEC (2005), indicam que o rebanho bubalino no Brasil cresceu de 1 milhão em 1996, para 1,169 milhões de cabeças em 2005. De acordo com dados publicados em 2009 pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2009) o Brasil apresenta um efetivo de 160 milhões cabeças de búfalos. No nordeste brasileiro a bubalinocultura iniciou no final dos anos 50 na região da baixada maranhense, com um rebanho de 77.000 cabeças, sendo o maior rebanho da região Nordeste (IBGE, 2009). Ainda, segundo dados do IBGE, 61% desses animais estão concentrados na região Norte, 12% no Sul; 11% no Nordeste; 10 % no Sudeste e 6% no Centro-Oeste (GONÇALVES, 2009).

A principal função do búfalo, nos países ou regiões onde é explorado, consiste na produção de leite, não apenas devido a sua superioridade revelada na produção quantitativa, como principalmente, pelo elevado teor de matéria gorda que caracteriza o leite bubalino; isto provavelmente pela característica própria da espécie que tem a capacidade de transformar alimentos grosseiros, inferiores e do mais insignificante valor nutritivo em leite saboroso, rico em gordura destinado tanto ao consumo *in natura*, como preparo de queijos, manteiga e outros derivados (FONSECA, 1987). No entanto, o diagnóstico da mastite bubalina ainda não está totalmente esclarecido, apesar da utilização de técnicas já padronizadas recomendadas para bovinos, como por exemplo, o California Mastite Teste e o Whiteside (OLIVEIRA, 2003).

Segundo Zava (1987) o leite de búfala é muito popular e valorizado em lugares onde a dieta é deficiente em proteína, contendo 30% a mais de proteína que o leite bovino, além de apresentar níveis de colesterol mais baixos. Mais eficiente na conversão de fibras que os bovinos, os búfalos necessitam de 10.000 Kcal para produzir um quilo de leite contra as 15.000 Kcal do bovino (VALE, 1994). Fatores relacionados à injúria da teta, defeitos no esfíncter, permanência do patógeno e estado imune dos diferentes quartos, tanto em bovinos quanto bubalinos, representam um importante papel no desenvolvimento da mastite subclínica. A susceptibilidade de mastite subclínica em búfalas é muito reduzida quando comparada a vaca, possivelmente pela espessura da camada do epitélio e queratina, além de uma melhor organização da musculatura do esfíncter do teto (SAINI et al., 1994).

2.1.1 Búfalas da raça Murrah

São robustas, tem úbere bem desenvolvido, com veias bem marcadas e quartos bem enquadrados. Os mamilos são de fácil manipulação e tração. A descida do leite é rápida. Tudo isto faz com que sejam excelentes leiteiras. Com boa alimentação produz mais leite, com um teor de gordura maior que as outras raças (ROSA et. al., 2007). Sua produção de leite por lactação oscila entre 1.500 a 4.000litros, numa média de 300 dias. A produção pode aumentar até a quarta lactação e depois declina muito lentamente.



Figura 1 Búfalas da raça Murrah. **Fonte:** PEREIRA A.V., Alagoas/AL 2008.

Quanto ao manejo, os búfalos precisam mergulhar na água e/ou na lama para resfriar o corpo, hidratar a pele e proteger-se dos ectoparasitas e dos raios de sol (ZAVA, 1984). Apesar da natureza semi-aquática, podem viver em qualquer lugar, sempre que disponham de água potável e sombra para proteger-se do sol.



Figura 2 Búfalas da raça Murrah. **Fonte:** PEREIRA A.V., Alagoas/AL- 2008.

2.2 Considerações gerais sobre mastite

A mastite é uma doença que acomete principalmente matrizes em lactação e destas principalmente as de raças leiteiras (FERNANDES, 2006). É uma enfermidade plurietiológica e multifatorial que acomete a maior parte do rebanho leiteiro e causa problemas em toda cadeia produtiva, inclusive ao consumidor que poderá ter um produto final de qualidade inferior (COSTA, 2005).

De prevalência variável no Brasil, freqüentemente ocorre durante no período seco ou no início da lactação, podendo ser causada por agentes físicos ou químicos, mas na maioria dos casos, a inflamação é resultado de uma infecção por agentes bacterianos, sendo estes responsáveis por 90% dos casos (DUVAL, 1997; LADEIRA, 2001). Dependendo do agente etiológico são rapidamente curáveis, enquanto outras permanecem durante toda vida produtiva do animal.

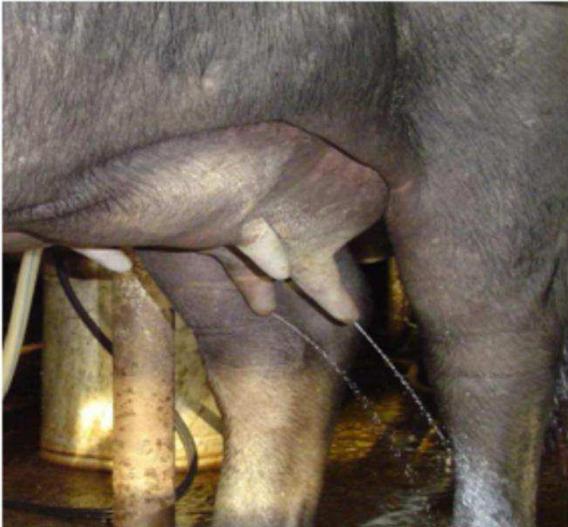


Figura 3 Búfalas da raça Murrah com tetos saudáveis. **Fonte:** PEREIRA A.V., Alagoas/AL- 2008.



Figura 4 Búfalas da raça Murrah com mastite clínica. **Fonte:** PEREIRA A.V., Alagoas/AL- 2008.

Caracteriza-se por alterar o tecido glandular, causando distúrbios funcionais no quarto mamário afetado. Tais distúrbios resultarão em uma diminuição da produção de leite e alterações em suas características físico-químicas, bacteriológicas e sensoriais (GERMANO, 2001), por causar lesões nas células secretoras que se tornam menos eficientes, reduzindo assim a produção. Causando uma alteração no metabolismo celular também, prejudicando a síntese dos componentes do leite (CERÓN-MUÑOZ et al., 2002).

Há aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos e da rota paracelular de secreção dos constituintes do sangue no leite (MOUSSAOUI et al., 2002; SILVA, 1999a). Neste processo inflamatório ocorre uma elevação no número de células somáticas (leucocitárias e epiteliais), da carga microbiana, redução nos teores de gordura, proteína e lactose, aumento das frações do soro sanguíneo no leite, desequilíbrio salino, aumento no pH e diminuição da estabilidade das proteínas do leite fato que compromete a qualidade final do produto (SILVA, 1999b; BUENO et al., 2005).

Na dependência da intensidade da resposta inflamatória a mastite poderá apresentar-se de forma clínica diagnosticada por alterações no úbere decorrentes da inflamação e por modificações da secreção láctea com presença de grumos, pus ou sangue e da forma subclínica que é diagnosticada por testes baseados no conteúdo celular do leite (MENDONÇA et al., 1999; LADEIRA, 2001). A forma subclínica é considerada a mais prejudicial pela falta de sintomas ou sinais, fato que determina perdas econômicas maiores, devido à frequência da persistência do processo (REIS et al., 2003).

Por esta razão, a mastite bovina e bubalina continua sendo fator limitante da produção leiteira em muitas propriedades no Brasil, representando também um sério problema tecnológico para as indústrias beneficiadoras por o leite mastítico possuir um número aumentado de células somáticas, diminuição no teor de caseína e aumento nas proteínas do soro, dentre outras anormalidades. As alterações na composição são responsáveis por diminuição no rendimento industrial, baixa qualidade dos fermentados e diminuição na vida de prateleira dos derivados lácteos (PRESTES et al., 2003).

A cultura da secreção do úbere, entretanto, é considerada o método mais seguro para identificar a causa da infecção mamária. As bactérias patogênicas isoladas com maior frequência são o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.* e *Pseudomonas spp.* (SAINI et al., 1994; NAIKNAWARE et al., 1998).

Na forma subclínica a principal bactéria encontrada é o *Staphylococcus aureus* formando focos encapsulados de porções altas no úbere, o que dificulta a cura bacteriológica durante a lactação, pois os antibióticos usados nesta fase atuam por pouco tempo, devido ao período de retirada no leite geralmente entre 10 e 12 horas, não permanecendo em níveis terapêuticos suficientes para determinar a eliminação completa da bactéria encistada (LISBOA & PIANTA, 1994; FIGUEIREDO, 1995).

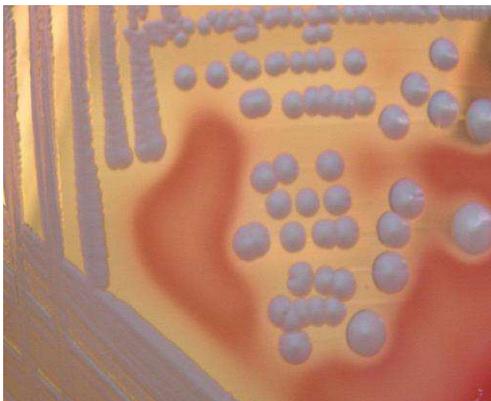
A presença de fungos causadores de mastite como único agente ou associado a bactérias tem tido grande importância atualmente, não apenas como causa de grandes prejuízos econômicos, mas também por tornar o leite impróprio para o consumo humano. Em 150 amostras obtidas de animais com mastite clínica e subclínica, 74 (49,33%) foram positivas ao CMT, com 6,8% do total das amostras positiva para fungos; destas 5,4% foram *Candida albicans* e 2,27% *Aspergillus spp.* (MAHAPATRA, et al., 1996).

Segundo Oliveira (2003) devido às búfalas terem como ambiente preferencial terrenos alagadiços e lama, este fato contribui para o surgimento de mastites subclínicas. A sensibilidade dos testes indiretos na detecção da mastite subclínica em búfalos foi pesquisada por (TIJARE et al., 1999). Alguns autores consideraram que durante a aplicação dos vários testes indiretos realizados em búfalas com mastite houve muita variação em relação à sensibilidade destes e consideraram como uma explicação plausível o fato da associação de bactérias a outros microrganismos podendo influenciar e alterar os resultados (OLIVEIRA, 2007b).

Este processo de inflamação da mama representa sério problema para a indústria leiteira, influenciando de forma decisiva no lucro das propriedades leiteiras. As perdas econômicas devido à mastite bubalina são grandes e usualmente ocorrem na forma de redução na produção, custos devido ao leite descartado, gastos com tratamentos e honorários veterinários (OLIVEIRA, 2003a).

2.3 Considerações gerais sobre *Staphylococcus*

Bactéria em forma de cocos agrupadas em cachos, descrita por Ogston em 1880, denominada *Staphylococcus*, do grego *Staphyle* – cachos de uva – e *coccus* – grãos em 1882, relacionada a várias patologias humanas (BAIRD-PARKER, 1990). Morfologicamente, caracterizam-se como cocos Gram positivos, imóveis, apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuam sobre carboidratos com produção de ácidos são aeróbias e anaeróbias facultativas. Podem crescer entre 7 a 48°C com temperatura ótima entre 35 a 40°C (KLOSS & LAMBE JR., 1991).



Pertencente a família Micrococcaceae, o *Staphylococcus* apresenta diâmetro médio entre 0,5 e 1,5 micrômetros, são capazes de produzir um grande número de doenças, que variam desde lesões superficiais até severas infecções sistêmicas, no homem e em outros animais (HARVEY & GILMOUR, 1988; TORTORA et al., 2003).

Figura 5 *Staphylococcus aureus*. Fonte: MEDEIROS E.S., UFRPE/LDIC- 2008.

O gênero *Staphylococcus* foi separado em dois grandes grupos (coagulase positivo e coagulase negativo) com base na sua capacidade de coagular o plasma sanguíneo pela produção estafilocagulase. Loeb (1903) foi o primeiro a demonstrar a capacidade do *Staphylococcus spp* em coagular o plasma, utilizando o plasma de ganso (FOSTER et al., 1997).

Os *Staphylococcus spp* são os agentes etiológicos mais isolados em mastites (RABELLO, 2003). Os *Staphylococcus* crescem comparativamente bem sob condições de alta pressão osmótica e pouca umidade, o que explica parcialmente seu crescimento e

sobrevivência em secreções, alimentos que contenham pouca umidade (TORTORA et al, 2003). As espécies do gênero *Staphylococcus* são habitualmente comensais da pele e das mucosas do homem e de outros animais, no entanto suas características podem auxiliar a explicar as propriedades e as razões de sua patogenicidade, que pode se apresentar de várias formas.

A espécie mais importante do gênero é *Staphylococcus aureus*, assim denominado em decorrência da pigmentação amarela de suas colônias, onde *aureus* significa dourado. Seus representantes além das características comuns ao gênero são anaeróbios facultativos, porém se desenvolvem de maneira mais satisfatória aerobicamente (TORTORA et al., 2003). O *Staphylococcus aureus* possui as seguintes características: são cocos Gram positivos, coagulase positivos, β -hemolíticos, maltose e manitol positivos e formadores de colônias pigmentadas (JAY, 1994). Sua importância epidemiológica para o homem, está na capacidade que várias estirpes têm de produzir nos alimentos contaminados, toxinas causadoras de gastroenterites, destacando-se como o microrganismo de grande importância na incidência de mastite infecciosa nos rebanhos leiteiros mundiais, e em função de sua elevada resistência aos antibióticos, seu tratamento torna-se difícil (ZECCONI & HAHN, 2000).

Estas possuem elevada resistência térmica, portanto, não são inativadas pelos métodos térmicos tradicionais de tratamento do leite, como a pasteurização (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004). Caracteriza-se por uma variedade de fatores patogênicos que podem levar a danos nos tecidos da glândula, ao escape dos mecanismos de defesa e a neutralização natural ou adquirida de antibióticos. O *S. aureus* junto com o *Streptococcus uberis* foram identificados como os principais agentes causadores de mastites em 40 propriedades leiteiras orgânicas na região de Vermont/EUA (BARLOW, 2001). Em um estudo realizado por Costa et al. (2000) nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo o gênero *Corynebacterium* foi o de maior prevalência na etiologia da mastite bovina, seguido do gênero *Staphylococcus*, sendo que os *Staphylococcus* coagulase-positivos predominavam com uma porcentagem de 65,5%. O *S. aureus* é capaz de causar infecções de longa duração, com tendência a se tornarem crônicas, com baixa taxa de cura e grande perda na produção de leite (SABOUR et al., 2004).

De acordo Zecconi & Piccinini (2003) a presença do plasmídeo 2027-bp foi associada com a redução da resposta neutrofílica e aumentou a resistência frente a antimicrobianos β -lactâmicos, portanto, cepas que carregam este plasmídeo apresentam alta probabilidade de invadir e colonizar a glândula mamária, sobreviver a terapia antimicrobiana e tornar-se

indetectável. A multiresistência em *S. aureus* resulta da presença de plasmídeos, geralmente em múltiplas cópias, o que garante não somente a sua distribuição na divisão celular, mas principalmente permitem a transferência em frequência mais elevada Freitas (2003) sem causar na maioria das vezes um custo biológico para a célula bacteriana. Embora em amostras bovinas a resistência múltipla não seja muito freqüente, o envolvimento de plasmídeos de resistência a antibióticos e íons metálicos, tem sido demonstrado (PEREIRA, 1995).

Vários fatores podem interferir na cura bacteriológica quando se utiliza a terapia com antibióticos, seja devido ao estágio da ocorrência da infecção ou à presença de bactérias em abscessos, além da incapacidade de defesa das células (DINIZ et al., 1998).

2.4 Considerações gerais sobre Jurema Preta *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret.

A *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret é uma *Leguminosae*, subfamília *Mimosoideae*, facilmente encontrada na caatinga, espécie típica das áreas semi-áridas do Brasil (Cronquist, 1981) resistente à seca, com grande capacidade de rebrota durante todo o ano. É uma planta típica das regiões semi-áridas dos Estados do nordeste do Brasil (Piauí até a Bahia) Lima, 1996; Maia (2004) pelos animais criados na Caatinga pela sua abundância e palatabilidade (BRAID, 1993; SILVA et al., 1999c).

De porte arbustivo, com altura de 5 a 7 m, formando hastes de mais de 1,5 m de altura, com acúleos esparsos, eretos e bem agudos (BEZERRA, 2008). Possui caule ereto ou levemente inclinado, com ramificação abundante, desprendendo-se em porções delgadas escamiformes e ramos castanho-avermelhados, esparsamente aculeados. Apresenta casca rugosa, fendida longitudinalmente, pouco fibrosa (OLIVEIRA et al., 1999).



Figura 6 *Mimosa tenuiflora*. Fonte: PEREIRA A.V., UFCG/CSTR- 2008.

Encontrada preferencialmente em formações secundárias de várzeas com bom teor de umidade, de solos profundos, alcalinos e de boa fertilidade, com crescimento lento. Suas raízes têm uma alta capacidade de penetração nos terrenos compactos, sendo considerada uma planta com grande potencial como planta regeneradora de terrenos erodidos, é uma espécie indicadora de uma sucessão secundária progressiva ou de recuperação e sua tendência ao longo do processo é de redução da densidade (BEZERRA, 2008).

No nordeste a jurema preta tem sido explorada para produção de estacas e lenha por apresentar alta densidade básica ($0,77\text{g/cm}^3$) (ARAÚJO et al., 2004), além de que, os caprinos, ovinos e bovinos têm nessa planta, verde ou fenada, um importante componente de suas dietas, especialmente pastejando as rebrotas mais jovens no início das chuvas, bem como as folhas e vagens secas durante o período de estiagem. Diante da grande quantidade de jurema preta encontrada no semi-árido e da sua importância como forrageira, a jurema preta também faz parte do grupo de plantas tóxicas. Na literatura encontra-se relatos de que ingestão de jurema preta durante a gestação em bovinos, caprinos e ovinos, provocam defeitos congênitos Riet-Corrêa et al. (2006).

Silva et al. (1998) relataram casos de má formação fetal quando fêmeas prenhes ingerem a planta, não se sabe o princípio ativo da planta e não se tem relatos de intoxicações em machos. Em estudos realizados por Riet-Corrêa et al. (2006) observaram que maioria das malformações é causada pela ingestão desta planta, onde seu mecanismo de ação ainda não é conhecido, não havendo tratamento específico, onde a única forma de evitar que ocorra a ingestão da planta é impedindo o acesso dos ovinos e caprinos à áreas com jurema, principalmente, fêmeas, nos primeiros 60 dias de gestação, no entanto não descarta que outras podem ser as causas de malformações congênitas. Em identificação e análises quantitativas de substâncias antinutricionais (taninos e saponinas) na Jurema Preta, obtiveram 3,3% de tanino na forragem verde e 9,5% na matéria seca, identificando diferentes tipos de taninos: pirocatéquicos, e taninos que apresentam em sua estrutura ácido gálico, não sendo observada a presença de saponinas por nenhuma das metodologias adotadas (PEREIRA FILHO, et al., 2005). No entanto Paes et al. (2006) avaliaram o potencial tanífero da casca do caule de seis espécies florestais encontradas no semi-árido brasileiro, dentre elas a jurema preta com um percentual de 17,74% de taninos totais, sendo assim considerada um potencial como produtoras de taninos. De acordo com Simões (2003) a atividade antimicrobiana apresentada por algumas plantas está diretamente relacionada a presença deste metabolito nas mesmas, possuindo também caráter bactericida.

2.5 Considerações gerais sobre *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke

A jurema branca é uma planta da família *Leguminosae*, subfamília *Mimosoideae* conhecida vulgarmente no nordeste do Brasil como carcará, cassaco, jurema e rasga-beiço. Ocorre na caatinga, do Piauí até a Bahia, do tipo “arbórea densa” até a “arbustiva rala”, é uma planta pioneira que facilmente ocupa capoeiras e beiras de estrada, é tolerante a elevados níveis de perturbação da vegetação (SAMPAIO et al., 1998).

É uma árvore pequena com cerca de 2-4m de altura, com casca castanho-claro, fortemente armada por acúleos vigorosos, com capacidade de fixar nitrogênio no solo através de simbiose com bactérias na sua raiz (BEZERRA, 2008). É uma planta caducifólia, contém 2-12 sementes pequenas, ovais de cor marrom por vagem a sua madeira é de cor clara e sua floração ocorre na estação chuvosa, mas pode também ser encontrada na estação seca, seguida pela frutificação que se estende até a estação seca (MAIA, 2004).



Figura 7- *Piptadenia stipulacea* **Fonte:** Bezerra D. A. C., Rodovia Patos – Campina Grande/PB-2008.

As flores em espigas possuem de 4-8cm de comprimento, de cor alva, na extremidade dos ramos onde se encontram até três espigas por axila de folha. Seu fruto é do tipo vagem de cor castanho-pálido, com 8-12cm de comprimento, com superfície ondulada nas áreas onde ficam as sementes (MAIA, 2004). A *Piptadenia stipulacea* é muito usada na medicina popular nos processos inflamatórios e estudos científicos confirmam sua atividade antibacteriana e antifúngica (CHIAPPETA, 1984).

2.6 Considerações gerais sobre Taninos

Os taninos são fenóis comuns em plantas, considerados atóxicos em quantidades e condições normais, com exceção dos fenóis poliméricos, taninos que possuem a habilidade de complexar e precipitar proteínas de soluções aquosas (SALUNKHE et al., 1990).

Ocorrem na maioria das plantas superiores, em diferentes quantidades, geralmente são obtidos da madeira e/ou casca de muitas folhosas e da casca de algumas coníferas (GONÇALVES, 2001). São amplamente distribuídos dentro do reino vegetal, sendo comuns tanto em espécies gimnospermas como angiospermas. Dentro das angiospermas, os taninos são mais comuns nas dicotiledôneas do que nas monocotiledôneas.



Figura 8 Taninos isolados de *M. tenuiflora*. **Fonte:** PEREIRA A.V., UFCG/CSTR- 2009.

Ocorrem na maioria das plantas superiores, em diferentes quantidades, geralmente são obtidos da madeira e/ou casca de muitas folhosas e da casca de algumas coníferas (GONÇALVES, 2001). São amplamente distribuídos dentro do reino vegetal, sendo comuns tanto em espécies gimnospermas como angiospermas. Dentro das angiospermas, os taninos são mais comuns nas dicotiledôneas do que nas monocotiledôneas. Algumas famílias de dicotiledôneas ricas em taninos são as leguminosae, anacardiaceas, combretaceas, rhizoporaceae, mirtacea, polinaceae (VALENTIM, 2006).

Entre as famílias que apresentam tanino estão às leguminosas, anacardiáceas, mirtáceas e rubiáceas. Os taninos pertencem a um grupo de compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas Butler et al. (1984) e são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas (HASLAM, 1989). De ocorrência natural em plantas, os polifenóis exercem grande influência no valor nutritivo de forragens por apresentar alto peso molecular, entre 500 a 3000 Mangan (1988) e contêm grupos hidroxila-fenólicos em quantidade suficiente para permitir a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas (DESHPANDE et al., 1986).

Na forma não oxidada, os taninos reagem com as proteínas através de pontes de hidrogênio e/ou ligações hidrofóbicas entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas, emprestando uma duradoura estabilidade a estas substâncias, e quando oxidados, se transformam em quinonas, as quais formam ligações covalentes com alguns grupos funcionais das proteínas, principalmente os grupos sulfídricos da cisteína e *ε*-amino da lisina (NOZELLA, 2001). Para a formação destas ligações é necessário que o peso molecular dos taninos esteja compreendido entre limites bem definidos; se este é demasiadamente elevado, a molécula não pode se intercalar entre os espaços interfibrilares das proteínas ou macromoléculas; se é muito baixo, < 500 a molécula fenólica se intercala, mas não forma um número suficiente de ligações que assegure a estabilidade da combinação (BRUNETON, 1991; MONTEIRO, et al., 2005). O tanino pode ser retirado dos vegetais por diferentes solventes tais como água, acetona, etanol ou por soluções aquosas com alguns sais como sulfito de sódio, carbonato de sódio, entre outros, porém não é economicamente viável a utilização de reagentes no processo de extração, visto que a extração em água é bastante eficiente e de baixo custo Marinho (2004) podendo ser classificados em hidrolisáveis e condensados e estes últimos têm grande poder de ligação e podem condensar com formaldeído, produzindo um polímero de estrutura tridimensional, reticulada e com alto peso molecular chamada de resina (GONÇALVES, 2001).

Um aspecto importante para o emprego de tanino na produção de adesivos é o seu teor de componentes polifenólicos reativos (condensáveis). Na determinação do teor de polifenóis, os taninos do tipo flavanol são precipitados através da condensação com formaldeído em meio ácido (reação de Stiasny) (WISSING, 1955). Os taninos são utilizados no curtimento de pele animal desde longa data pela sua capacidade de se combinar com proteínas da pele. A substância tanante tem o poder de transformar pele animal em couro devido à sua atuação adstringente de retirar a água dos interstícios das fibras, contrair tecidos orgânicos moles e impedir a sua putrefação (GONÇALVES, 2001).

São bons inibidores enzimáticos, usados como antídotos contra alcalóides e metais pesados, por anular a absorção de substâncias irritantes, apresentam ações terapêuticas, como hemostático no sangramento nasal e uterino, também diminuem as secreções e infecções, tem excelente atividade como cicatrizante e é utilizado em lesões tais como: queimaduras e ferimentos (MITIDIERO, 2002).

Deve-se ter cuidado com o uso de taninos, pois podem provocar irritação gástrica e alguns possuem efeito carcinogênico (MITIDIERO, 2002). De acordo com Loguercio, et al.

(2005) o mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos explica-se por três hipóteses; a primeira pressupõe que os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexão com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

Taninos são polifenóis tidos como inibitórios para crescimento dos microrganismos devido à formação de complexos entre os taninos e a parede celular dos microrganismos ou enzimas extracelulares secretadas, fazendo com que ocorra a inibição do transporte de nutrientes para a célula (MCSWEENEY et al., 2001). Guimarães-Beelen et al. (2006) e Jones et al. (1994) afirmam que, por possuir habilidade de inativar adesinas microbianas, enzimas, proteínas transportadoras de membranas entre outras; e que, em presença de taninos, algumas bactérias são submetidas a modificações morfológicas tais como alongação das células, presença de grande quantidade de material extracelular e formação de microcolônias aderentes, se ligam as paredes celulares de bactérias impedindo o seu crescimento.

3 REFERÊNCIAS

- ANUALPEC - **Anuário da Pecuária Brasileira**. Disponível em: www.fnp.com.br Acesso em 2009.
- ARAÚJO, L. V. C.; LEITE, J. A. N.; PAES, J. B. Estimativa da produção de biomassa de um povoamento de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (willd.) poiret. com cinco anos de idade. **Biomassa & Energia**. v. 1, n. 4, p. 347-352, 2004.
- BARLOW, J.W.; MCCRORY, L.; MULLOT,E.; BAHRAWY, D.; WOODARD, S.; CRAFT, L; MURDOUGH, P.; PNAKEY, J. W. Evaluation of a homeopathic nosode for mastitis prevention. In: International symposium on mastitis and milk quality, 2., 2001,Vancouver. **Proceedings...** Vancouver, 2001. p.258-262.
- BARRAGY, T. B. Bovine mastitis In: **Veterinary Drug therapy New York**: Lea e Febiger, p.655-687, 1994.
- BEZERRA,D.A.C. Estudo Fitoquímico, Bromatológico e Microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. 63f. (Dissertação - Mestrado em Sistemas Agrosilvopastoris no Semi-Arido) Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Patos, 2008.
- BORN, G. C. C. Plantas Medicinais da Mata Atlântica (Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil): extrativismo e sustentabilidade. 289 f. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2000.
- BRAID, E. C. M. **Diagnóstico Florestal do Estado do Ceará**. Fortaleza: PNUD/FAO/IBAMA/SDU/SEMACE. 1993.
- BRAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococci: an introduction. **Journal Applied Bacteriology**. Oxford, v.19, p.15-85, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Rebanho bubalino brasileiro** - Efetivo por Estado. 1983. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em 02 de outubro de 2009.
- BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Ed. Acribia, SA: Espanha, 1991.
- BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, J. P.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G.; THOMAZ, L. W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.35, n.4, p.848-854, jul/ago. 2005.

- BUTLER, L.G.; RIEDL, D.J.; LEBRYK, D.G.; BLYTT, H.J. Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. **Journal of American Oil Chemistry Society**. v.61, n.5, p.916-920, 1984.
- CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.M.C. Factors affecting somatic cells count and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v.85. p.2885-2889, 2002.
- CHIAPPETA, A. D. A; DE MELLO, J. F. Higher Plants with Biological Activity. Plants of Pernambuco. **Revista do Instituto de Antibióticos**. v.11, p. 99-111, 1984.
- COSTA, E. O. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL). **Napgama**. São Paulo, n.2, p.18-21, 2005.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press. New York. 1981.
- CRUZ, L. C. H. **Micologia veterinária**. Itaguaí: Imprensa Universitária. p.191-192, 1985.
- CULLOR, J. S. The control, treatment, and prevention of the various types of bovine mastitis. *Veterinary Medicine Food Animal Practice* v.88, p. 571-579, 1993.
- DESHPANDE, S.S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D.K. Tannin analysis of food products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.24, p.401-449, 1986.
- DINIZ, M.A.P.R.; BRANDÃO, S.C.C.; FARIA, E. et al. Tratamento de mastite subclínica e clínica, em vacas lactantes, com ácido acetilsalicílico, mastenzin associação mastenzin com ácido acetilsalicílico. **Hora Veterinária**, Porto Alegre n.18, p.27-33, 1998.
- DUVAL, J. **Treating mastitis without antibiotics**. EAP Publication. p.69, 1997.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, p.1315-1320, 2004.
- FEO, M. Diagnóstico rápido de *Candida albicans*. **Revista Latino Americana Microbiologia**, v.15, p.217-218, 1973.
- FERNANDES, D. Vaca seca: Onde começa o lucro com leite. **Atualização Técnica 37**, Div. Agropec. Pfizer, 2006. Disponível em www.pfizersaudeanimal.com.br/bov_atualizações 5. asp. Acesso em 25/09/2009.
- FIGUEIREDO, J. B. Mastite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa. Belo Horizonte. **Anais**. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, XI, p.176-94, 1995.

- FONSECA, W. **Búfalo: estudo e comportamento**. São Paulo: Editora Ícone, p.405, 1987.
- FOSTER, G.; ROSS, H. M.; HUTSON, R. A.; COLLINS, M. D. *Staphylococcus lutrae* sp. Nov., New Coagulase-positive Species isolated from otters. **International Journal of Bacteriology**, v.47, n.3, p.724-726, 1997.
- FREITAS, D.B. Atividade antimicrobiana de fluorquinolonas e ação sobre plasmídeos em amostras de *Staphylococcus aureus* humanas e bovinas. 85f. (Dissertação de mestrado em Genética). Universidade Federal da Paraíba/UFPB. João Pessoa, 2003.
- GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária dos alimentos**. São Paulo: Varela, p. 629, 2001.
- GONÇALVES C. A.; LELIS R.C. C. Teores de taninos da casca e da madeira de cinco leguminosas arbóreas. **Floresta e Ambiente**. v. 8, n.1, p.167 - 173, 2001.
- GONÇALVES O. Estruturação pode alavancar cadeia produtiva de búfalos www.usp.br/agen/p=3268. Acesso em 12 de outubro de 2009.
- GONÇALVES, D. Caracterização molecular de isolados de *staphylococcus aureus* e produção de marcadores genéticos para diagnóstico de mastite em bovinos leiteiros. 229 f. Tese (Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- GUIMARÃES-BEELLEN P.M.; BERCHIELLI, T.T.; BUDDINGTON, R. R. BEELLEN. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, n.5, p.910-917, 2006.
- HARVEY, J.; GILMOUR, A. Isolation and characterization of staphylococci from goats likes produced in Northern Ireland. **Letters In Applied Microbiology**. v. 7, p. 79-82. 1988.
- HASLAM, E. **Plant polyphenols-vegetable tannins revisited**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.
- IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação e Agropecuária, **Pesquisa da Pecuária Municipal 2003**. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em 25 de junho de 2009.
- JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Espanha: ed. Acribia, p.804, 1994.
- JONES, G. A.; McALLISTER, T. A.; MUIR, A. D. et al. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 60, p. 1374-1378, 1994.

- JUNGERMAN, P. F.; SCHWARTZMAN, R. M. **Veterinary medical mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.61-72, 1972.
- KLOSS, W. E.; LAMBE, JR.. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A. Manual of Clinical Microbiology. 5 ed. Washington, D. C.: **American Society for Microbiology**. p.1500-1510, 1991.
- LADEIRA, S.R.L. Mastite bovina. In: **Doenças de ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Liv. Varela, v. 1, p. 426, 2001.
- LANGONI, H. Complexidade etiológica na mastite bovina In: **ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, III**, 1999. Botucatu, SP. Anais... Botucatu, 1999, p.3-18.
- LIMA, J. L. S. **Plantas Forrageiras das Caatingas – usos e potencialidades**. EMBRAPA-CPASA/PNE/RB-KEW. Petrolina. 1996.
- LISBOA, C. S.; PIANTA, C. Redução da mastite através do tratamento duplo no período seco. In: XIV, Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias **Anais...**, Acapulco, México, p.32, 1994.
- LOEB, L. The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. **Journal of Medical Research**. v.10, p. 407, 1903.
- LOGUERCIO A.P.; BATTISTIN A.; VARGAS A. C.; HENZEL A.; WITT N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**. v.35, n.2, 2005.
- MAHAPATRA, S.; KAR, B.C.; MISRA, P.R. Occurrence of mycotic mastitis in buffaloes of Orissa. **Indian Veterinary Journal**. v. 73, p. 1021-3, 1996.
- MAIA, G. N. **Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo D&Z Computação Gráfica e Editora. p.237-246, 2004.
- MANGAN, J.L. Nutritional effects of tannins in animal feeds. **Nutrition Research Reviews**.v.1, p.209-231, 1988.
- MARIANTE, A. S.; MCMANUS, C.; MENDONÇA, J. F. **Country report on the state of animal genetic resources**. Brasília: Embrapa/Genetic Resources and Biotechnology, p. 121, 2003. (Documentos, n.99).
- MARINHO, I.V. Avaliação do potencial tanífero das cascas do angico vermelho *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina* (Vell.) Brenan e do cajueiro *Anacardium occidentale* Linn. em diferentes reagentes. 2004. 36f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2004.

- MCSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; BUNCH, R. ; KRAUSE, D.O. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *J. Applied Microbiology*. v. 90, p. 78-88, 2001.
- MENDONÇA, C. L.; FIORAVANT, M. C. S.; SILVA, J. A. B. A. Etiologia da mastite bovina. *Veterinária Notícias*. v. 5, n. 1, p. 107-118, 1999.
- MITIDIERO, A.M.A. Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira: avaliação dos aspectos sanitários e de produção. 132f. (Dissertação - mestrados em Agroecossistemas) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC , Brasil, 2002.
- MONTEIRO J.M.; ALBUQUERQUE U.P.; ARAÚJO E. L.; AMORIM E.L.C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*. v. 28, n.5, 2005.
- MOUSSAOUI, F.; MICHELUTTI, Y. R.; LAURENT, F. Mechanisms involved in milk endogenous proteolysis induced by a lipopolysaccharide experimental mastitis. *Journal of Dairy Science*. v.85. p.2562-2570, 2002.
- NAIKNAWARE, H.S.; SHELKE, D.D.; BHALERAO, D.P.; KESKAR, D. V., JAGADESH, S.; SHARMA, L. K. Prevalence of subclinical mastitis in buffaloes in and around Mumbai. *Indian Veterinary Journal*. v. 75, p. 291-2, 1998.
- NASCIMENTO, C. N. B.; CARVALHO, L. O. D. M. Criação de Búfalos: **alimentação, manejo, melhoramento e instalações**. Brasília: EMBRAPA- SPI. p.403, 1993.
- NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. L. P.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.14, p.05-08, 2003.
- NOZELLA E. F. Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes. 120f. (Dissertação - Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- OLIVEIRA A. A. F. Avaliação da citologia aspirativa e de expressão no diagnóstico da mastite bubalina e pesquisa de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* toxigênicas e produtoras de beta-lactamase. 123 f. (Tese- Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu, 2003.
- OLIVEIRA, A. A. F.; FONSECA, L. S.; FERREIRA, I.; BASSANI-SILVA, S.; ANDRADE, F. H. E.; ROCHA, N. S. Avaliação da Citologia Aspirativa e de Expressão no Diagnóstico

- da Mastite Bubalina. Revista Universidade Rural. **Série Ciências da Vida**. v. 27, p. 143-144, 2007.
- OLIVEIRA, M. R.; RODRIGUES, J. M. E.; CHIAVONE-FILHO, O.; MEDEIROS, J. T. N. Estudo das condições de cultivo da Algaroba e Jurema preta e determinação do poder calorífico. **Revista de Ciência & Tecnologia** v.14 – pp. 93-104, 1999.
- PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; MARINHO, I. V.; LIMA, C. R. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro. **Cerne**. v. 12, n. 3, p. 232-238, 2006.
- PEREIRA FILHO, J. M.; VIEIRA, E. L.; KAMALAK, A.; SILVA, A. M. A.; CEZAR, M. F. E.; BEELEN, P. M. G. Correlação entre o teor de tanino e a degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta do feno de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret) tratada com hidróxido de sódio. **Livestock Research for Rural Development**. v.17, art.91., 2008. Retrieved from <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17>. 2005.
- PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**. v.20, p.391-395,1995.
- PRESTES, D. S.; FILATI, A.; CECIM, M. S. Suscetibilidade à mastite: fatores que a influenciam- uma revisão. **Revista Faculdade Zootecnia Veterinária e Agronomia**. v.9, n.1, p-48-59, 2003.
- RABELLO, R. F. ; SILVA, J. G. ; CASTRO, A. C. D. Susceptibilidade aos antimicrobianos e diversidade genética de amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isoladas de casos de mastite subclínica no Estado do Rio de Janeiro. In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003, **Anais...** Florianópolis. Compact Disk - XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Manaus : Videolar SA, p.100, 2003.
- REIS, S. R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.55, n.6, p.651-658, 2003.
- RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; DANTAS, A. F. M. **Plantas Tóxicas da Paraíba**. Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos, PB. Ed. SEBRAE/PB. p. 58. 2006.
- ROSA, B. R. T.; FERREIRA, M. M. G.; AVANTE, M. L.; FILHO, D. Z.; MARTINS, I. S. Introdução de búfalos no Brasil e sua aptidão, leiteira. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. n.8, 2007.
- SABOUR, P.M.; GILL, J. J.; LEPP, D.; PACAN, J. C.; AHMED,R. ; DINGWELL, R.; LESLIE, K. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern

- Canadian Dairy Herds. **Journal of Clinicate Microbiology**, Washington, v.42, p.3449-3455, 2004.
- SAINI, S.S; SHARMA, J.K.; KWATRA, M.S. Prevalence and etiology of subclinical mastitis among crossbred cows and buffaloes in Punjab. **Indian Veterinary Journal**. v. 47, p. 103-6,1994.
- SALUNKHE, D.K.; CHAVAN, J.K.; KADAM, S.S. **Dietary tannins: Consequences and remedies**. Boca Raton: CRC Press, p.1-310,1990.
- SAMPAIO, E. V. S. B., ARAÚJO, E.L. DE., SALCEDO, I. H. & TIESSEN, H. Regeneração da vegetação de Caatinga após corte e queima, em Serra Talhada, PE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.33, n.5, p. 621-632, 1998.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Chichester, v.30, n.12, p.3875-3883, 1991.
- SIILVA, M. G. S. ; SILVA, E. G. ; DUARTE, H. S. ; ROCHA, G. . ANALISE Qualitativa e quantitativa de substancias antinutricionais em leguminosa forrageira jurama preta (*Mimosa hostilis* Benth). In: VIII Congresso de Iniciação Científica UFRPE, 1998, Recife. **Anais...** Imprensa universitária. v. 8. p. 252-252, 1998.
- SILVA, A. M. A.(c); PEREIRA FILHO, J. M.; SOUZA, I. S. et al. Aceitabilidade por Ovinos a Espécies Lenhosas do Semi-Árido Paraibano. **In: XXXV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, XXXV 1989**. Botucatu: **Anais...** Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia. 1999.
- SILVA, M. S. T.; JUNIOR, J. B. L.; MIRANDA, H. Á.; et al. **Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PRONAF**. Pará, agosto de 2003. Disponível em: www.cpatu.br/bufalo. Acesso em 15/09/2009.
- SILVA, N. (b); CARDOSO, H. F. T.; SENA, M. J.; CARMO, L. S. Produção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico por *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino em Minas Gerais **Revista Napgama**. v. 2, n. 5, p. 12-14, 1999.
- SILVA,N. (a). Diagnóstico de mastite em animais de importância econômica. In: **ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, III, 1999**. Botucatu, SP. Anais... Botucatu, 1999, p. 51-55.
- SIMÕES, C.M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Santa Catarina: UFSC, 2003.
- SINGH, P. J.; SINGH, K.B. A study on economic losses due to mastitis in India. **Indian Journal of Dairy Science**, v.47, p. 265-72, 1994.

- TIJARE, D. B.; SINGH, V. K.; CHATUTURVEDI, V.K.; DHANESAR, N.S. Sensitivity of indirect tests in detection of subclinical mastitis in buffaloes. **Indian Veterinary Journal**. v. 76, p. 912-5, 1999.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CESE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- VALE, W.G. Prospects of buffalo production in Latin America. In: IV Congresso Mundial de Criadores de Búfalos. **Proceedings...**, São Paulo, p. 75-87, 1994.
- VALENTIM A. P. T. Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stagnocarpa* Mart. Ex Hayne (jatobá).109f. (Dissertação – Mestrado em Biotecnologia de produtos Bioativos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- VASCONCELOS, A. G.; BRANQUINHO, F. B.; SANCHEZ, C. ; LAGE, C. L. S. Fitofármaco, fitoterápico, plantas medicinais: o reducionismo e a complexidade na produção do conhecimento científico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 103-105, 2002.
- WAGENLEHNER F.M.; NABER K. G. “Treatment of bacterial urinary tract infections: present and future”. **Revista virtual de urologia**, v. 49, p. 235-244, 2006.
- WISSING, A. The utilization of bark II. Investigation of the Stiasny-reaction for the precipitation of polyphenols in Pine bark extractives. **Svensk Papperstidning**, v.58, n. 20, p.45-750, 1955.
- YUNES R.A.; PEDROSA R.C.; CECHINEL FILHO V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, p.147-152, 2001.
- ZAVA, M. A. R. A. **Produção de Búfalos** – Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1984.
- ZAVA, M. A. R. A. **Produção de búfalos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, p.237, 1987.
- ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, v.345, p.15- 18, 2000.
- ZECCONI, A.; PICCININI, R.; FOX, L. K. Epidemiologic study of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* during a control program in nine commercial dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 223, p.684-688, 2003.

CAPÍTULO 2

PEREIRA, Andréia Vieira. **Estudo comparativo da atividade antimicrobiana (*in vitro*) de extratos de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke.** Patos, PB: UFCG, 2010. 100p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido).

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de extratos etanólico de *Mimosa tenuiflora* e *Piptadenia stipulacea* sobre amostras de *Staphylococcus spp*, coagulase positiva e negativa, isoladas de mastite clínica e sub-clínica de búfalas, comparando a atividade de antibióticos sintéticos utilizados no controle desta infecção. Os testes de sensibilidade *in vitro* foram realizados utilizando o método de difusão em meio sólido. Em seguida foram inoculados 50µL do extrato nas seguintes diluições 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 a 48 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado final foi determinado pela média aritmética dos halos de inibição. A avaliação microbiológica destes ensaios demonstrou que os extratos das cascas da jurema-preta e jurema-branca apresentaram halos de inibição entre 05 a 20mm e 05 a 12mm de diâmetro respectivamente. O microrganismo utilizado, neste estudo, apresentou resistência a alguns antibióticos comerciais, com maior percentagem a Eritromicina 47,5% e menor a Cefquinome com 4,2%. O extrato de jurema preta apresentou atividade antimicrobiana satisfatória sobre o microrganismo testado proporcionando resultados superiores aos obtidos com o extrato de jurema-branca e os antibioticos sintéticos.

Palavras -chave: Fitoterapia, Microbiologia, antibióticos sintéticos.

PEREIRA, Andréia Vieira. **Comparative study of the antimicrobial activity (*in vitro*) of extract of *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke.** Patos, PB: UFCG, 2010. 100p. (Dissertation – Magister Science in Animal Science – Agroforestry Systems in Semi-arid).

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of ethanol extracts of *Mimosa tenuiflora* and *Piptadenia stipulacea* on strains of *Staphylococcus spp*, coagulase positive and negative, isolated from mastitis clinical and subclinical of buffaloes, comparing the activity of synthetic antibiotics used in the control this infection. Sensitivity tests *in vitro* were performed using the diffusion method on solid media. Then they were inoculated 50µL of extract on the following dilutions 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32. The plates were incubated at 37 ° C for a period of 24 to 48 hours. The tests were performed in triplicate and the final result was determined by the arithmetic mean of the inhibition halo. The microbiological evaluation of these tests showed that the extracts of the Jurema preta and Jurema branca presented inhibition zones between 05 to 20mm and 05 to 12mm in diameter, respectively. The microorganism used in this study was resistant to some antibiotics trade, with the highest percentage erythromycin 47.5% and lower cefquinome 4.2%. The jurema preta extract showed satisfactory antimicrobial activity on the microorganism tested providing superior results to those obtained with the jurema branca extract and synthetic antibiotics.

Keywords: Phytotherapy, Microbiology, synthetic antibiotics.

1 INTRODUÇÃO

A mastite é a principal afecção da glândula mamária, que afeta acentuadamente a produção leiteira mundial, pela redução na capacidade produtora dos rebanhos infectados (SILVA, 1999), pela queda na qualidade do produto final com diminuição no rendimento industrial para fabricação de derivados e pelas alterações na composição do leite mamático (LANGONI, 1999). Podendo ser considerada como um fator limitante para a cadeia produtiva do leite trazendo grandes impactos econômicos negativos na indústria de laticínios.

É um processo de caráter principalmente infeccioso, onde esta envolvida uma série de microrganismos, comumente de origem bacteriana, e possivelmente os fungos e leveduras, as algas e mais raramente, os vírus (LANGONI, et al.1998). Kirk, 1994 pondera que as mastites subclínicas são responsáveis por 10% a 11% de perda na capacidade produtiva/vaca/ano. A utilização prolongada de antibióticos, associado a fatores como doenças crônicas, imunodebilitantes, metabólicas, presença prévia de infecções por vírus ou bactérias, alimentos ricos em glicose e maltose, deficiências vitamínicas, senilidade e stress, causam o desequilíbrio bactéria/fungo que favorece o desenvolvimento e a multiplicação sem controle do microrganismo, tornando-o um agente infeccioso (CRUZ et al. 1985). Contudo, para considerá-las patogênicas, há necessidade de encontrá-las em grande quantidade (CRUZ, et al. 1985).

Verifica-se na atualidade que apesar da disponibilidade de vários antimicrobianos para tratamento da mastite, o problema de resistência dos microrganismos a estes se acentuou pelo uso indiscriminado e inadequado, particularmente no Brasil (COSTA, 1996). O insucesso do tratamento também pode relacionar-se a capacidade de sobrevivência intracelular de algumas bactérias e também a alterações anatomopatológicas induzidas por certas infecções impedindo o acesso do medicamento no foco (BARRAGY, 1994). Além dos altos custos com o tratamento há uma preocupação crescente com a presença de resíduos de antibióticos no leite gerando uma busca de métodos alternativos para a abordagem clássica dos antibióticos (COSTA et al., 1996).

A fitoterapia tem sido utilizada em todas as áreas da saúde como forma alternativa de tratamentos constituindo uma forma de terapia medicinal que vem crescendo notadamente nestes últimos anos. Embora apenas recentemente as plantas tenham seu potencial terapêutico investigado, há informações de que os produtos naturais e as preparações fitoterápicas são responsáveis por 25% do receituário tanto na medicina humana como para a animal nos países

desenvolvidos e cerca de 80% nos países em desenvolvimento (GALES et al., 1997), o que faz da fitoterapia uma das práticas mais antigas e mais usadas no mundo. As propriedades terapêuticas dos princípios e medicamentos fitoterápicos começam a ganhar cada vez mais espaço no tratamento veterinário, profissionais adeptos da fitoterapia revelam alta frequência de sucessos em tratamento de parasitoses e enfermidades infecciosas, inclusive em tratamentos de mastites (COSTA, 1998).

Os vegetais são uma excelente fonte de busca de novas drogas antimicrobianas, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química (NOVAIS et. al., 2003). Aproximadamente 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). Típica de áreas semi-áridas do Brasil, a jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) é leguminosa da subfamília *Mimosoideae* (CRONQUIST, 1981), característica da caatinga, que apresentam grande potencial de produção de forragem e constituem, na maioria das vezes, a principal fonte de alimentação animal nesta região (CALDAS PINTO, 2006). Há ainda estudos que indicam seu potencial antimicrobiano, analgésico, regenerador de células, antitérmico e outras (MAIA, 2004). Produtos contendo *M. tenuiflora* têm sido cada vez mais distribuídos pelo mundo, porém muitas informações a respeito dos seus efeitos ainda não são muito seguras (DE SOUZA, 2002). A jurema-branca (*Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke) é leguminosa da subfamília *Mimosoideae*, é também comum no Nordeste brasileiro e conhecida vulgarmente como carcará, jurema e rasga-beiço, é apreciada como alimento por ovinos, caprinos e bovinos principalmente na estação seca quando não há pastagens para sua alimentação.

Porém, seu uso pelas populações locais vai além do seu valor forrageiro, sendo utilizada também como madeira, carvão (MAIA, 2004). Quanto às suas propriedades medicinais, é uma planta ainda desconhecida pela população, que a reconhecem apenas como planta comum na região, mas sem indicação terapêutica. Em estudos etnobotânicos, Albuquerque & Andrade (2002), relatam o uso da *P. stipulacea* na medicina popular como anti-inflamatório, a partir do decocto ou tintura preparados com a casca do seu caule. Assim como as espécies de jurema citadas, inúmeras outras plantas nativas da Caatinga têm sido usadas pelas populações locais e algumas descritas na literatura como de importante valor medicinal.

Este trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana de extratos etanólico de dos extratos etanólicos de *M. tenuiflora* e *P. stipulacea* sobre amostras de *Staphylococcus spp*

coagulase positiva e negativa, isoladas de mastite clínica e sub-clínica de búfalas, comparando a atividade de antibióticos sintéticos utilizados no controle das mastites em bubalinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios Multiusuário de Pesquisas Ambientais - LAMPA da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG do Centro de Saúde e Tecnologia Rural-CSTR, e Laboratório de doenças infecto contagiosas da UFRPE.

A coleta da casca da jurema preta e jurema branca foi realizada em julho de 2007 no Centro de Saúde e Tecnologia Rural - CSTR, Campus de Patos – UFCG, sob coordenadas (GPS) 07° 03' 27" a 07° 03' 39" de latitude sul e 37° 16' 21" a 37° 16' 38" de longitude oeste de Greenwich. A casca da jurema branca foi coletada em novembro de 2006, na Rodovia que liga Patos a Campina Grande, entre os Km 22 e 23, entre os municípios de Juazeirinho e Soledade-PB.

As excisas foram depositadas no Herbário Caririensis Dárdano de Andrade Lima, da Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, sob os respectivos números de registro #3274 e #3275. Após a coleta e identificação botânica a amostra foi acondicionada em sacos de papel comum, aerados e em seguida postas para secagem em estufa de ventilação forçada a 40°C. Após 72 horas a amostra foi moída e acondicionada em reservatórios de vidro estéreis até seu uso.

2.1 Obtenção do extrato etanólico

Para formulação dos extratos foram utilizados 500g do material vegetal e adicionado 1L de álcool etílico P.A, deixando a mistura sob extração por 72h, a determinação e concentração foram realizadas segundo a metodologia de Matos (1997). Os extratos foram diluídos em: 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32 para a determinação da atividade antimicrobiana das plantas testadas.

2.2 Quantificação do TTC (Teor de Taninos Condensados) do extrato de *Mimosa tenuiflora* e *P. stipulacea*

Os extratos vegetais foram colocados na estufa (105°C) durante um período de 24hs, com a finalidade de desidratação. Após o tempo determinado a amostra foi colocada em um dessecador por mais ou menos 20 minutos. Em seguida a amostra foi pesada, quantificando os taninos condensados e hidrossolúveis da amostra.

Das amostras obtidas foram utilizados 2,5g do tanino respectivamente (duplicata) e posto em balão de fundo chato com capacidade de 100mL sendo adicionado 50ml de álcool para dissolver o tanino. Em seguida foi adicionado 4 ml de formaldeído e 1 ml de ácido clorídrico sendo submetido a fervura por 30 minutos segundo a metodologia de Stiasny. De acordo com Guangcheng, et al., 1991, os taninos condensados reagem com o formaldeído em meio ácido. A solução é filtrada, sendo fixados no papel os taninos que formam complexos insolúveis.

Após a filtragem, o material foi transferido para um copo Becker de 250 mL e seco a $103 \pm 2^\circ\text{C}$, por 24 horas. Após a secagem, calculou-se o Índice de Stiasny, conforme equação a seguir:

$$I (\%) = \left(\frac{M_2}{M_1} \right) \cdot 100$$

Em que:

I = Índice de Stiasny (%);

M1 = Massa de sólidos em 100 mL de extrato;

M2 = Massa do precipitado taninos – formaldeído.

Após a obtenção do Índice de Stiasny foi calculado o teor de taninos condensados (TTC), conforme a Equação a seguir:

$$TTC (\%) = \frac{TST \cdot I}{100}$$

Em que:

TTC = Teor de taninos condensados (%);

TST = Teor de sólidos totais (Equação 1);

I = Índice de Stiasny (Equação 2).

2.3 Aquisições de amostras de *Staphylococcus* de animais infectados

Secreções lácteas foram coletadas de 96 búfalas leiteiras, perfazendo um total de 384 amostras, no período de maio a junho de 2008, a coleta das amostras foi realizada após lavagem das tetas com água e sabão, secagem com papel toalha e desinfecção do óstio do teto, utilizando-se álcool etílico a 70° GL. Coletou-se aproximadamente 5 ml de leite por quarto mamário, de maneira asséptica, com tubo inclinado na posição horizontal (BOUCHOT et al., 1985). As amostras foram armazenadas em tubos rosqueados estéreis, identificados e enviados sob refrigeração em caixas de material isotérmico, para a realização do exame microbiológico, e identificação do *Staphylococcus aureus* no Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas da Universidade Federal de Pernambuco, onde foram processadas. As amostras foram previamente homogeneizadas e posteriormente, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em placas de Petri contendo ágar-base acrescido de 5% de sangue desfibrinado de ovino. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C e a leitura foi realizada 24 e 48 horas após. Para a identificação da bactéria, foram observadas as características macromorfológicas das colônias e microscópicas à técnica de Gram seguindo a técnica de Quinn et al. (1994).

Para a identificação de *S. aureus* todas as cepas de estafilococos foram submetidas aos testes de produção de coagulase livre (Plasma Coagulase EDTA, Coagu-Plasma LB – Laborclin, Brasil), DNase (Agar DNase - DFICO) e catalase (SILVA et al., 1997), sendo que das 384 amostras 68 foram identificados *Staphylococcus* coagulase negativa, sendo identificando *S. coagulase* positiva em 3 animais. As provas de produção de acetoina, fermentação da glicose (anaerobiose) e do manitol (aerobiose e anaerobiose) foram realizadas de acordo com Mac Faddin (1980).

Após a realização dos testes, os isolados foram classificados em *Staphylococcus spp*, *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) e em *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) quando a bactéria não coagulava o plasma de coelho, apresentava características de estafilococos na técnica de coloração de Gram, fermentava a glicose em anaerobiose e produzia a catalase (BAIRD-PARKER, 1990).

2.4 Ensaio comparativos

O teste comparativo com os antibióticos para avaliar a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos isolados foram realizados utilizando-se a técnica de difusão em ágar Mueller Hinton segundo Bauer et al. (1996). Utilizaram-se os seguintes discos impregnados de antibióticos:

gentamicina (10 mcg), amoxicilina (10 mcg), ciprofloxacina (5mcg), penicilina + novobiocina (10 mcg), cefquinome (30 mcg), florfenicol (30mcg), azitromicina (15 mcg), eritromicina (15 mcg), tetraciclina (30 mcg) + neomicina (30 mcg) + bacitracina (10 mcg), enrofloxacina (5 mcg). Para o teste utilizando os extratos etanólicos sobre as linhagens bacterianas, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela atividade antimicrobiana, com base no diâmetro dos halos de inibição, sendo estes superiores a 11mm, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por um período de 24h. (CATÃO, 2006). Foram feitas cavidades de aproximadamente 6 mm de diâmetro no ágar-base, as quais receberam 50µL da solução do extrato diluído em água destilada, de acordo com as diluições pré-estabelecidas e para o controle negativo utilizou-se água destilada. A sensibilidade da amostra foi considerada para medidas superiores a 11 mm, para o extrato (CATÃO, 2006). A análise estatística foi do tipo descritivo, calculando-se as frequências absolutas e relativas (SAMPAIO, 1998).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados dos ensaios com os extratos de jurema preta e jurema branca

O teste antimicrobiano feito com o extrato da casca de jurema preta observou-se que os *Staphylococcus* coagulase negativa e positiva testada se mostrou eficaz nas diluições de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16, com formação de halos que variaram entre 5 e 20 mm de diâmetro (Figura 9). No entanto os microorganismos testados frente ao extrato de jurema branca se mostraram resistentes, demonstrando que essa parte da planta no modelo testado, não possui atividade antimicrobiana significativa se mostrando eficaz apenas com o extrato puro e na diluição 1:2 com formação de halos que variaram entre 5 e 12 mm de diâmetro. Apesar da diferença de diâmetro entre os halos observados neste trabalho, isso mostra que a planta apresenta baixo potencial de atividade antimicrobiana (Figura 10).

No ensaio realizado com o extrato líquido para quantificação de taninos da jurema preta e jurema branca pode-se dizer que de 2,5g de taninos totais da amostra de jurema preta, 1,93g corresponde a taninos condensados e 0,57g corresponde a taninos hidrolisáveis, no entanto em 2,5 g da amostra de jurema branca obteve-se em torno de 1,3% ou seja 0,032g considerando um resultado inferior em relação a quantidade encontrada em outras espécies.

Paes, et al. (2006) realizarm estudos sobre o potencial tanífero das cascas de algaroba (*Prosopis juliflora*), angico vermelho (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*), cajueiro

(*Anacardium occidentale*), jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*), jurema vermelha (*Mimosa arenosa*) e marmeleiro (*Croton sonderianus*), observando que destas espécies, o cajueiro, a jurema vermelha e a jurema-preta apresentaram, respectivamente, 19,83%, 18,11% e 17,74% de taninos nas cascas. O angico apresentou 11,89%, sendo estatisticamente inferior às três espécies citadas, não havendo muitos estudos sobre seus constituintes químicos.



Figura 9 Atividade antimicrobiana do extrato de *M. tenuiflora* sobre cepas de *Staphylococcus sp.*

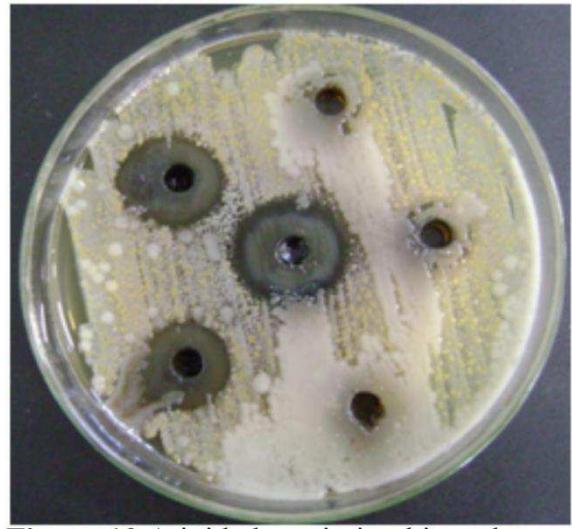


Figura 10 Atividade antimicrobiana do extrato de *P. stipulacea* sobre cepas de *Staphylococcus sp.*

Em trabalhos descritos por Meckes- Lozoya et al. (1990) a atividade antimicrobiana do extrato de jurema preta, pode estar vinculada a presença de taninos e flavonóides. Essa atividade também foi verificada em *Staphylococcus epidermitis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* e *Acinetobacter calcoaceticus*, além de fungos como *Microsporum gypseum*, *M. canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubus* e *Chaetomium indicum* (LOZOYA et al., 1989).

Comparando com os resultados obtidos por Gonçalves et al. (2006), foi possível observar a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólico da *M. tenuiflora* sobre *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *S. spp.* coagulase-negativa. Em estudos realizados com extrato aquoso e etanólico do pó da casca de jurema preta Lozoya (1989) também observou clara inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e também contra espécies de fungos dermatófitos. Os resultados obtidos pelos referidos autores estão, portanto, inteiramente compatíveis com os dados observados neste experimento.

Em estudos utilizando extrato de *M. tenuiflora*, Heinrich et al. (1992) também verificou a sua atividade antimicrobiana sobre cepas de *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus* apresentando também eficácia sobre *Proteus mirabilis* e *Shigella sonnei*. De Souza (2002) já encontrou efeito antimicrobiano em extratos desta planta frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, inibindo *S. aureus* à concentração de 10^7 UFC/mL. Soares, et al. (2006), onde avaliaram a ação biológica do extrato de *P. stipulacea*, foi observada atividade antimicrobiana em 100% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* testadas, obtendo média dos halos variando entre 7 e 18 mm. Em testes para avaliar o seu potencial biológico, a folha da *P. stipulacea* apresentou atividade antimicrobiana contra cepas da bactéria *Klebsiella pneumoniae* multiresistentes e o fungo *Candida albicans* (Soares, et al., 2006; Gramosa, et al., 2005).

Bezerra (2008) avaliou a fitoquímica e atividade antimicrobiana do extrato de *M. tenuiflora* e da *P. stipulacea*, e observou que ambas as espécies vegetais apresentam em comum compostos como taninos, flavonas, catequinas leucoantocianinas, e saponinas, diferindo apenas na presença de triterpenóides e alcalóides em *M.tenuiflora*, verificando que a atividade antimicrobiana do extrato de jurema preta frente a linhagens de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Aeromonas caviae* (ATCC 15468) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10390), no modelo utilizado, foi superior àquela observada com os extratos de jurema branca. Acreditamos que essa baixa atividade ocorreu devido à pequena quantidade de taninos encontrados nas cascas da *P. stipulacea*. Devido à escassez de trabalhos sobre a ação terapêutica da *P. stipulacea* faz-se necessária a comparação com os resultados obtidos de outras espécies vegetais cuja atividade biológica já foi estudada.

Trabalhos realizados com plantas medicinais demonstram a sensibilidade de bactérias do gênero *Staphylococcus* á compostos do metabolismo secundário destes vegetais. Novais (2003) realizou ensaios sobre cepas padrões de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* através do método de difusão em disco. Dos 137 extratos de vegetais avaliados, sete apresentaram atividade significativa contra o *Staphylococcus aureus*. Os extratos ativos foram preparados a partir de espécies pertencentes às famílias Leguminosae e Rutaceae. Virtuoso, 2005 avaliou o potencial microbiológico do extrato da casca de *Erythrina velutina* sobre oito bactérias patogênicas, e observou que ocorreu atividade antibacteriana apenas sobre *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*. Nenhum dos extratos testados foi ativo contra *Escherichia coli*

Gonçalves (2005) realizou 170 testes utilizando dezessete espécies vegetais, onde 25% dos extratos mostraram alta atividade antimicrobiana, destacando-se extratos de *Bixa orellana*, *Psidium guajava* e *Anacardium occidentale* e excepcionalmente o extrato de *Mimosa tenuiflora* contra *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus spp.* coagulase-negativa, e os extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Eugenia uniflora* contra *Escherichia coli*, *Providencia spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus spp.* coagulase-negativa. Heinrich, et al. (1992) observou que o extrato de *Mimosa tenuiflora* apresenta alta atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.* e também sobre *Proteus mirabilis* e *Shigella sonnei*. Avancini, et al. (2000) ressaltaram a sensibilidade de *S. aureus*, *Streptococcus uberis*, *E. coli* e *Salmonella gallinarum* ao extrato de *Baccharis trimera* (Less). Nos últimos anos vários estudos estão sendo desenvolvidos para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas, devido a uma grande variedade destes extratos demonstrarem uma potencial atividade sobre grande número de microrganismos.

3.2 Resultados dos Ensaio com os Antibióticos Comerciais

O microrganismo utilizado neste estudo apresentou resistência a alguns antibióticos comerciais, sugerindo que sejam também resistente ao extrato da *M. tenuiflora* e *P. stipulacea*. Pode-se observar, também, que o microrganismo avaliado apresentou alta sensibilidade aos antibióticos testados; sensíveis ao Cefquinome, Neomicina + Bacitracina + Tetraciclina, e Penicilina + Novobiocina (Tabela 1; Figura 11).

Brito et al. (2001) comprovaram que os *Staphylococcus aureus* isolados de infecções intramamárias bovinas no Brasil (clínicas e subclínicas) foram sensíveis a cefalotina, eritromicina, gentamicina, norfloxacin e oxacilina, 91% resistentes à tetraciclina e a tilosina e 65% a ampicilina e a penicilina e 99% à neomicina. Na Espanha (FRANCIS & CARROL, 1986) e na Inglaterra (GARCIA, et al. 1980), verificou-se que cepas de *S. aureus* isoladas do leite de vacas com mastite se mostraram resistentes à penicilina, em cerca de 40% dos casos. Na Índia (RAHMAN & BORO, 1990), isolou-se um grande número de bactérias do leite de vacas com mastite, principalmente *S. aureus*, resistentes à penicilina e estreptomina, fato que se deve, segundo os autores citados, à ampla e má utilização da associação desses antibióticos no tratamento da doença, naquele país. Todavia, evidenciou-se no Estado de São

Paulo, Brasil, que de 951 *S. aureus* isolados do leite de vacas com mastite, 75 a 90% eram sensíveis à cefalotina, nitrofurantoína, vancomicina e novobiocina; entretanto, todas as cepas foram resistentes à fosfomicina, polimixina B, colistina e rifamicina (COSTA, et al., 1985).

Tabela 1: Percentual de atividade antimicrobiana de antibióticos comerciais sobre cepas de *Staphylococcus spp.*

	Atividade antimicrobiana		
	S	I	R
GEN	72,1%	15,3%	12,6%
AMO	53,7%	16,5%	29,8%
CIP	66,3%	7,9%	25,8%
PNM	79,6%	11,2%	9,2%
CFQUE	94,1%	1,7%	4,2%
FLF	58,3%	24,3%	17,4%
AZI	54,6%	27,1%	18,3%
ERI	21,9%	30,6%	47,5%
NBT	81,7%	6%	12,3%
ENO	52,3%	35,4%	12,3%

AZI – Azitromicina; **ERI** – Eritromicina; **NBT** – Neomicina+Bacitracina+Tetraciclina; **ENO** – Enrofloxacin; **GEN**–Gentamicina; **AMO**–Amoxicilina; **CIP**–Ciprofloxacina; **PNM** – Penicilina+Novobiocina; **CFQUE** – Cefquinome; **FLF** – Florfenicol
S – Sensível; **I** – Intermediário; **R** – Resistente

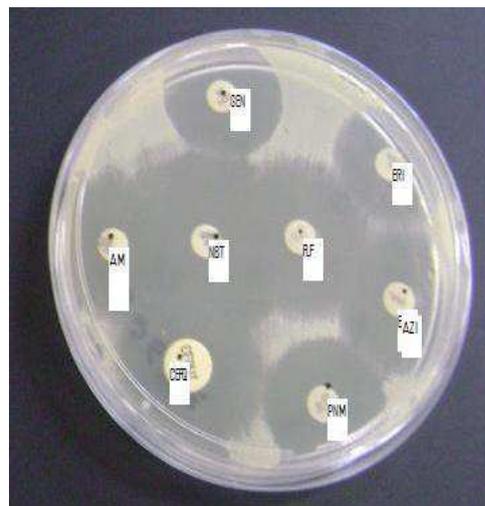


Figura 11 Atividade antimicrobiana de antibióticos comerciais sobre cepas de *Staphylococcus spp.*

Em outro experimento (LOPES, et al., 1990), no mesmo Estado, observou-se que, com exceção da tetraciclina e estreptomicina, ocorreu grande sensibilidade a antibióticos de cepas de *S. aureus* isoladas de vacas com mastite, levando os autores da pesquisa a afirmarem que o leite não constituía fonte importante de disseminação de estafilococos resistentes. Correa (2005) analisou 95 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de leite mastítico bovino e observou que a sulfonamida apresentou o mais alto grau de resistência (80,21%), seguida pela ampicilina (78,94%), penicilina (77,98%) e lincomicina (71,58%). Duas cepas apresentaram resistência a todas as drogas testadas e 48 cepas (50,50%) apresentaram resistência à no mínimo oito drogas. Somente a gentamicina (18,95%) e o sulfametoxazol-trimetropim (24,21%) apresentaram baixos níveis de resistência. Entretanto, observaram cepas com resistência múltipla para seis a nove antibióticos simultaneamente e concluíram que o percentual de multirresistência é preocupante, pois muitos dos antibióticos disponíveis não teriam efeito sobre estes microrganismos dificultando o tratamento dos animais.

Araújo (1998) isolou de leite cru, 201 cepas de *S. aureus*, as quais foram submetidas a provas de resistência a antibióticos pelo método dos discos impregnados com os seguintes antibacterianos: amicacina, ampicilina, efalotina, cefoxitina, cloranfenicol, clindamicina, oxacilina, penicilina, tetraciclina, tobramicina e vancomicina. Com exceção de 88 (43,8%), 90 (44,8%), 24 (11,9%) e 40 (19,9%) cepas resistentes à penicilina, ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina, respectivamente, a maioria das 201 cepas (95% ou mais) foi sensível aos antibióticos utilizados.

4 CONCLUSÃO

- O extrato etanólico da casca da jurema preta, no modelo utilizado, destaca-se frente aos antibióticos comerciais utilizados no experimento quanto a atividade antimicrobiana.
- O extrato etanólico da casca da jurema branca, no modelo utilizado, apresenta fraca atividade antimicrobiana.
- É possível também constatar que *Staphylococcus spp* utilizado é resistente a alguns antibióticos comerciais.
- O teste de difusão com disco (antibiograma) realizado para os espécimes do gênero *Staphylococcus* demonstrou um alto nível de resistência, e entre estes a multiresistencia foi o padrão comumente observado.

5 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, W. P. A Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.35, n.4, p.161-165, 1998.
- AVANCINI, A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.52, n.3, Belo Horizonte, 2000.
- BAIRD-PARKER, A.C. The *Staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**. v.19, p.15-85, 1990.
- BARRAGY, T.B. **Bovine mastitis** In: Veterinary Drug therapy New York: Lea e Febiger, p.655-687, 1994.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. v.45, p.493-496, 1996.
- BEZERRA, D. A. C. **Estudo Fitoquímico, Bromatológico e Microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**, 2008, 63f. Dissertação de Mestrado em Sistemas Agrosilvopastoris no Semi-Arido . Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Brasil.
- BOUCHOT, M. C.; CATEL J.; CHIROL C.; GANIERE J.P.; MENEZES M. L. Diagnostic bactériologique des infections mammaires des bovins. **Recueil Médicine Veterinária**. p. 567-577, 1985.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A . S.; CARMO, R. A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 53, n.5, p.531-537, 2001.
- CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. M. P; ARRUDA, T. A.; PEREIRA, M. S. V; HIGINO, J. S.; ALVES, J. A.; PASSOS, M. G. V. M. & SANTOS, V. L. Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum linn.* (romã) sobre isolados ambulatoriais de

Staphylococcus aureus. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 38, n.2, p. 111-114, 2006.

CALDAS PINTO, M. S.; BORGES CAVALCANTE, M. A.; MEIRA DE ANDRADE, M. V. (2006). Potencial forrageiro da caatinga, fenologia, métodos de avaliação da área foliar e o efeito do déficit hídrico sobre o crescimento de plantas. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**. v.7, nº. 04 ®. Disponível no site: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>. Data de acesso: 12 de março de 2009.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. v.21, n.1, 1998.

COSTA, E.O.; COUTINHO, S.D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C.M. Sensitivity of bovine microorganisms to antibiotics and chemotherapeutic drugs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.5, n.2, p.65-69, 1985.

COSTA, B. **Homeopatia na cura e prevenção de doenças**. Balde branco, julho, p.28-33, 1998.

COSTA, E. O.; MANGERONA, A. M.; BENITS, N. R.; MELVILLE, P. O.; PARDO, R. B.; RIBEIRO, O. R.; WATANABE, E. T. Avaliação de campo de quatro tratamentos intramamários de mastite clínica bovina. **A hora Veterinária**. v.16, n.93, p.19-21, 1996.

CORREA, I.; CORREA, M. G. P.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of strains of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from mastitic bovine milk. **ARS Veerinária**. v.21, p.69-76, 2005.

CRONQUIST, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press, New York.

CRUZ, L. C. H. **Micologia veterinária**. Itaguaí: Imprensa Universitária. p.191-192, 1985.

DE SOUZA, R. S. O. *Jurema- Preta (Mimosa tenuiflora [Willd] Poiret): Enteógeno, Remédio ou Placebo? Uma Abordagem à Luz da Etnofarmacologia*, 68f. (Monografia - Graduação em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil, 2002.

FRANCIS, P. G.; CARROL, P. J. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical bovine mastitis. **Veterinary Record**. v.118, n.13, p.361-364, 1986.

- GALES, A.C.; PIGNATARI, A.C.; JONES, R.N. et al. Avaliação da atividade *in vitro* dos novos antimicrobianos da classed as fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenens contra 569 amostras clínicas de bactérias Gram-negativas. **Revista da Associação Médica do Brasil**. v.43, n.2, p.137-144, 1997.
- GRAMOSA, N. V.; VIEIRA, M. G. S.; MAGALHÃES, D. V.; MARTINS NETO, J. S. Estudo Fitoquímico e Atividade Antioxidante dos Extratos de Plantas do Parque Botânico do Ceará. *In: 57ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, Anais....* Fortaleza, 2005.
- GONÇALVES, A. L; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Algumas Árvores Nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.72, n.3, p.353-358, 2005.
- GUANGCHENG, Z.; YUNLU, L.; YAZAKI, Y.. Extractive yields, Stiasny values and polyflavonoid content in barks from six acacia species *In: Australia. Australian Forestry*. v.54, p.154-156, 1991.
- GARCIA, M.L.; MORENO, B.; BERGDOLL, M.S. Characterization of Staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**. v.39, n.3, p.548-53, 1980.
- GONÇALVES, A.L; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Efeitos antimicrobianos de algumas árvores medicinais nativas nas conjuntivites infecciosas. **O Biológico**. v.68, 2006.
- HEINRICH, M. M.; KUHNT, M.; WRIGT, C. W.; RIMPLER, H.; PHILLIPSON, J. D.; SCHANDELMAIER, A.; WARHURST, D. C. Parasitological and microbiological evaluation of mixe indian medical plants. **Journal of Ethnopharmacol**. v.36, p.81-85, 1992.
- KIRK, J.H.; DEGRAVES, F. Recent progress in treatment and control of mastitis in cattle. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**. v.204, p.1152-1158, 1994.
- LANGONI, H. Complexidade etiológica na mastite bovina *In: Encontro de Pesquisadores Em Mastites, III, 1999. Botucatu, SP. Anais...* Botucatu, p.3-18, 1999.
- LANGONI H.; DOMINGUES P. F.; CHI K. D., PARDO R. B.; CABRAL K.G. & ROSA C. Participação de leveduras, algas e fungos na mastite bovina. **Veterinária e Zootecnia**. v.10, p.89-98, 1998.
- LOPES, C.A.; MORENO, G.; CURI, P.R.; GOTTSCHALK, A.F.; MODOLO, J.R.; HORACIO, A.; CORRÊA, A.; PAVAN, C. Characteristics of *Staphylococcus aureus* from

- subclinical bovine mastitis in Brazil. **British Veterinary Journal**, v.146, n.5, p.443-448, 1990.
- LOZOYA, X.; NAVARRO, V.; ARNASON, J. T.; KOURANY, E. Experimental evaluation of *Mimosa-tenuiflora* (Willd) Poir (tepescohuite) I - Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. **Archivos de investigación médica**. v.1, n.20, p.87-93, 1989.
- MECKES LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; MARLES, R. J.; SOUCY BREAU, C.; SEN, A.; ARNASON, J. T. N, N-Dimethyltryptamine Alkaloid in *Mimosa tenuiflora* Bark (Tepescohuite). **Archivos de investigación médica**. v.2, n. 2, p.175-177, 1990.
- MAC FADDIN, J. F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins. p.527, 1980.
- MAIA, G. N. **Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo D&Z Computação Gráfica e Editora. p.237-246, 2004.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. UFC Edições. p. 44-46, 1997.
- NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. L. P.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.14, p.05-08, 2003.
- PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; MARINHO, I. V.; LIMA, C. R. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no Semi-árido brasileiro. **Cerne**. v. 12, n. 3, p. 232-238, 2006.
- QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolf, p. 648, 1994.
- RAHMAN, H.; BORO, B.R. Isolation and antibiogram of bacterial pathogens producing mastitis. **Indian Journal of Animal Health**. v.29, n.1, p.49-52, 1990.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: UFMG. p. 221, 1998.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, p.295, 1997.
- SILVA, N. Diagnóstico de mastite em animais de importância econômica. In: Encontro De Pesquisadores Em Mastites, III, 1999. Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu, p. 51-55, 1999.

SOARES, K. P.; AMORIM, L. N.; NASCIMENTO, K. M.; LIMA NETO, J. G.; MALLMANN, E. J. J; VIEIRA, M. G. S.; RIBEIRO, S. R. L; MELO, T. S; SOUZA, G. C; BARRETO, M. B.; BRASIL, N. V. G. P. S; MENEZES E. A.; CUNHA, F. A. **Atividade de Extratos de Plantas do Nordeste do Brasil contra Cepas de *Klebsiella pneumoniae* Produtoras de Betalactamases de Espectro Expandido.** In: XLVI CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA. Salvador – Bahia. ÁREA: IC-Iniciação Científica, 2006.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J. F. G.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; OLIVEIRA, A. B.; MIGUEL, O. G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** vol.15 n 2, João Pessoa. Apr./June 2005.

CAPÍTULO 3

PEREIRA, Andréia Vieira. **Taninos de Jurema preta: Atividade antimicrobiana (*in vitro*) sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina.** Patos, PB: UFCG, 2010. 100p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido).

RESUMO

A *Mimosa tenuiflora* é uma planta que apresenta alto teor de taninos, amplamente utilizada medicinalmente. O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de taninos isolados da casca do caule de *M. tenuiflora* sobre *Staphylococcus aureus* isolados de bovinos. A extração dos taninos foi realizada pelo método de Stiasny, onde a casca de jurema-preta apresentou 18,11% de taninos. Para determinação da atividade antimicrobiana foi utilizada uma solução de água destilada (mL) / taninos (mg) sobre as cepas semeadas em meio Muller Hinton. Em seguida foram inoculados 50 μ L da solução nas seguintes diluições 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512. As placas foram incubadas a 37°C, por um período de 24 a 48 horas, para determinação da Concentração Inibitória Mínima. Os ensaios foram realizados em triplicata. Observou-se halos de inibição entre 6 e 38mm. Das amostras testadas, as diluições de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32 apresentaram halos superiores a 11mm. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre a solução tânica e os antibióticos Amoxicilina; Azitromicina; Neomicina+Bacitracina+Tetraciclina tanto nos testes antimicrobianos. Assim, é determinado que os taninos isolados da casca de *M. tenuiflora* apresentam atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Microbiologia, taninos, plantas medicinais, fitoterapia

PEREIRA, Andréia Vieira. **Jurema Preta Tannins: Antimicrobial activity (*in vitro*) on bovine *Staphylococcus aureus***. Patos, PB: UFCG, 2010. 100p. (Dissertation – Magister Science in Animal Science – Agroforestry Systems in Semi-arid).

ABSTRACT

The *Mimosa tenuiflora* is a plant, widely used medicinally, that presents high tanning concentration. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of tanning isolated of the barks of *M. tenuiflora* stem on *Staphylococcus aureus* isolated of cattle. The extraction of tanning was carried through by the Stiasny method, where the bark of Jurema preta presented 18.11% of tanning. For determination of the antimicrobial activity a distilled solution of water was used (mL)/tanning (mg) on strains sown in Muller Hinton media. Then, they had been inoculated 50 μ L of the solution in the following dilutions 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512. The plates had been incubates 37°C, for a period of 24 to 48 hours, for determination of Minimum Inhibitory Concentration. The assays had been carried through in triplicate. It was observed inhibition halo between 0 and 38mm. Of the tested samples, the dilutions of 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 and 1:32 had presented inhibitory halos up 11mm. It didn't have statistical significant differences between the tannic solution and the Amoxicillin antibiotics; Azythromycin ; Neomycin + Bacitracine + Tetracycline in such a way in the antimicrobials tests. Thus, it is determined that the isolated tanning of the stem of *M. tenuiflora* present antimicrobial activity.

Keywords: Microbiology, tannin, medicinal plants, phytotherapy

INTRODUÇÃO

A *Mimosa tenuiflora* está entre as plantas lenhosas predominantes na vegetação (caatinga) do semi-árido do nordeste brasileiro, é considerada uma planta invasora de elevada agressividade, quando submetida ao corte rebrota em qualquer época do ano. É uma leguminosa que atinge cerca de 4,0m de altura, apresenta espinhos, é resistente a estiagem, sendo que no final da estação chuvosa suas folhas fenecem e caem naturalmente, permanecendo em dormência até o início das chuvas. Esta planta verde ou fenada é um importante componente nas dietas de caprinos, ovinos e bovinos, além de ser explorada para produção de estacas e lenha, apresenta em sua composição química tanino de 26,7%, (PEREIRA FILHO et al., 2005). O tanino de jurema-preta apresenta bons resultados no curtimento de peles, e pela abundância no Semi-Árido brasileiro apresenta potencial de exploração para sua obtenção (PAES et al., 2006). O termo “tanino” é um nome genérico descritivo para um grupo de substâncias poliméricas fenólicas capazes de curtir couro ou precipitar gelatina em solução, propriedade conhecida como adstringência de grande interesse econômico e ecológico.

Os compostos do metabolismo secundário vegetal ou metabolismo especial apresentam um amplo valor nas interações entre a planta e seu ecossistema exercendo, por exemplo, o papel de fagoinibidores contra herbívoros ou como agentes antimicrobianos (SANTANA, 2002). Os taninos vegetais podem ser encontrados em várias partes do vegetal, tais como madeira, casca, fruto, etc. É solúvel em água e de peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides (MELLO, 2001).

São constituídos por polifenóis e classificados em hidrolisáveis e condensados. Os hidrolisáveis são poliésteres da glicose e são classificados, dependendo do ácido formado de sua hidrólise, em galúico ou elágico taninos (PIZZI, 1993). Os taninos condensados são constituídos por monômeros do tipo catequina e são conhecidos por flavonóides (HASLAM, 1966; WENZL, 1970; PIZZI, 1993), estando presentes, basicamente, na casca das árvores. Os taninos extraídos de cascas de árvores são utilizados de forma efetiva como matéria-prima na fabricação de adesivos para produtos de madeira poderia ser uma fonte segura e renovável de matéria-prima para adesivos (CHEN, 1991). A extração de tanino pode tornar-se economicamente viável, uma vez que após extraídas, as cascas podem também ser aproveitadas como fonte de energia (MORI et al., 1999). Além da importância no curtimento de couros e peles, os taninos são utilizados pela indústria de petróleo, como agente

dispersante para controlar a viscosidade de argilas na perfuração de poços (DOAT, 1978), sendo, também, empregados no tratamento de água de abastecimento e residuárias (Silva, 1999), na fabricação de tintas e adesivos (TRUGILHO et al., 1997) e, em virtude de suas propriedades anti-sépticas, vêm sendo testados contra organismos xilófagos (COUTO, 1996; GONZÁLEZ-LOREDO, 1996; SHIMADA, 1998). Veras & Morais, 2004 em estudos ressaltam que a ação cicatrizante apresentada por algumas espécies vegetais estão relacionadas à presença de taninos. Muitas atividades fisiológicas humanas, como a estimulação das células fagocíticas e a ação tumoral mediada por hospedeiro, além de uma larga faixa de atividades anti-infecciosas, têm sido atribuídas aos taninos. Uma de suas ações moleculares é a de formar complexos com proteínas através de forças denominadas “não-específicas”, como pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas, assim como pela formação de ligações covalentes (COWAN, 1999). Michelin et al. (2005) testaram extratos secos obtidos de *Artemisia absinthium*, *Mentha pulegium*, *Punica*, *Syzygium cuminii* e *Xanthosoma violaceum* plantas que apresentam altos teores de taninos, sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e a levedura *Candida albicans* sendo observado que os extratos com atividade mais expressiva foram os de *X. violaceum*, *P. granatum* e *S. cuminii* que inibiram, respectivamente, 53,3, 40,0 e 40,0% dos microrganismos, estes apresentando maior concentração de taninos.

Diante do amplo potencial de atividade antimicrobiana apresentado pelos taninos, esse estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos taninos extraídos da jurema preta sobre cepas de *Staphylococcus aureus* de origem bovina isoladas de casos de mastite subclínica em bovinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Espécie estudada

As cascas de jurema-preta foram coletadas no Núcleo de Pesquisas do Semi-Árido (NUPEÁRIDO), município de Patos, PB, propriedade da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Com o intuito de representar a variabilidade genética existente entre e dentro as plantas, de cada espécie amostrada, foram selecionados cinco exemplares, sendo retiradas amostras de cascas em três posições, no tronco (base, meio e topo), nos galhos e nos ramos (diâmetro de até 5,0 cm). Desse modo, a árvore foi integralmente representada.

2.2 Preparo das cascas para extração dos taninos

As cascas ao serem retiradas, foram condicionadas em sacos plásticos, para que não houvesse perda de umidade e transportadas para o Laboratório de Tecnologia de Produtos Florestais (LTPF) da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural (UFCEG/CSTR), Patos, PB. No laboratório, foram tomadas duas amostras de cascas de cada árvore, as quais foram cortadas em fragmentos menores, homogêneas, pesadas e secas em estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas, para a determinação do teor de umidade (base seca) das cascas obtidas. Depois dessa operação, as cascas foram secas ao ar e moídas em uma forrageira, para obter um material de menor granulometria.

O material moído foi classificado e utilizou-se o que passou por uma peneira de malha de 2,00 x 2,00 cm. Após essa operação, retiraram-se quatro amostras representativas de cascas de cada espécie. Duas destas foram secas a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas, a fim de avaliar o teor de umidade (base seca) das cascas secas ao ar e as outras foram moídas em moinho do tipo Willey, para obtenção de um material de menor granulometria e mais homogêneo e destinadas à quantificação das substâncias tânicas presentes em cada espécie. O material restante foi utilizado nas extrações de substâncias tânicas para avaliação da atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*.

2.3 Extração das substâncias tânicas das cascas

Foram executadas extrações para a quantificação das substâncias tânicas presentes na casca da espécie *Mimosa tenuiflora* e para a obtenção de taninos onde será avaliada sua atividade antimicrobiana.

2.4 Extração para quantificação das substâncias tânicas

Para a quantificação das substâncias tânicas, o material foi classificado e utilizou-se a porção que passou pela peneira de 32 “mesh” e ficou retida na de 60 “mesh”. Em seguida, o material foi homogêneo, e retiraram-se duas amostras de cada árvore, que foram pesadas e conduzidas à estufa (sob as mesmas condições já descritas) para a determinação do teor de umidade do material e para permitir os cálculos do teor de taninos presentes em cada espécie. Para as extrações, 25g de casca absolutamente seca foram colocadas em um balão de 1000 mL e adicionaram-se, a seguir, 500 mL de água destilada (relação 20:1; v/p). Ao balão foi

conectado um condensador de refluxo, e o material foi mantido na temperatura de ebulição da água por duas horas, em uma manta aquecedora.

Após a fervura, o material foi coado em uma peneira de 150 “mesh”, armazenado em garrafas de plástico e conservado em geladeira, a fim de evitar o surgimento de fungos nos extratos. As cascas foram submetidas novamente ao processo de extração, com o intuito de retirar em ao máximo os taninos presentes em cada espécie. Assim a relação final casca: água foi de 1:40. Os extratos obtidos das extrações foram transferidos para um balão volumétrico de 1.000 mL, tendo o volume completado pela adição de água destilada. Após este procedimento, o material foi coado numa flanela e, posteriormente filtrado em cadinho de vidro sinterizado de porosidade 2. Do filtrado obtido, retiram-se três alíquotas de 50 mL. Uma delas foi colocada em um copo becker de 100 mL, e levada à estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas, para a determinação do teor de sólidos totais (TST) presente no extrato. Para as determinações do TST foi empregada a equação a seguir:

$$TST (\%) = \frac{M_i - M_f}{M_i} \cdot 100$$

TST = Teor de sólidos totais (%); M1 = Massa inicial (g); M2 = Massa final (g).

As demais alíquotas foram utilizadas para a determinação do teor de taninos condensados (TTC) de cada extrato. Para tanto, foi empregado o método de Stiasny (GUANGCHENG et al.,1991), com algumas modificações. Assim, para a determinação do TTC, em uma amostra de 100 mL do extrato total foram adicionados 4 mL de formaldeído (37%) e 1 mL de HCl concentrado. Assim, para a determinação do TTC, em uma amostra de 100 mL do extrato total adicionaram 4 mL de formaldeído (37%) e 1 mL de HCl concentrado. O material foi aquecido, sob refluxo durante 30 minutos. Nessa condição, os taninos formaram complexos insolúveis, que foram separados por filtração simples ao empregar filtro de papel. Após a filtração, o material foi transferido para um copo Becker de 250 mL e seco a $103 \pm 2^\circ\text{C}$, por 24 horas. Após a secagem, calculou-se o Índice de Stiasny, conforme equação a seguir:

$$TTC (\%) = \frac{TST \cdot I}{100}$$

I = Índice de Stiasny (%); M1 = Massa de sólidos em 100 mL de extrato; M2 = Massa do precipitado taninos – formaldeído.

Após a obtenção do Índice de Stiasny foi calculado o teor de taninos condensados (TTC), conforme a Equação a seguir:

$$I (\%) = \left(\frac{M_2}{M_1} \right) \cdot 100$$

TTC = Teor de taninos condensados (%); TST = Teor de sólidos totais (Equação 1); I = Índice de Stiasny (Equação 2). Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

2.5 Extrações das substâncias tânica para avaliação da atividade antimicrobiana

A extração dos taninos a serem utilizados na atividade antimicrobiana foi realizada em água, à temperatura de $70 \pm 5^\circ\text{C}$, durante duas horas. Nas extrações, para cada 2,00 kg de cascas foram adicionados 10 litros de água (relação 5:1). Cada amostra foi submetida à fervura, em um digestor rotativo, com capacidade de 20 litros.

Essa operação foi executada no LTPF (UFCEG/CSTR). Cada amostra de casca foi submetida a duas extrações. Assim, a relação final foi de 1:10. Após cada extração, o material foi passado em uma peneira com tecido de “silk screen” e em um tecido de flanela, para a retenção de partículas finas.

O extrato obtido foi homogeneizado e derramado em bandejas de alumínio de 5 x 40 x 60 cm, e posto em uma estufa de ventilação forçada mantida a $70 \pm 3^\circ\text{C}$, até a completa evaporação da umidade. O material seco obtido foi moído em um multiprocessador de uso doméstico e peneirado em peneira de 60 mesh.

2.6 Aquisição das amostras de *Staphylococcus aureus* de origem bovina.

Os isolados clínicos foram coletados de bovinos em fase de lactação, infectadas naturalmente, a coleta das amostras foi realizada após lavagem da teta com água e sabão, secagem com papel toalha e desinfecção do óstio do teto, utilizando-se álcool etílico a 70° GL. Coletou-se aproximadamente 5 ml de leite por quarto mamário, de maneira asséptica, com tubo inclinado na posição horizontal (BOUCHOT et al., 1985). Estas amostras foram armazenadas em tubos rosqueados estéreis, identificados e enviados sob refrigeração em caixas de material isotérmico, para a realização do exame microbiológico, e identificação do *Staphylococcus aureus*, além das amostras clínicas, foi também utilizado amostras padrão de ATCC 33591 e ATCC 6538, no Laboratório de Genética e Microbiologia da Universidade Federal da Paraíba- CCEN, onde foram processadas.

2.7 Determinação da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana em placas foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM é considerada a menor concentração das substâncias que inibi visivelmente o crescimento bacteriano. Foram feitos orifícios de 6 mm de diâmetro e preenchidos com 50 μ L do pó tânico diluído em água destilada, para as concentrações 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 e 1:1024 para a determinação da atividade antimicrobiana do tanino de jurema preta. Para obtenção de resultados mais eficazes os ensaios foram realizados em triplicata os resultados expressos em mm pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição (CATÃO, 2006). Para controle positivo utilizamos Gentamicina; Amoxicilina; Ciprofloxacina; Penicilina+Novobiocina; Cefquinome; Florfenicol; Azitromicina; Eritromicina; Neomicina+Bacitracina+Tetraciclina e Enrofloxacina.

A leitura das placas levou em consideração a presença ou ausência de halos em volta dos discos. Os halos foram medidos em milímetros (mm) em relação ao seu diâmetro e a concentração inibitória mínima (CIM), estimada de acordo com a metodologia de Catão et al, (2006). A maior atividade antimicrobiana foi dada aos extratos que apresentaram halos superiores a 11.

2.8 Análise estatística

Para a comparação da atividade antimicrobiana entre as diferentes concentrações da substância tânica e antimicrobianos, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruscal-Wallis com as comparações múltiplas realizadas com o teste de Dunn (ZAR, 1999). O nível de significância adotado foi de 0,05.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram a eficácia da solução tânica a partir de diferentes concentrações, sendo observado halos de inibição entre 10 e 38mm. Das amostras testadas, as diluições de 1:1; a 1:16 apresentaram halos superiores ao halo mínimo de 12mm estabelecido por Catão, et al. (2006), em todas as cepas testadas, (Gráfico 1; Figura 12), e em 80% das amostras se obteve o efeito antimicrobiano desejado.



Figura 12 Atividade antimicrobiana de solução tânica (mg/ml) extraída da casca de *M. tenuiflora*.

A média de inibição do crescimento microbiano frente à solução tânica (mg/ml) de *Mimosa tenuiflora* em relação à diluição do extrato é apresentada na Tabela 2. Quanto aos antibióticos comerciais, foi possível observar atividade em todas as amostras testadas (Gráficos 2 e 3), sendo também observado resistência bacteriana em todas as amostras, com o maior percentual de resistência o da Eritromicina.

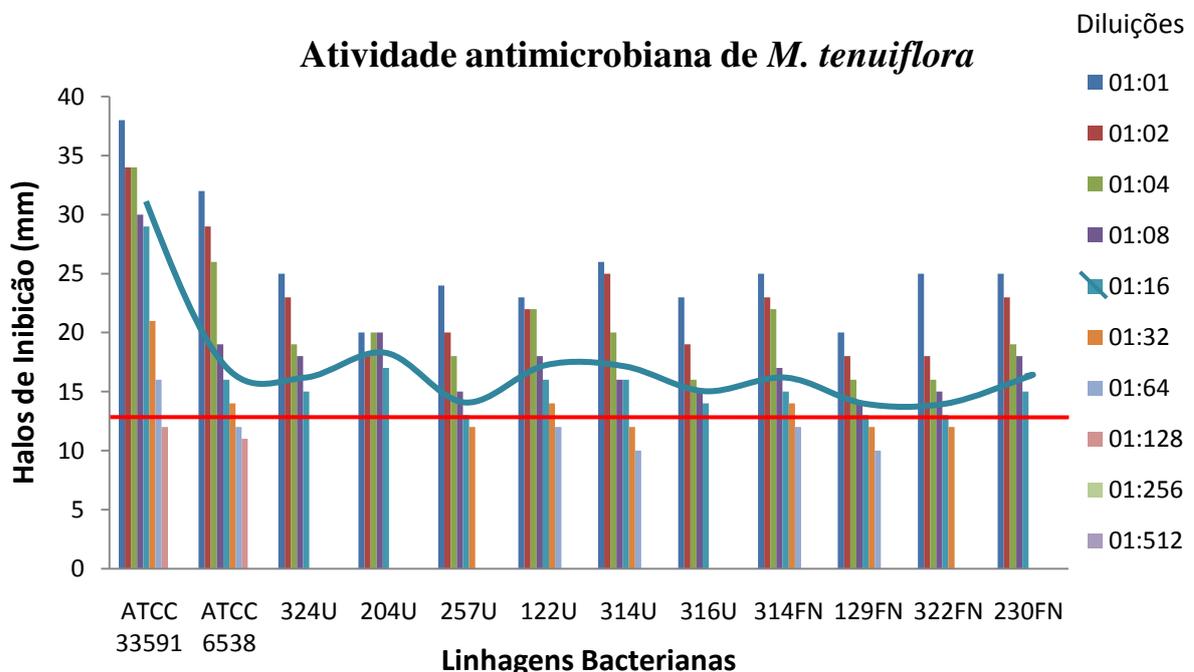


Gráfico 1 Concentração Inibitória Mínima (halos de inibição em mm) em meio sólido da solução tânica (mg/ml) de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. sobre *Staphylococcus aureus*.

Nota: A linha vermelha destaca o halo de 12 mm estabelecido por Catão et al. (2006), A linha azul destaca o efeito obtido através da concentração 01:16.

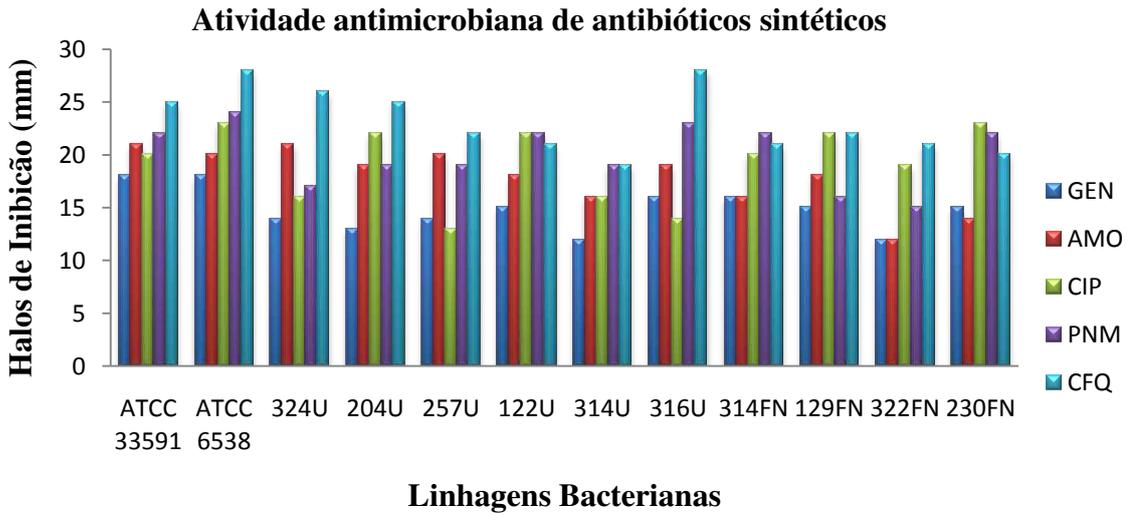


Gráfico 2 Concentração Inibitória Mínima (halos de inibição em mm) em meio sólido de **GEN** – Gentamicina; **AMO** – Amoxicilina; **CIP** – Ciprofloxacina; **PNM** – Penicilina+Novobiocina; **CFQ** – Cefquinome; sobre *Staphylococcus aureus*

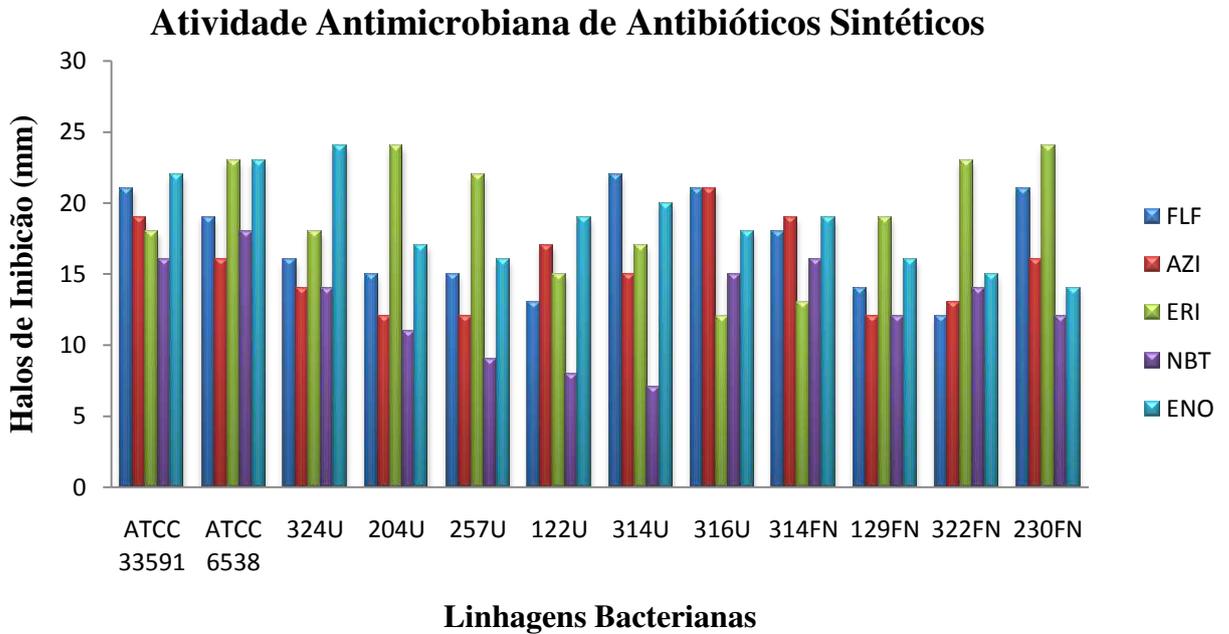


Gráfico 3 Concentração Inibitória Mínima (halos de inibição em mm) em meio sólido de **FLF** – Florfenicol; **AZI** – Azitromicina; **ERI** – Eritromicina; **NBT** – Neomicina + Bacitracina +Tetraciclina; **ENO** – Enrofloxacina sobre *Staphylococcus aureus*.

O resultado do teste de Kruskal-Wallis demonstrou que houve diferenças significativas quando a solução tânica foi comparados aos tratamentos com os antibióticos Gentamicina e Neomicina+Bacitracina+Tetraciclina para as diluições da solução tânica 1:256 e 1: 512, Ciprofloxacina, Florfenicol, Enrofloxacina e Eritromicina para as diluições da solução tânica 1:1; 1:2; 1:4; 1:8 e 1:16, Cefquinome para as diluições 1:128; 1:256 e 1:512, em relação a sensibilidade de bactérias *S. aureus* ($p < 0,05$, Tabela 3).

Tabela 2 Sensibilidade de bactérias *S. aureus* a solução tânica (mg/ml) de casca do caule de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.

Concentração da solução tânica (mg/ml)	CIM – Médias (mm)
1: 1	25,5
1: 2	22,6
1: 4	20,6
1: 8	17,9
1:16	16,0
1:32	13,8
1:64	12,0
1:128	11,5
1:256	9,1
1:512	7,4

Tabela 3 Sensibilidade de bactérias *S. aureus* a antibióticos sintéticos pelo teste de difusão em disco (2mg/disco).

Antibióticos	CIM – Médias (mm)
GEN	14,8
AMO	17,8
CIP	19,1
PNM	20,0
CFQ	23,1
FLF	16,8
AZI	15,5
ERI	19,0
NBT	12,6
ENO	18,5

GEN – Gentamicina; **AMO** – Amoxicilina; **CIP** – Ciprofloxacina; **PNM** – Penicilina+Novobiocina; **CFQ** – Cefquinome; **FLF**–Florfenicol; **AZI**–Azitromicina; **ERI** – Eritromicina; **NBT**-Neomicina+Bacitracina+Tetraciclina; **ENO** – Enrofloxacin, sobre *Staphylococcus aureus*.

Paes, et al., 2006, avaliaram o potencial tanífero da casca do caule de jurema preta e esta apresentou potencial como produtoras de taninos com concentração de 17,74%.

Encontram-se presentes na espécie estudada, esteróides, saponinas e flavonóides, compostos que também são relacionados à atividade antibacteriana em diferentes estudos descritos na literatura (RECIO & RIOS & VILLAR, 1989). Segundo Websters-Online-Dictionary, 2008, os taninos são substâncias fenólicas complexas de origem vegetal; apresentando excelente atividade antimicrobiana e muito utilizada no curtimento de peles e em medicamentos. Muitos trabalhos relatam atividades antimicrobianas de plantas e atribuem estas atividades a presença de compostos fenólicos que fazem parte dos óleos essenciais e dos taninos (NASCIMENTO, et al., 2000). Meckes-Lozoya, et al. (1990), que realizaram estudos utilizando extratos da casca de jurema preta, supõem que a atividade antimicrobiana do extrato pode estar vinculada a presença de taninos e flavonóides nessa parte da planta. Essa atividade também foi verificada por Lozoya, et al. (1989) sobre *Staphylococcus epidermitis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* e *Acinetobacter*

calcoaceticus, além de fungos como *Microsporium gypseum*, *M. canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubus* e *Chaetomium indicum*.

Gonçalves, et al. (2005) em estudos sobre a atividade antimicrobiana de algumas árvores nativas do Brasil, observaram uma excepcional atividade antimicrobiana do extrato hidro-alcoólico de jurema preta sobre *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.* coagulase apresentando halos variando entre 12 e 33mm. Ogunleye & Ibitoye (2003) testaram o extrato da casca do caule de *Ximenia americana* (ameixa) sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*, verificando excelente atividade antimicrobiana, estes detectaram grande quantidade de flavonóides e teor de taninos de 32% na casca desta planta. Trabalho que corrobora com estudos realizados por James et al. (2007) que testaram o extrato das folhas, da casca do caule e da raiz de *X. americana* sobre *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella typhi* e *Escherichia coli*. Djipa, et al. (2000) estudando a atividade antimicrobiana de extratos de jambolão sobre vários microrganismos, entre eles, *S. aureus*, verificaram que esta propriedade foi devida à alta concentração de taninos (77 a 83%), não se observando esta propriedade quando os taninos foram suprimidos.

Pereira, et al. (2006) realizaram estudos com cascas de *Punica granatum* contendo aproximadamente, 20% de taninos, sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter gergoviae* apresentando excelente atividade antimicrobiana sobre estes microrganismos. Souza, et al. (2007) utilizou o extratos polares de casca de *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae-Mimosoidae) sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* estes apresentaram atividades antioxidante e antimicrobiana devido aos metabólitos secundários derivados da classe de taninos, que são os principais constituintes desta droga vegetal, de acordo com a literatura. Segundo Scalbert (1991), o mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos explica-se por três hipóteses. A primeira pressupõe que os taninos inibindo enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexando com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano.

Devido à insipiência de estudos *in vitro* utilizando taninos isolados de jurema preta, foi necessário discutir com trabalhos que utilizaram plantas com percentuais de taninos conhecidos e elevados que apresentassem resultados semelhantes ao encontrado neste

trabalho. O conhecimento da concentração de tanino em leguminosas nativas como a jurema-preta, e, sobretudo, seus efeitos comprovados pela atividade antimicrobiana pode contribuir nos estudos que visam potencializar a utilização desse recurso natural na produção de medicamentos.

4 CONCLUSÃO

- Taninos isolados da *Mimosa tenuiflora* sobre amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de bovinos produz eficiente ação antimicrobiana, revelando-se um agente terapêutico em potencial.
- Taninos destacam-se frente aos antibióticos comerciais utilizados no experimento quanto a atividade antimicrobiana.

5 REFERÊNCIAS

BOUCHOT, M.C.; CATEL, J.; CHIROL, C.; GANIERE, J.P.; MENEZES, L. E.M., Diagnostic bactériologique des infections mammaires des bovins. **Recueil de Medicina Veterinaire**, p. 567-577, 1985.

CATÃO, R.M.R.; ANTUNES, R.M.P; ARRUDA, T.A.; PEREIRA, M.S.V; HIGINO, J.S.; ALVES, J.A.; PASSOS, M.G.V.M. & SANTOS, V.L. Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum linn.* (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 38, n.2p, 111-114, 2006.

CHEN, M. Effects of Extraction on Reaction of Bark Extracts With Formaldeyde. **Holzforschung**, v.45, n.2, p. 155-159, 1991.

COUTO, L.C. **Potencial fungicide dès extraits d’écorce de barbatimão à l’état brut et combines aux ions Fe⁺⁺⁺ et Al⁺⁺⁺**. 1996. 262f. Thèse (Philosophiae Doctor) – Université Laval, Faculté de Foresterie et de Géomatique, Québec, 1996.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

DJIPA, C.D.; DELMEE, M.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). **Journal Ethnopharmacol** v.71, p. 307-313, 2000.

DOAT, J. Les tanins dans les bois tropicaux. **Bois et Forêts des Tropiques**, Nogent, v. 182, p.35-7, 1978.

GONÇALVES, A.L; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Algumas Árvores Nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GONZÁLEZ LOREDO, R.F. Preservación de madera com taninos. **Madera y Bosques**, México, v. 2, n. 2, p. 67-73, 1996.

HASLAM, E. **Chemistry of vegetable tannins**. London: Academic Press, 1966, p. 170.

JAMES, D.B.; ABU, E. A.; WUROCHEKKE, A.U.; ORJI, G.N. Phytochemical and Antimicrobial Investigation of the Aqueous and Methanolic Extracts of *Ximenia americana*. **Journal of Medical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 284-8, 2007.

LOZOYA. X.; NAVARRO, V.; ARNASON, J.T.; KOURANY, E. Experimental evaluation of *Mimosa-tenuiflora* (Willd) poir (tepescohuite) I - Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. **Archives de Investigacion Medica**, v.1, n. 20, p.87-93, 1989.

MECKES LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; RLES, R. J.; SOUCY BREAU, C.; SEN, A.; ARNASON, J.T.N. N-Dimethyltryptamine Alkaloid in *Mimosa tenuiflora* Bark (Tepescohuite). **Archives de Investigacion Medica**, v.2, n.21, p.175-177, 1990.

MELLO, J.P.C.; SANTOS, S.C. Em: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; SIMÕES, C.M.O.; SCHENCKEL, E.P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, 2005.

MORI, F A.; VITAL, B.R.; LUCIA, R.M.; VALENTE, O.F.; PIMENTA, A.S. Utilização de resinas à base de taninos da cascas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden na produção de painéis compensados. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 23, n.4, p.455-461, 1999.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

OGUNLEYE, D.S.; IBITOYE, S.F. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, n.2, p. 239-241, 2003.

PAES, J.B.; DINIZ, C.E.F.; MARINHO, I.V.; LIMA, C.R. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 3, p. 232-238, 2006.

PAES, J.B.; MARINHO, I.V.; LIMA, R.A.; LIMA, C.R.; AZEVEDO, T.K.B. Viabilidade técnica dos taninos de quatro espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro no curtimento de peles. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 453-462, 2006.

PEREIRA FILHO, J.M.; VIEIRA, E.L.; KAMALAK, A. Correlação entre o teor de tanino e a degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta do feno de juremapreta (*Mimosa tenuiflora* Wild) tratada com hidróxido de sódio. **Livestock Research for Rural Development**, v.17, 2005. Disponível em: <<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd178/cero1708.htm>>. Acessado em: 19 agost. 2009.

PEREIRA, M.S.V.; RODRIGUES, O.G.; FEIJÓ, F.M.C.; ATHAYDE, A.C.R.; LIMA, E.Q.; SOUSA, M.R.Q. Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no Semi-Árido Paraibano. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, Patos, v.2, n.1, set – dez, 2006.

PIZZI, A. Tanin-based adhesives. Em: PIZZI, A. (Ed.) **Wood adhesives: chemistry and technology**. New York: Marcell Dekker, p.177-246, 1993.

RECIO, M.C.; RIOS, J.L.; VILLAR, A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. **Phytotherapy Research**, v. 3, n. 4, p. 117-125, 1989.

SANTANA, A.E.G. Em: **Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil**; ARAÚJO, E.L.; MOURA, A.N.; SAMPAIO, E.S.B.; GESTINARI, L.M.S.; CARNEIRO, J.M.T., ed.: Imprensa Universitária: UFRPE, Recife, 2002.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Chichester, v.30, n.12, p.3875-3883, 1991.

SHIMADA, A.N. **Avaliação dos taninos da casca de Eucalyptus grandis como preservativo de Madeira.** 1998. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

SILVA, M. A. R. ; HIGINO, J. S. ; PEREIRA, J. V. ; SIQUEIRA JUNIOR, J. P. ; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato da romã (*Punica granatum* Linn.) e ação sobre plasmídeos em amostras de *Staphylococcus aureus* de origem bovina.. Em: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. **Anais...** Gramado, p.49, 2003.

SILVA, T. S. S. **Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e de esgoto.** 1999. 87 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

SOUZA, T.M.; SEVERI, J.A.; SILVA, V.Y.A.; SANTOS, E.; PIETRO, R.C.L.R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas. Básica e Aplicada**, v. 28, n.2, p.221-226, 2007.

TRUGILHO, P.F., CAIXETA, R.P.; LIMA, J.T.; MENDES, L.M. Avaliação do conteúdo em taninos condensados de algumas espécies típicas do cerrado mineiro. **Cerne**, Lavras: v.3, n.1, p.1-13, 1997.

VERAS, A.O.M.; MORAIS, S.M. Análise dos Constituintes químicos de *Ximenia americana* Linn. 2004. Em: IX Semana Universitária e XIII Encontro de Iniciação Científica da Universidade Estadual do Ceará.

WEBSTERS-ONLINE-DICTIONARY. Tannin (tannic acid). Disponível em: <<http://www.websters-online-dictionary.org/tannin>>. Acesso em: 11 dez 2008.

WENZL, H.F.J. The chemical technology of wood. New York: **The Academic Press**, 1970. p. 692.

ZAR, J. H. Biostatistical Analysis. **Prentice Hall**, Upper Saddle River, New Jersey, p.663, 1999.

CAPÍTULO 4

PEREIRA, Andréia Vieira. **Avaliação comparativa “*in vivo*” com o extrato de jurema preta e antibiótico sintético em búfalas (*Bubalus bubalis*) com mastite clínica.** Patos, PB: UFCG, 2010. 100p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido).

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente o tratamento de animais acometidos de mastite por meio da utilização do extrato botânico de jurema-preta e antibiótico sintético, usando como parâmetros para este estudo: o exame semiótico, métodos diretos de contagem de células (CCS e CMT), contagem do número de colônias por meio da utilização de placas petrifilm, isolamento e identificação dos microrganismos encontrados no leite dos animais antes e durante o tratamento. Foram realizados ensaios de sensibilidade cutânea e testes farmacológicos agudos com o extrato etanólico de jurema preta para avaliar seus possíveis efeitos tóxicos. Foi realizada a cinética bactericida “*in vitro*” com as amostras de *Staphylococcus spp.* coletadas de leite de búfalas com mastite clínica. O tratamento foi instituído por 5 dias consecutivos, sendo a administração feita por via intramamária em ambos tratamentos. As amostras de leite dos animais experimentais foram coletadas nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 5 após o início do tratamento. O estudo da cinética bacteriana demonstrou que as concentrações inibitórias mínimas do extrato de *M. tenuiflora* exercem um efeito bactericida e bacteriostático em um período de 4 horas sobre *Staphylococcus aureus*. O estudo toxicológico pré-clínico agudo demonstrou que o produto avaliado possui toxicidade aguda relativamente baixa. Os resultados das análises pelo método do Petrifilm permite-nos concluir que, de um modo geral, as correlações entre as médias apresentaram valores elevados os quais diminuíram com o decorrer de ambos os tratamentos sendo observadas diferenças significativas ($p>0,05$) nos intervalos 1, 2 e 3.

Palavras-chave: Fitoterapia, mastite, bubalinocultura

PEREIRA, Andréia Vieira. **Comparative evaluation in vivo with the extract of Jurema preta and synthetic antibiotic in buffaloes (*Bubalus bubalis*) with clinical mastitis.** Patos, PB: UFCG, 2010. 100p. (Dissertation – Magister Science in Animal Science – Agroforestry Systems in Semi-arid).

ABSTRACT

The objective of this study was to comparatively evaluate the treatment of animals suffering from mastitis by the use of botanical extract of mimosa and synthetic antibiotics, using as parameters for this study: the semiotic examination, direct methods of cell count (SCC and CMT), count the number of colonies through the use of Petrifilm Plates and isolation and identification of microorganisms found in the milk of animals before and during treatment. It was performed tests of skin sensitivity and acute pharmacological tests with the ethanol extract of *Mimosa tenuiflora* to evaluate their possible toxic effects. We performed bactericidal kinetic *in vitro* with strains of *Staphylococcus spp.* collected milk from buffaloes with clinical mastitis. The treatment was instituted for 5 consecutive days, and the intramammary administration in both treatments. Milk samples of experimental animals were collected on days 0, 1, 2, 3, 4, 5 after initiation of treatment. The study of kinetics showed that the bacterial minimum inhibitory concentrations of the extract of *M. tenuiflora* have a bacteriostatic and bactericidal effect on *Staphylococcus aureus* during a period of 4 hours. The acute toxicological pre-clinical study demonstrated that the evaluated product has relatively low acute toxicity. The results on analysis of Petrifilm method allows us to conclude that, in general, the correlations between the means showed elevated levels which decreased with the passage of both treatments, and that they weren't significant differences ($p > 0.05$) in the intervals 1, 2 and 3.

Keywords: Phytoterapy, mastites, buffaloes livestock

1 INTRODUÇÃO

Os bubalinos apresentam problemas sanitários semelhantes aos bovinos, como a mastite. As perdas com a mastite não estão ligadas somente ao produtor, uma vez que ocorrem além da redução em quantidade, mudanças na composição do leite. Para as indústrias de laticínios, isto significa problemas no processamento, redução do rendimento industrial e produtos lácteos com baixa qualidade e estabilidade. Esta doença pode se apresentar, na dependência da intensidade da resposta inflamatória, de forma clínica que é diagnosticada por alterações no úbere e na secreção láctea e de forma subclínica confirmada por testes baseados no conteúdo celular do leite (RIBEIRO et al., 2003). A contagem de células somáticas, é uma expressão direta da severidade do processo inflamatório, é um parâmetro usual para avaliar a saúde do úbere com relação à qualidade e higiene do leite, e monitoramento em programas de controle de mastites (HARMON, 1994).

Os *Staphylococcus* se destacam entre os agentes envolvidos neste processo que são inesgotáveis fontes de estudos em vários países do mundo, apresentam características específicas de dispersão entre os rebanhos, resistência aos fármacos utilizados no tratamento da doença e grau de toxigenicidade que pode ocasionar riscos à saúde pública (FREITAS et al., 2005). Fazendo-se essencial a seleção do antimicrobiano específico tanto do ponto de vista da saúde do animal, quanto da produtividade da glândula mamária, ocorrendo geralmente uma tendência de aparecimento de cepas resistentes aos antibióticos usuais, além da passagem de resíduos dos mesmos para o leite, que se dá após o tratamento de búfalas em lactação. Estes problemas têm estimulado a busca de substâncias antimicrobianas a partir de novas fontes, incluindo plantas medicinais, por apresentarem grande variedade de compostos com propriedades terapêutica.

A jurema preta (*Mimosa Tenuiflora*) é leguminosa da subfamília *Mimosoidae*, típica de áreas semi-áridas do Brasil, característica da caatinga, que apresentam grande potencial de produção de forragem e constituem, na maioria das vezes, a principal fonte de alimentação animal nesta região (CALDAS PINTO, 2006). Em estudo realizado por MAIA, 2004 indica que a *M. tenuiflora* apresenta potencial antimicrobiano, analgésico, regenerador de células, antitérmico e adstringente peitoral. Segundo Meckes- lozoya et al. (1990), a abundancia de taninos e flavonóides encontrados no extrato da jurema preta é a provável responsável pela atividade antimicrobiana verificada em *Staphylococcus epidermitis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Acinetobacter calcoaceticus*.

Este estudo teve como objetivo avaliar comparativamente o tratamento de animais acometidos de mastite, através da utilização de medicamento fitoterápico (extrato de *Mimosa tenuiflora*) e antibiótico (Cefquinome), usando como parâmetros para este estudo: os sinais clínicos, a prova de CMT, contagens de células somáticas eletrônicas e culturas microbiológicas, além da avaliação do custo dos dois tratamentos, visando controle dos principais microrganismos responsáveis pela mastite bubalina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparação do material

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Ciências Químicas e Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande –UFCG do Centro de Saúde e Tecnologia Rural-CSTR, e Laboratório de doenças infecto contagiosas da UFRPE.

Em julho de 2007 a casca da Jurema preta, adquirida no Centro de Saúde e Tecnologia Rural - CSTR, Campus de Patos – UFCG, a excicata da planta foi depositada no Herbário Carriensis Dárdano de Andrade Lima, da Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, sob o registro #3275.

A planta foi colocada para secagem ao ar por 48hs, em seguida secada na estufa de ventilação forçada a 60° C por 24hs. Para formulação do extrato foram utilizados 500g de casca do caule de Jurema preta para 1L de etanol, deixando a mistura sob extração por 72h, a determinação e concentração foram realizadas segundo a metodologia de Matos (1997). Em seguida foi realizado a quantificação tânica do extrato a ser utilizado, de acordo com Paes et al., 2006.

2.2 Avaliação microbiológica do leite

As amostras de leite colhidas assepticamente de 38 quartos mamários para realização de culturas microbianas, foram coletadas no mês julho de 2008. Coletou-se aproximadamente 5 ml de leite por quarto mamário, com tubo inclinado na posição horizontal (BOUCHOT et al., 1985). As amostras foram armazenadas em tubos rosqueados estéreis, identificados e enviados sob refrigeração em caixas de material isotérmico, para a realização do exame microbiológico, e identificação do *S. aureus* no Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas da Universidade Federal de Pernambuco, onde foram processadas. As amostras foram

previamente homogeneizadas e posteriormente, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em placas de Petri contendo ágar-base acrescido de 5% de sangue desfibrinado de ovino. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C e a leitura foi realizada 24 e 48 horas após. Para a identificação da bactéria, foram observadas as características macromorfológicas das colônias e microscópicas à técnica de Gram seguindo a técnica de Quinn et al. (1994).

Para a identificação microbiana as colônias foram submetidas aos testes de produção de coagulase livre (Plasma Coagulase EDTA, Coagu-Plasma LB – Laborclin, Brasil), DNase (Agar DNase - DFICO) e catalase (SILVA et al., 1997). As provas de produção de acetoina, fermentação da glicose (anaerobiose) e do manitol (aerobiose e anaerobiose) foram realizadas de acordo com Mac Faddin (1980). As amostras de leite foram coletadas e analisadas 5 dias antes da instituição de ambos tratamentos, e 24 horas após a administração dos tratamentos, perfazendo um total de 5 coletas consecutiva.

2.3 Cinética bactericida “*in vitro*” de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret

A curva bacteriana frente ao extrato de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret foi avaliada pelo método de Peyret et al. (1990). As três amostras representativas de *S. aureus* de três animais diferentes foram incubadas em caldo nutritivo (BHI), incubadas a 37° C por 18 a 20 horas e subcultivadas em Muller Hinton – DIFCO por uma hora, obtendo-se um inóculo de 10⁶ UFC/mL. A 9mL da cultura bacteriana foi adicionado 1mL do extrato e ao tubo controle foi adicionado 1 mL de água destilada e esterelizada. Os tubos foram mantidos na estufa a 37° C por 24 horas, e alíquotas foram retiradas após 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas de incubação e semeadas em placas com Mueller Hinton. A leitura das placas foi efetuada após incubação por 48 horas a 37° C, pelo método padrão de contagem de placas. Onde para o tratamento das amostras foi feito com o extrato de jurema preta na concentração de 5% (T) e o controle (C), para cada amostra ensaiada. O efeito bactericida foi definido com a diminuição de 3log de UFC/mL ou 99,9% de morte celular sobre o tempo especificado, como descrito em May et al. (2000).

2.4 Avaliação clínica das glândulas mamárias

2.4.1 Contagem de células somáticas (CCS)

A quantificação de células somáticas foi realizada em 96 animais, totalizando 384 quartos mamários, cujas amostras colocadas em um recipiente contendo conservante, foram enviadas ao laboratório, este método tem como objetivo a detecção de anormalidades no leite como consequência de mastites ou outras causas, permitindo a padronização da qualidade do leite, auxiliando ainda nas pesquisas sobre mastite. Neste método foi detectado 38 quartos mamários com mastite positivos. Pode-se também utilizar métodos diretos de contagem através de microscopia óptica ou contadores eletrônicos, ou por métodos indiretos como o CMT (California Mastitis Test) (CULLEN, 1966; LANGONI, 2000)

2.4.2 Contagem de células somáticas indireta (CMT)

Foi realizado CMT nos 38 quartos mamários positivos ao CCS, obtendo um total de 24 quartos mamários positivos para mastite clínica. Durante a fase de tratamento este método foi realizado 24 horas antes da primeira administração dos tratamentos e 24 horas após a última aplicação. Este método é capaz de detectar a ocorrência de mastite subclínica pelo aumento de células somáticas, principalmente polimorfos nucleares (PMN) por mililitros de leite. De cada glândula mamária colheu-se uma amostra de 2,0 ml de leite, à qual são adicionados na mesma proporção, um detergente aniônico (alquil-lauril sulfato de sódio) capaz de emulsificar os lipídios das membranas dos leucócitos presentes no leite, com conseqüente liberação de material nucléico, sendo que o DNA liberado produz uma viscosidade que caracteriza esta reação. A gelificação da mistura descrita acima, proporcional à quantidade de células presentes, e classificada em distintos escores, conforme às intensidades do processo inflamatório (RADOSTITIS; LESLIE; FETROW, 1994; THIERS et al., 1999).

2.5 Avaliação física das glândulas mamárias e leite

Os úberes foram inspecionados diariamente através de palpação e observação visual, considerando-se alterações de coloração, temperatura, presença de edema e consistência do parênquima mamário. Após o exame físico da glândula mamária, a secreção láctea de cada teto foi submetida à prova do Tamis ou caneca-de-fundo-preto (BLOOD; RADOSTITIS,

1989), observando a cor, consistência da secreção e a presença de massas ou grumos a fim de detectar a ocorrência de mastite clínica (ALMEIDA, 2005).

2.6 Ensaios farmacológicos agudos com o extrato de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret

Foram utilizados 40 camundongos *Albinos swiss*, machos, com idade de 06 a 08 semanas, pesando em média 28g. Os animais foram cedidos pelo Biotério Setorial do Centro de Saúde e Tecnologia Rural- CSTR da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campus de Patos.

Nos ensaios farmacológicos os animais foram distribuídos em 4 grupos de 10 e tratados com 0,25mL do extrato etanólico de *M. tenuiflora*, via intraperitoneal (I.P) em dose única, seguindo o protocolo indicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Anexo 1). Cada grupo foi tratado com o extrato etanólico diluídos nas seguintes proporções extrato/água destilada 1:1; 1:2; 1:4; 1:8 para 40 animais.

Em seguida, foram observados por um período de 24 horas. Foi considerada letal (DL₅₀), a dose que produziu pelo menos 50 % de óbitos dos animais inoculados segundo a metodologia descrita por Brito (1994). Os camundongos foram mantidos em ambiente a uma temperatura de 25 ± 3°C, com umidade relativa do ar entre 30 e 70%. Os períodos de claro e escuro obedeceram a ciclos de 12h. Os animais foram alimentados com ração do tipo purina e água potável, oferecidas à vontade.

2.7 Ensaio de irritação dérmica com o extrato de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret

Nas 24 horas que antecederam o teste os animais foram tricotomizados em área médio-dorsal, em um campo de aproximadamente 1,5 por 1,5 cm, para ser feita a aplicação e à observação nos locais de teste. Três camundongos foram selecionados, para cada diluição da substância teste (1:4 e 1:8), com a pele intacta foram aplicados 0,5ml das soluções a ela. Os locais da aplicação foram cobertos com algodão que foram aderidos à pele com fita adesiva hipoalergênica. Ao finalizar este período os patches de algodão foram retirados e marcou-se o local da aplicação, os excessos da substância de teste foram removidos utilizando solução fisiológica estéril. Os registros foram obtidos após observação aos 3 minutos, 1 hora e 4 horas , quando removidos os patches, e ainda observações foram refeitas a 24, 48 e 72 horas após esta remoção, registrando-se reações na pele para o eritema e edema, somando esses resultados obtidos seguindo o modelo das tabelas 1 e 2, que foi usado para o cálculo do índice da irritação. Desta forma foram classificados de acordo com o índice obtido no Guia de

irritação e de acordo com a escala seguindo: 0-0,9 não irritante; 1,0-1,9 irritante a luz; 2,0-4,9 moderadamente irritante; 5,0-8,0 severamente irritante, de acordo com a norma descrita no Guia OECD N° 404 (2002).

Tabela 4 Definições da irritação e da corrosão dérmica avaliando formação de eritemas e escaras.

Formação de Eritema e Escara	
Sem eritema	0
Eritema muito leve (quase imperceptível)	1
Eritema bem definidos	2
Eritema moderado a severo	3
Severo eritema (vermelhidão) carne aparente, formação de escaras	4
Máximo possível: 4	

Fonte: Guideline OECD 404 de 24 de abril de 2002

Tabela 5 Definições da irritação e da corrosão dérmica avaliando formação de edemas.

Formação de Edema	
Sem edema	0
Edema muito leve (quase imperceptível)	1
Edema leve (bordas da área bem definida, elevando definitiva) bem definidos	2
Edema moderado (elevado aproximadamente 1 mm)	3
Edema grave (arrecadou mais de 1 milímetro e se estendem para além da área de exposição)	4
Máximo possível: 4	

Fonte: Guideline OECD 404 de 24 de abril de 2002.

2.8 Procedimentos preparatórios para o tratamento com antibiótico e extrato de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret

O tratamento foi realizado em 24 quartos mamários de animais em diferentes estágios de lactação, com mamite clínica detectada por meio da contagem de células somáticas (CCS) e por California Mastitis Test (CMT) (SCHALM; NOORLANDER, 1957).

O extrato foi diluído na proporção de 1:4 e 1:8 a partir dos resultados obtidos pela concentração inibitória mínima e farmacológico agudo foi utilizado água destilada, e como fixador glicerina 5% (v/v). Para o grupo controle ficando os quartos esquerdos como controles não inoculados. O antibiótico de escolha foi o Cefquinoma (Intervet®) devido aos resultados de susceptibilidade “*in vitro*” para estirpe *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus spp.* Em ambos os tratamentos, utilizou-se de aplicação intramamária uma vez durante 5 dias, em cada quarto afetado com a infecção foi administrado 15ml de extrato de *M. tenuiflora* e Cefquinoma 8g/ seringa (COSTA, 2002; COSTA, et al., 1999). Antes de cada aplicação, foram realizadas duas ordenhas diárias para esgotamento das glândulas mamárias e coleta das amostras de leite para posterior avaliação microbiológica, foi realizado o pré e pós-dipping com solução iodada 1% e 4%, respectivamente, e os animais experimentais foram mantidos em regime semi-extensivo durante todo tratamento.

2.9 Contagem rápida de *Staphylococcus aureus* pelo método Petrifilm®

As amostras de leite colhidas assepticamente de acordo com a metodologia descrita por Bouchot et al. 1985. As amostras foram armazenadas em tubos rosqueados estéreis, identificados com os números dos animais e intervalos de aplicação de ambos os tratamentos, e enviados sob refrigeração em caixas de material isotérmico, para a realização do exame microbiológico microscópico e submetidas ao método de contagem rápida de colônias de *Staphylococcus aureus* Petrifilm, onde as placas foram inoculadas em duplicata com 1,0mL das diluições usadas pelo método tradicional 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , foram então incubadas a 35-37°C/24h e posteriormente transferidas para uma estufa a 62°C±2°C e mantidas por 1-4h.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação da atividade antimicrobiana entre o extrato de jurema preta e antimicrobiano sintético por momento, foi utilizado o teste t de Student caso os dados

apresentassem distribuição normal, e o teste não paramétrico U de Mann-Whitney para dados com distribuição não normal (ZAR, 1999). O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram feitas com o programa SPSS for Windows versão 13.0. Para a análise da mediana de escores de CMT foi empregado o Teste comparativo de Mann-Whitney.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultado da cinética bacteriana “*in vitro*” de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret

O efeito bactericida do extrato a 5% foi observado nas primeiras quatro horas de contato para todas as amostras. A curva de crescimento bacteriano constatou um efeito bacteriostático do extrato a uma concentração de 0,31% (Tabela 6) durante o período de 24 horas de exposição. A curva de crescimento para as amostras 1, 2 e 3, frente ao extrato testado a 5% demonstrou que no tempo zero; $1,1 \times 10^7$; $1,4 \times 10^7$; e $1,1 \times 10^7$ UFC/mL respectivamente, reduzindo drasticamente estes valores a zero em um período de 4 horas.

Tabela 6 Cinética bacteriana frente ao extrato hidroalcoólico de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. sobre as amostras isoladas de bovinos de *S. aureus*.

Amostras	Tempo de Ação do Extrato (horas)						
	Bacterianas						
TEMPO/horas	0	2	4	6	8	10	24
AMOSTRA 1 (C)	$2,18 \times 10^6$	$6,96 \times 10^6$	$2,16 \times 10^7$	$8,5 \times 10^7$	$1,14 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$
AMOSTRA 1 (T)	$2,18 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	0	0	0	0	0
AMOSTRA 2 (C)	$3,98 \times 10^6$	$5,24 \times 10^6$	$4,51 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7$	$8,65 \times 10^7$	$1,18 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
AMOSTRA 2 (T)	$3,98 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	0	0	0	0	0
AMOSTRA 3 (C)	$2,07 \times 10^6$	$7,08 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$
AMOSTRA 3 (T)	$2,07 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	0	0	0	0	0

(C) Controle; (T) Tratado (Extrato a 5%);

De acordo com Jones et al. (2002) consideraram significativa a cinética bacteriana quando houve uma redução maior ou igual a $3 \log$ UFC/mL do inóculo inicial em um tempo menor ou igual à 24 horas de inoculação, e graus menores de morte celular foram

considerados de efeito bacteriostático em contato com a droga, quando realizaram a cinética com AZD2563, um tipo de oxazolidina, sobre amostras de *S. aureus* Shelburne et al. (2004) consideraram satisfatória a cinética quando houve redução maior ou igual a 2logUFC/mL, também em um período menor ou igual a 24 horas, eles testaram os antibióticos vancomicina, gentamicina e rifampicina, além de várias combinações destes, sobre *S. aureus*. Padilha (2006) avaliou a eficácia antibacteriana e bactericida, através da curva bacteriana frente ao extrato de *Mimosa tenuiflora* a 10%, sobre *Staphylococcus aureus*, e observou que nas primeiras 2 horas de contato, constatando um efeito bacteriostático do extrato, nas concentrações 0,62 e 0,31%.

Substâncias bacteriostáticas impedem o crescimento de microrganismos e fornecem a oportunidade ao hospedeiro de se defender através de mecanismos tais como a fagocitose e produção de anticorpos (TORTORA et al., 2003).

Os resultados apresentados são bastantes significativos, visto que a atividade bactericida do extrato de *M. tenuiflora* (Willd) Poir a 5% determinou a morte celular sobre amostras de *Staphylococcus aureus* em um tempo de exposição de 4 horas, como também foi demonstrado um efeito bacteriostático utilizando-se as concentrações inibitória mínima do extrato frente as amostras ensaiadas. Isto proporciona novas perspectivas posteriores, como a determinação de tolerância e sinergismos ou antagonismos entre os agentes antimicrobianos, além de futuros estudos clínicos *in vivo* e *in vitro*, no sentido de encontrar métodos alternativos de controle e até erradicação deste patógenos.

4.2 Resultado do ensaio farmacológico agudo com o extrato de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret.

Os resultados dos ensaios farmacológicos realizados com o extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret apresentaram uma $DL_{50} = 500\text{mg/Kg}$ o que equivale à diluição 01:02 (Tabela 7). Os animais expostos à dose letal para ambas as plantas testadas apresentaram sintomas “pré-morte” como micção constante (incontinência urinária), piloereção, defecação, cianose, salivação, opacidade de córnea, relaxamento da cauda, taquipnéia, dentre outros. Esses sintomas foram observados no período de 24 horas após aplicação do extrato.

Não há na literatura estudos feitos sobre a determinação da DL₅₀ das duas plantas avaliadas sendo necessário, portanto, a comparação desses resultados com outras plantas cuja dose letal já foi determinada.

De Queiroz et al. 2008, avaliaram a toxicidade aguda do extrato etanólico de *Pradosia huberi* Ducke, administrado via intraperitoneal em camundongos Swiss e obtiveram uma DL₅₀ = 139,7mg/Kg, constatando sua toxicidade, principalmente quando comparada à *M. tenuiflora*.

Tabela 7 Resultados da DL₅₀ do extrato de *Mimosa tenuiflora* em camundongos.

REALIZADOS COM EXTRATO LÍQUIDO DE JUREMA PRETA 0,5% (mg/mL)										
FRAÇÃO EXTRATO/ÁGUA DESTILADA										
GRUPOS/DILUIÇÕES (mg/ml)	G1		G2		G3		G4		G5	
	DIL (0)		DIL (01:01)		DIL (01:02)		DIL (01:04)		DIL (01:08)	
RESULTADOS	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M
TOTAL DE ANIMAIS EXPOSTOS	10	0,0	10	0,0	10	0,0	10	0,0	10	0,0
LEITURA APÓS 24 HORAS	10	0,0	0,0	10	0,5	0,5	0,6	0,4	10	0,0
% de MORTALIDADE APÓS 24 HORAS	10	0,0	0,0	100	0,0	50	0,0	40	0,0	0,0

Legenda: GNT = Grupo não testado; V = animais vivos; M = animais mortos.

4.3 Resultado do ensaio de irritação dérmica com o extrato de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret

Nenhuma presença de edema ou eritema significativo foi observada na pele, obtendo-se assim índices preliminares de irritação de 0,7 e 0 para as diluições 1:04 e 1:08 respectivamente (Tabelas 8 e 9), correspondente a classificação de não irritante.

Tabela 8 Classificação e média dos índices de irritação cutânea em camundongos submetidos ao protocolos OECD 404 com extrato de *Mimosa tenuiflora* na diluição de 1:4.

	3 minutos		1 hora		4 horas		24 horas		48 horas		72 horas	
	ERI	ED E	ERI	ED E	ERI	ED E	ERI	ED E	ERI	ED E	ERI	ED E
Animal 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Animal 2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Animal 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total:	0		2		0		0		0		0	
Média:	0,7											

ERI: Eritrema; **EDE:** Edema

Tabela 9 Classificação e média dos índices de irritação cutânea para formações de eritremas e edemas observados em camundongos submetidos ao protocolos OECD 404 com extrato de *Mimosa tenuiflora* na diluição de 1:8.

	3 minutos		1 hora		4 horas		24 horas		48 horas		72 horas	
	ERI	ED E	ERI	ED E	ERI	ED E	ERI	ED E	ERI	ED E	ERI	ED E
Animal 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Animal 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Animal 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total:	0		0		0		0		0		0	
Média:	0											

ERI: Eritrema; **EDE:** Edema

Queiroz (2008) avaliou o potencial de irritação cutânea das formulações foi verificado por meio do teste de irritação primária de pele em coelhos e observou-se que os géis de carbopol com solução extrativa etanólica e extrato bruto *Matricaria recutita* Linn nas concentrações de 3 e 5% quando aplicados na pele intacta não provocou irritação.

4.4 Resultado do método Califórnia para mastite (CMT – TCM)

Foi realizado o CMT no início e no fim do experimento, classificando-se como negativo, quando da ausência de reação ou com reação fraca, o qual foi representado por uma cruz (+) 0,1; quando positivo e com a reação média, foi representado por duas cruces (++) 0,2; e, quando forte e com presença de grumos, foi representado por três cruces (+++) 0,3 (RIBEIRO et al., 2008).

Verificou-se que os resultados das medianas dos CMTs dos quartos inoculados tratados com o extrato, não foram estatisticamente significantes ($p < 0.01$) quando comparados aos tratados com Cefquinoma (Tabela 10).

Tabela 10 Escores de Califórnia Mastitis Test dos grupos tratados com o extrato e antibiótico.

	ESCORE CMT			PADRÃO CMT (0-4)
	QM	EXT	ANT	
1	0.2	0.3		
2	0.2	0.2		
3	0.3	0.3		
4	0.2	0.2		
5	0.3	0.3		
6	0.2	0.2		
7	0.3	0.3		
8	0.3	0.3		
9	0.2	0.3		
10	0.3	0.2		
11	0.2	0.3		
12	0.3	0.2		

QM= quarto mamário; EXT= extrato; ANT= antibiótico

De acordo com Philpot e Nickerson (1991), na glândula infectada, as células de defesa correspondem de 98 a 99% das células encontradas no leite de acordo com Ribas (1996), esse número está entre 75% e 98% do total da CCS. Os linfócitos perfazem de 20 a 40% do total de células e o restante corresponde a macrófagos e células secretoras descamadas (DANIEL et

al., 1991). As contagens elevadas de polimorfonucleares indicam a presença de uma inflamação aguda, por outro lado contagens baixas como, por exemplo, 40% podem indicar uma lesão crônica (BENITES; MELVILLE; COSTA, 2000). No presente estudo a porcentagem de polimorfonucleares das amostras de leite dos animais estudados, nos dias do experimento correspondeu ao quadro de mastite aguda corroborando com os resultados obtidos por Almeida (2004), que realizou tratamento de mastite em bovinos por meio de homeopatia inoculados artificialmente com *Staphylococcus aureus*.

4.5 Resultado do exame microbiológico

O teste da caneca foi realizado diariamente em todos os quartos mamários tratados, sendo possível observar o desaparecimento dos grumos no terceiro dia após a inoculação em ambas concentrações dos extratos, o mesmo observado nos quartos avaliados com o antibiótico. No entanto, no dia seguinte a primeira inoculação com a diluição 1:4 os quartos mamários laterais direitos apresentaram sensibilidade, aumento no volume e inchaço. No quarto dia após a terceira inoculação não foi observado processo de sensibilidade.

Segundo Schembri (1992) essa reação inflamatória pode ser explicada pelo princípio da homeopatia, onde a uma elevação no número de colônias isoladas entre as duas coletas iniciais e redução nas subseqüentes ocorrendo inicialmente uma exacerbação da enfermidade com posterior reação do organismo ao produto. Hamley (1979) afirma que essa reação da força vital que é a ação secundária ou contrária, onde o organismo estará atuando para restauração do estado de normalidade.

Na avaliação que antecedeu as inoculações os isolados foram classificados em *Staphylococcus spp*, *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) e em *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) quando a bactéria não coagulava o plasma de coelho, apresentava características de estafilococos na técnica de coloração de Gram, fermentava a glicose em anaerobiose e produzia a catalase (BAIRD-PARKER, 1990). Após as inoculações com ambos os tratamentos foi possível isolar e quantificar colônias de *Staphylococcus aureus* nos lotes experimentais pelo método do Petrifilm, que talvez tenham passado despercebidas pelo método tradicional. Ao se considerar somente colônias típicas na contagem pelo método do Petrifilm, foi observada diferença significativa pelo teste de U de Mann-Whitney, quando o extrato de jurema preta foi comparado ao tratamento com o antibiótico Cefquinome, na diluição 10^{-1} no segundo dia, na diluição 10^{-2} e 10^{-3} no primeiro e segundo dia de tratamento,

e diferindo estatisticamente em todas as diluições para o segundo dia de tratamento ($P < 0,05$, Tabela 11).

Tabela 11 Médias e desvio padrão da avaliação microbiológica do leite de búfalas pelo método Petrifilm.

Tratamentos/ antibióticos	Atividade antimicrobiana <i>in vivo</i> (Contagem do nº colônias de <i>S. aureus</i>)		
	Diluição 10^{-1}	Diluição 10^{-2}	Diluição 10^{-3}
Dia 1	153,0 ($\pm 112,1$)	88,8 ($\pm 83,7$) *	80,3 ($\pm 57,3$)*
Dia 2	68,8 ($\pm 35,1$) *	63,8 ($\pm 66,6$) *	46,3 ($\pm 38,3$) *
Dia 3	107,5 ($\pm 98,8$)	78,3 ($\pm 35,9$)	47,00 ($\pm 18,13$)
Dia 4	51,5 ($\pm 25,8$)	34,25 ($\pm 15,20$)	26,75 ($\pm 13,48$)
Dia 5	26,75 ($\pm 7,59$)	19,00 ($\pm 5,72$)	13,75 ($\pm 14,38$)

* Diferença significativa ($P < 0,05$)

Médias seguidas de desvio padrão na mesma linha, teste de U de Mann-Whitney, ao nível de 5% de significância.

Em ambos os tratamentos foram encontradas colônias de *Staphylococcus aureus* após o final do experimento. No entanto na análise microbiológica microscópica foi possível detectar a presença outros microrganismos como *Bacillus* e *Streptococcus* no leite dos animais tratados com o extrato, e *Staphylococcus spp* e *Bacillus* no leite dos animais tratados com o antibiótico.

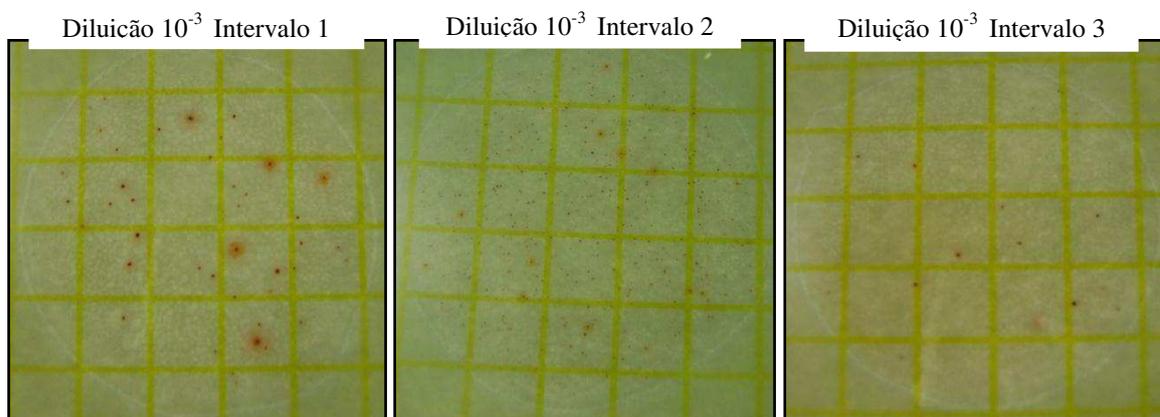


Figura 13 Contagem de colônias pelo método Petrifilm nos lotes experimentais com extrato de *M.tenuiflora*.



Figura 14 Contagem de colônias pelo método Petrifilm nos lotes experimentais com o antibiótico Cefquinoma.

Segundo Ziv (1992) nos tratamentos convencionais se utilizam preferencialmente antimicrobianos por via intramamária ou mesmo outra via de aplicação em conjunto para controlar esses casos e até mesmo como tratamento preventivo (COSTA, 2002). Wilson et al. (1999) comparando índices de cura bacteriológica em 9.007 casos de mastite sub-clínica, tratados com sete antibióticos e sem tratamento medicamentoso, encontrou que nos animais em que o *S. aureus* foi isolado, o índice de cura sem a utilização de medicamentos foi de 57%.

O método Petrifilm é um sistema quantitativo, cada colônia é testada para a produção de termonuclease, o que não ocorre com o teste de coagulase que é semiquantitativo, já que colônias características são selecionadas para a confirmação (SANTANA, 2005). Segundo Nascimento e Corbia (2001), os quais relatam a importância de se fazer uma amostragem das placas, tipos de colônias diferentes, sob pena de obter-se falhas na quantificação dessas bactérias por este método, já que foram observadas colônias com e sem halos e que posteriormente, foram confirmadas como *S.aureus* e que os halos ao redor das colônias de estafilococos coagulase positivos podem algumas vezes não ser observados, em virtude da presença de cepas não lipolíticas. No entanto Baird-Parker (1990); Lancette (1992) em teste semelhante afirmam que nem todas as cepas de *S.aureus* têm a capacidade de hidrolisar a gema do ovo. Santana (2005) em estudo comparativo entre o método convencional e a utilização do sistema Petrifilm afirma que este sistema Petrifilm é uma alternativa viável para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos, em virtude do menor tempo (aproximadamente 31 horas) para a obtenção de resultados quantitativos.

Devido à insipiência de trabalhos na literatura científica específica sobre o assunto referente ao controle da mastite utilizando extratos vegetais por via intramamária, foi

necessária então a adequação de protocolos de tratamento para condução desta pesquisa, dentro de metodologia previamente estabelecida e estudos de natureza clínico-farmacológica e toxicológica. No entanto se faz necessários estudos aprofundados que permitam conhecer as utilidades e os possíveis riscos do uso dessas substâncias, para que seja comprovada cientificamente a eficácia dos mesmos.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem a importância clínica de se avaliar meios alternativos e economicamente viáveis para controle de infecções em medicina veterinária clínica. Neste contexto, pode-se concluir que:

- O extrato de *M. tenuiflora* apresenta potencial de atividade antimicrobiana e significativa atividade bactericida *in vitro* sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* ensaiadas.
- O estudo de cinética bacteriana demonstrou que as concentrações inibitórias mínimas do extrato de *M. tenuiflora* exercem um efeito bactericida e bacteriostático em um período de 4 horas sobre *Staphylococcus aureus*.
- O estudo toxicológico pré-clínico agudo em camundongos *Swiss*, tratados com as doses do extrato de *M. tenuiflora* via intraperitoneal, demonstrou que o produto avaliado possui toxicidade aguda relativamente baixa, evidenciada pelos valores de DL₅₀ superiores 2,0 g/kg i.p.
- Comparando as diluições usadas pelo método Petrifilm, conclui-se que de um modo geral as correlações das médias apresentaram valores elevados que diminuiram com o decorrer de ambos dos tratamentos.

6 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA A. C.; FONSECA Y. M.; SOARES T.M.P.; SILVA D. B.; BUELTA T.T. M.; SILVA G. L. M. E. Tratamento de mastite subclínica em bovinos utilizando bioterapia, **Revista da Universidade de Alfenas**, v.5, p.199-203,1999.
- ALMEIDA, L. A. B. Avaliação do tratamento alopático e homeopático de mastite bovina em animais inoculados com *Staphylococcus aureus*. [Evaluation of allopathic and homeopathic treatments of bovine mastitis in inoculated animals with *Staphylococcus aureus*]. 2004. 104 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- ALMEIDA, L. A. B., BRITO, M. A. V. P., BRITO J. R. F., PIRES M. F. Á. , BENITES N. R. Tratamento de mastite clínica experimental por meio de ordenhas múltiplas em vacas leiteiras inoculadas com *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.1, p.1-6, 2005.
- BAIRD-PARKER, A.C. The *Staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.19, p.15-85, 1990. BLOOD, D. C.; RADOSTITIS, O. M. **Mastitis. In: Veterinary medicine**. 7. ed. London: Baillière Tindall, 1989, 501-559 p.
- BOUCHOT, M. C.; CATEL J.; CHIROL C.; GANIERE J.P.; MENEZES M. L. Diagnostic bactériologique des infections mammaires des bovins. **Recueil Médicina Veterinária**, p. 567-577, 1985.
- BRITO, A.S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. Editora da UNICAMP. Campinas, SP, 1994, 15-19 p.
- CALDAS PINTO, M. S.; BORGES CAVALCANTE, M. A.; MEIRA DE ANDRADE, M. V. Potencial forrageiro da caatinga, fenologia, métodos de avaliação da área foliar e o efeito do déficit hídrico sobre o crescimento de plantas. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**, v.7, nº. 04 ®. Disponível no site: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>, 2006.
- COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. (Eds.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.443-455, 2002.

COSTA, E.O.; SÁ, R.; PONCE, H.; WATANABE, E.T.; VALLE, C.R. Avaliação da terapia de mastite clínica: eficácia terapêutica em número de dias em tratamento. **Napgama**, v.2, n.2, p.10-14, 1999.

CULLEN, G. A. Cells in milk. **Veterinary Bulletin**, v. 36, p. 337-346, 1966.

FREITAS, M.F.L. et. al. Perfil da Sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no Agreste do Estado de Pernambuco **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

GUIMARÃES-BEELLEN, P. M.; BERCHIELLI, T. T.; BEELEN, R.; ARAÚJO FILHO, J.; OLIVEIRA, S. G. Characterization of condensed tannins from native legumes of the brazilian Northeastern semi-arid. **Scientia Agricola**. v.63, n.6, p.522-528, 2006.

HAMLEY,E.C. **A arte de curar pela homeopatia**. O organon de Samuel Hahnemann. São Paulo: Rocca, 1979. 109p. HARMON R. J. Symposium: mastitis and genetic evaluation for somatic cell count. **Journal Dairy Science**, v.77, n. 7, p.2103- 2112, 1994.

JONES RN, ANDEREGG TR, DESHPANDE LM. AZD2563, a new oxazolidinone: bactericidal activity and synergy studies combined with gentamicin or vancomycin against staphylococci and streptococcal strains. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.43, p.87-90, 2002.

LANCETTE, G.A. & TANINI, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. (Ed.) Compendium of methods of the microbiological examination of foods. 3 ed. Washington D.C. **American Public Health Press**, p.533-550, 1992.

LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 3, n. 3, p. 57-64, 2000.

MAC FADDIN, J.F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980, 527p.

MAIA, G. N. **Caatinga** - árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo D&Z Computação Gráfica e Editora. p.237-246, 2004.

MAY J., CHAN C.H., KING A., WILLIAMS L., FRENCH G.L. Time -kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **Journal Antim. Chemother**. v.45, p.639-643, 2000.

MECKES-LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; MARLES, R.; SOUCY-BREAU, C. and Avalokitesvarasen, A. J.; N,N-Dimethyltryptamine alkaloid in *Mimosa tenuiflora* bark (Tepescohuite). **Archivos de Investigación Medica**, v.21, p.175-177, 1990.

MITIDIÉRO A.M. A. **Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira: avaliação dos aspectos sanitários e de produção**. 2002. 78f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis-SC.

NASCIMENTO, M.G.F., CORBIA, A.C.G. & NASCIMENTO, E.R. **Limitações da técnica de isolamento e enumeração de *Staphylococcus aureus***. Comunicado Técnico 45. Embrapa. Rio de Janeiro, 2001, 4p.

PADILHA, I. Q. M. **Antimicrobial evaluation of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. extract from Northeastern, Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus***. 2006. 73f. Monografia (Ciências Biológicas) Universidade Federal da Paraíba, UFCG, João Pessoa-PB.

PEYRET M. et al. Etude mathématique de la curve de mortalité d' *Echerichia coli* exposés aux polymyxines. **Patholog biolog.** v.38, p.441-445, 1990.

QUEIROZ, M. B. R. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *Matricaria* (L.) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico**. 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

QUINN, P. J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolf, 1994, p. 648. RADOSTITIS, O. M.; LESLIE, K. E.; FETROW, J. **Mastitis control in dairy herds**, 1994. 83p.

RIBEIRO, J. E.; SILVA, M. H.; VIEGAS, S. A. A.; RAMALHO, E. J.; RIBEIRO, M. D.; OLIVEIRA, F. C. S. California Mastitis Test (CMT) e whiteside como métodos de diagnóstico indireto da mastite subclínica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.4, p. 680-686, 2008 .

RIBEIRO, M. E. R. et al. Relação entre mastites clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Agrociência**, v.9, n.3, p-287-290, 2003.

- SANTANA, A. S., AZEREDO, D. R. P. Comparação entre o sistema petrifilm RSA® e a metodologia convencional para enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.25, n.3, p.531-535, 2005.
- SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, p.130- 199, 1957.
- SCHEMBRI, J. **Conheça a homeopatia**. Belo Horizonte: Z. A Schembri, 1992. 263p.
- SHELBURNE SA, MUSHER DM, HULTEN K, et al. In vitro killing of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with drug combinations. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p.4016-19, 2004. SILVA, M. A. R. ;
- HIGINO, J. S. ; PEREIRA, J. V. ; SIQUEIRA JUNIOR, J. P. ; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato da romã (*Punica granatum* Linn.) e ação sobre plasmídeos em amostras de *Staphylococcus aureus* de origem bovina.. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA*. Anais... Gramado, p49, 2003.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997, 295 p.
- OECD N° 404. **Guideline for testing chemical. Acute dermal Irritation / corrosion**. 2002.
- QUEIROZ T. M. ; MEDEIROS A.A.N.; MEDEIROS F. A.; BATISTA L.M. ; MEDEIROS I.A. (2008). Triagem fitoquímica e estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de *Pradosia huberi* Ducke. Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Ciências Farmacêuticas/PET Farmácia <http://www.prg.ufpb.br/encontroenic/apresentacao.html>.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CESE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- THIERS, F. O.; BENITES, N. R.; RIBEIRO, A. R.; COSTA. E. O. Correlação entre contagem direta de células somáticas e o teste de “California Mastitis Test” (CMT) no leite de vacas. **Napgama**, v. 2, n. 4, p. 9-12, 1999. ZAR, J. H. Biostatistical Analysis. **Prentice Hall**, Upper Saddle River, New Jersey, p.663, 1999.
- ZIV, G. Treatment of acute mastitis. **Veterinary Clinics of North America**, v.8, n.1, p.1-16, 1992.

WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; CASE, K.L.; GARRISON, L.L.; GRÖHN, Y. T.
Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy
against bovine mastitis pathogens. **Journal Dairy Science**, v.82, n.8, p.1664-1670, 1999.

ANEXOS

Anexo A 1- Tabela de toxicidade aguda

Anexo A 2- Protocolo para determinação da concentração de extratos vegetais.

Anexo A 3- Artigo publicado em revista.

A1
TABELA DE TOXICIDADE AGUDA

CAIXA Nº de animais Peso (g)	1					2				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Atividade geral	4									
Frêmito vocal	0									
Irritabilidade	0									
Resposta ao toque	4									
Aperto de cauda	4									
Contorção	0									
Trem posterior	0									
Endireitamento	4									
Tônus corporal	4									
Força de agarrar	4									
Ataxia	0									
Reflexo auricular	4									
Reflexo corneal	4									
Tremores	0									
Convulsões	0									
Estimulações	4									
Straub	0									
Hipnose	0									
Anestesia	0									
Lacrimação	0									
Ptozes	0									
Micção	4									
Defecação	4									
Piloereção	0									
Hipotermia	0									
Respiração	4									
Cianose	0									
Nº de mortos										

Data: _____

Dose: _____

Tempo de observação: _____

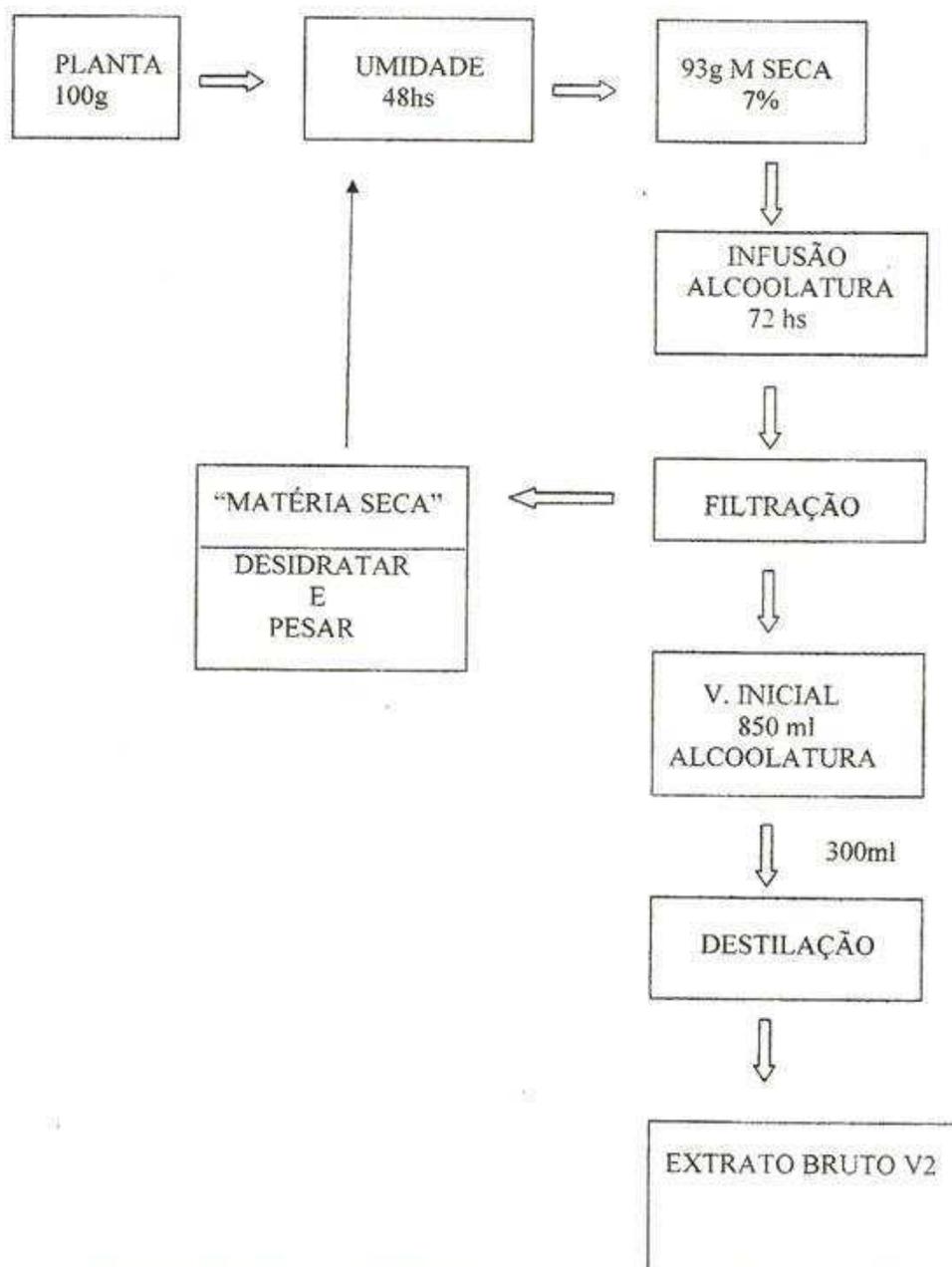
Investigador: _____

Amostra: _____

Via: _____

A 2

PROTOCOLO



$$EX \ m/v = \frac{MASSA \ DESIDRATADA - MASSA \ SECA}{VOLUME \ FINAL}$$

ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATO DE JUREMA PRETA (*MIMOSA TENUIFLORA*) E ANTIBIÓTICOS SINTÉTICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE MASTITE EM BUBALINOS.

Andréia Vieira Pereira^{1,5}; Onaldo Guedes Rodrigues²; Ednaldo Queiroga de Lima²; Karla Aparecida Oliveira³; Rinaldo Aparecido Mota⁴; Elisabeth Sampaio de Medeiros⁵;

RESUMO

A mastite é uma das importantes enfermidades; dessa forma, o produtor sofre com severos prejuízos econômicos e tem a qualidade da sua produção comprometida. A enfermidade geralmente é tratada com antibióticos. Esta prática vem sendo questionada devido à presença de resíduos no leite, e seus riscos para seres humanos. Atualmente, nota-se uma busca por métodos alternativos de controle e tratamento. Este estudo teve como objetivo avaliar as atividades antimicrobianas de extratos alcoólicos de casca de Jurema preta e antibióticos sintéticos, ambos no tratamento de mastite em bubalinos. Para formulação do extrato foram utilizados 500g de casca do caule de Jurema preta para 1L de etanol; o extrato foi diluído na proporção de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32 para a determinação da atividade antimicrobiana da planta testada. Já para os ensaios de antibiose foi utilizado o método da difusão em ágar, frente a microrganismos *Staphylococcus sp.* coagulase positiva e negativa, isolados de leite obtidos de búfalas. Pelos resultados experimentais, constatou-se efeito do extrato de Jurema preta no tratamento de mastite em bubalinos com atividade antimicrobiana nas concentrações de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; e que o microrganismo utilizado, neste estudo, apresentou resistência a alguns antibióticos comerciais, com maior percentagem a Eritromicina (47,5%) e menor a Cefquinome com 4,2%.

Palavras chave: Jurema preta, sensibilidade bacteriana, antibióticos sintéticos, bubalinos.

COMPARATIVE STUDY OF THE ANTIMICROBIANA ACTIVITY OF EXTRACT OF JUREMA BLACK (*MIMOSA TENUIFLORA*) AND USED SYNTHETIC ANTIBIOTICS IN THE TREATMENT OF MASTITI IN BUBALINOS.

ABSTRACT

The mastitis is one of the major diseases, thus, the producer suffers from severe economic losses and the quality of its production compromised. The disease is usually treated with antibiotics. This practice has been questioned due to the presence of residues in milk, and its risks to humans. Currently, there is a search for alternative methods of control and treatment. This study evaluated the antimicrobial activity of alcoholic extracts from the bark of Jurema black and synthetic antibiotics, both in the treatment of mastitis in buffaloes. For formulation of the extract were used

¹ Aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela UFCG. Av. Universitária, s/n, Bairro Santa Cecília, CEP: 58708-110., Patos-PB. andreiavet@hotmail.com

² Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, UFCG, Patos, PB, E-mail: equeiroga@buynet.com.br. Av. Universitária, s/n, Bairro Santa Cecília, CEP: 58708-110, Patos-PB.

³ Aluno(a) da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, UFCG, Patos, PB, E-mail: karlinhabiologia@yahoo.com.br. Av. Universitária, s/n, Bairro Santa Cecília, CEP: 58708-110, Patos-PB.

⁴ Universidade Federal Rural do Pernambuco- UFRPE

⁵ Aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela UFRPE

⁵Bolsista do CNPq