



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
ALCOOLICO DO FRUTO DA *Caesalpinia ferrea* Mart. FRENTE
A BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA**

KLÍVIO LORENO RAULINO TOMAZ

Médico Veterinário

MOSSORÓ – RN – BRASIL

Junho – 2010

KLÍVIO LORENO RAULINO TOMAZ

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
ALCOOLICO DO FRUTO DA *Caesalpinia ferrea* Mart. FRENTE
A BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do
Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte
das exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva

MOSSORÓ – RN – BRASIL

Junho – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFRSA

T655a Tomaz, Klívio Loreno Raulino.

Atividade antimicrobiana do extrato alcoólico do fruto da

Caesalpinia ferrea Mart. Frente a bactérias causadoras de

mastite bovina. / Klívio Loreno Raulino Tomaz.

--

Mossoró, 2010.

64f. il.

Dissertação (Mestrado em Ciência animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Orientador: Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva.

Co-orientador: Prof. Dr. Benito Soto Blanco.

1. Fitoterapia. 2. *Caesalpinia ferrea*. 3. Mastite bovina. 4. Halo de inibição. I. Título.

CDD: 581.634

Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza

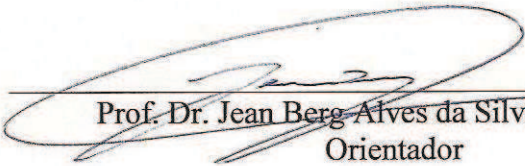
KLÍVIO LORENO RAULINO TOMAZ

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
ALCOOLICO DO FRUTO DA *Caesalpinia ferrea* Mart. FRENTE
A BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do
Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte
das exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal.

APROVADA EM 27/08/2010

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva (UFERSA)
Orientador



Prof. Dr. Benito Soto Blanco (UFERSA)
Primeiro Conselheiro



Profa. Dra. Suzana Aparecida Costa Araújo (UFPB)
Segundo Conselheiro

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KLÍVIO LORENO RAULINO TOMAZ– Nascido no Município de Pau dos Ferros-RN no dia 19/07/1982, filho de Orlando Tomaz da Costa e Maria José Raulino Tomaz, concluiu o ensino médio no Colégio Diocesano Santa Luzia em Mossoró - RN. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2006.1, onde foi bolsista de monitoria de Histologia Veterinária do 2° ao 6° períodos e de PIBIC do 7° ao 9° períodos. Aprovado em concurso público do Instituto de Assistência Técnica e Extensão Rural do Rio Grande do Norte (EMATER – RN), onde trabalhou durante 3 anos. Desde 2009 é médico veterinário de pequenos de animais no hospital veterinário Dix-Huit Rosado Maia na Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA. Em janeiro 2008 foi selecionado pelo Programa em Pós-Graduação em Ciência Animal pela UFERSA.

Ao meu saudoso avô, João Tomaz da Silva (*in memoriam*) que foi exemplo para conseguir atingir todos os meus objetivos na vida.

Dedico

*“Fulgurou o sol...
Crepúsculo lindo
De pé estou eu
Pra roça tô indo
Resido no sertão
Pobre de vida
Sou Sebastião
Louco sem saída.
Reparo o solo...
Pura tristeza,
Rachado, seco,
Isento de beleza.*

*Filhos famintos
Tenho que alimentar
Da terra procuro viver
Mas impossível plantar.
Ah!!! Herói xique-xique
Nosso único alimento,
Cru ou cozido
Alivia sofrimento...
Desde que nasci
Conhecido “Bastião”
Agricultor não sou
Difícil cultivar este chão,*

*Um dia escaparei
Desse grande tormento
Só rezo pela família
No triste momento...
Sonho em te deixar
Insuportável mundão
Quando eu morrer
Há de chover no sertão...
Os filhos entregarei
Com toda devoção,
Aqui não estarei
Serei o finado Sebastião.*

,

Klívio Tomaz

AGRADECIMENTOS

- ✓ Primeiramente a Deus que me iluminou nessa caminhada;
- ✓ A todos que torceram por mim e aos que não torceram também, pois estes de alguma forma me motivaram a fazer sempre o melhor;
- ✓ A minha família como um todo, em especial minha mãe Maria José, meu pai Orlando, minhas irmãs Eulina, Savana e Ana Raquel;
- ✓ A minha namorada Rosana que esteve comigo nos últimos instante de estresse e meu apoiou bastante para essa vitória;
- ✓ A EMATER e sua equipe de Pau dos Ferros – RN que me apoiaram no início do mestrado com muita compreensão em minhas ausências;
- ✓ Ao produtor rural, que infelizmente não sei o nome, mas que com seu conhecimento emprírico deu origem a esse estudo;
- ✓ Aos meus orientadores Jean Berg e Benito Blanco por toda atenção dada ao trabalho. Aos senhores meu muito obrigado;
- ✓ Agradeço a Profa. Suzana pela participação na banca e colaboração para a melhoria do trabalho;
- ✓ A Rociene Abrantes e Manuela Rocha, duas pessoas primordias nesse estudo, meu agradecimento sincero;
- ✓ Ao Médico Veterinário Antônio Carlos pelo apoio importante nas melhorias do trabalho;
- ✓ Aos grandes amigos, constantes e presentes, Ana Carla, Êlika, André, Caio, entre tantos que fica difícil elencar todos.

Obrigados a todos vocês...

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ALCOÓLICO DO FRUTO DA *Caesalpinia ferrea* Mart. FRENTE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA

TOMAZ, K.L.R. **Atividade antimicrobiana do extrato alcoólico do fruto da *Caesalpinia ferrea* Mart.** 2010. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2010.

RESUMO.- O tratamento usual da mastite bovina é realizado com administração de antimicrobianos, que muitas vezes, promovem a resistência bacteriana a esses compostos. Medicamentos fitoterápicos têm sido utilizados, porém nem todas essas opções apresentam comprovação científica acerca da eficácia de ação contra os agentes causadores da enfermidade. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato alcoólico do fruto da *Caesalpinia ferrea* Mart. frente a bactérias causadoras de mastite bovina. O estudo foi dividido em dois experimentos sequenciais. No experimento I, avaliou-se o potencial da atividade antimicrobiana da solução aquosa líquida (extrato 1) e liofilizada (extrato 2) do resíduo etanólico fracionado com clorofórmio e solução aquosa do resíduo etanólico liofilizado (extrato 3) frente doze bactérias selecionadas (quatro cepas padrão e oito cepas de campo), como triagem para o experimento seguinte. No experimento II, utilizando a mesmas bactérias do experimento anterior, avaliou-se o potencial da atividade antimicrobiana do extrato que obteve melhor resultado no experimento I, em oito diluições. Esse estudo foi desenvolvido através da técnica do poço e em triplicatas. No experimento I, os resultados indicaram que 91,66% das bactérias analisadas não apresentaram diferença estatística para a atividade antimicrobiana entre os três extratos, constatando que o processo de liofilização não alterou o potencial da atividade antimicrobiana dos extratos 2 e 3. No experimento II foi utilizado o extrato 1 e os resultados indicaram que o halo de inibição antimicrobiana diminui com o aumento da diluição do extrato, e que as bactérias isoladas de vacas com mastite apresentaram uma resposta menor em relação as bactérias padrão. A *Caesalpinia ferrea* apresentou atividade antimicrobiana potencial que sugere novas avaliações experimentais a fim de avaliar a toxicidade, sendo uma possível opção terapêutica para ensaios biológicos *in vivo* no controle da mastite bovina.

Palavras-Chave: *Caesalpinia ferrea*, halo de inibição, fitoterapia, mastite bovina.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ALCOHOLIC EXTRACT OF THE *Caesalpinia ferrea* MART. FRUIT AGAINST BOVINE MASTITIS BACTERIA

TOMAZ. K.L.R. Antimicrobial activity of the alcoholic extract of the *Caesalpinia ferrea* Mart. fruit against bovine mastitis bacteria. 2010. 64p. Thesis (Master's degree In Animal Science) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2010.

ABSTRACT: Routine treatment for bovine mastitis is the use of antimicrobials that often promote bacterial resistance to these compounds. The use of phytoterapic medicaments have been growing in the last decade. However, many of these therapeutic options have no scientific evidence of its action efficiency against disease causing agents. The present work aimed to evaluate the antimicrobial activity of the alcoholic extract *Caesalpinia ferrea* Mart. fruit against bovine mastitis bacteria. The study was divided into two sequential experiments. Experiment I evaluate the potential of antimicrobial activity of the liquid aqueous solution (extract 1) and lyophilized (extract 2) of the ethanolic residue fractioned with chloroform and the aqueous solution of the ethanolic lyophilized residue (extract 3) against twelve selected bacteria (four standard and eight field strains), as a screening method for the following experiment. Experiment II used the same strains in the previous trial and evaluates the antimicrobial activity of the best extract in experiment I in eight dilutions. This study was performed using the well technique and in triplicate. Results from Experiment I report that 91.66% of the analyzed bacteria showed no statistical difference among the three extracts and confirms that the lyophilization process did not alter the antimicrobial activity of the extract 2 and 3. Extract 1 was used in Experiment I, results indicated that the antimicrobial inhibitory halo diminishes when extract dilution increases and bacteria isolated from bovine mastitis showed a minor response compared to the standard bacteria. *Caesalpinia ferrea* fruit extract reveals potential antimicrobial activity and a possible therapeutic option to biological assays *in vivo* in the bovine mastitis control.

Keywords: *Caesalpinia ferrea*, inhibition halo, fitoterapia, mastitis bovine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
ANOVA	Análise de variância
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Graus Celsius
CCS	Contagem de Células Somáticas
CMT	California Mastitis Test
g	Grama
LDH	Lactato Desidrogenase
mm	Milimetro
µl	Microlitro
mL	Mililitros
NAGase	N-acetil-β-D-glucosaminidase
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PH	Potencial Hidrogeônico
PMNs	Polimorfonucleares
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-árido
UECE	Universidade Estadual do Ceará

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Cepas bacterianas empregadas nos testes de atividade antimicrobiana.....	45
Quadro 2 - Concentração das diluições do tratamento empregado nos testes de atividade antimicrobiana no experimento 2.....	47
Quadro 3 - Modelo de classificação dos halos de inibição utilizado no experimento 2.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fruto (A), Árvore (B), Flor (C) de <i>Caesalpinia férrea</i>	31
Figura 2 - Halos de inibição antimicrobiana (mm) em função das diluições do extrato 1 da <i>Caesalpinia ferrea</i> frente a cepas bacterianas padrão (yPadrão) e isoladas do campo (yCAMPO).....	50
Figura 3 - Sensibilidade das bactérias testadas frente às diluições do extrato 1 da <i>Caesalpinia ferrea</i>	51
Figura 4 - Sensibilidade geral das bactérias avaliadas frente às diluições do extrato 1 do fruto da <i>Caesalpinia ferrea</i>	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias dos halos de inibição antimicrobiana (mm) dos extratos 1, 2 e 3* do fruto da <i>Caesalpinia ferrea</i> frente a quatro cepas bacterianas padrão e oito cepas bacterianas isoladas de casos de mastite bovina utilizando o teste de difusão em poço.....	49
Tabela 2. Médias dos halos de inibição antimicrobiana (mm) do extrato 1 do fruto da <i>Caesalpinia ferrea</i> em oito diluições frente a quatro cepas bacterianas padrão utilizando o teste de difusão em poço.....	53
Tabela 3. Médias dos halos de inibição antimicrobiana (mm) do extrato 1 do fruto da <i>Caesalpinia ferrea</i> em oito diluições frente a oito cepas bacterianas isoladas de casos de mastite bovina utilizando o teste de difusão em poço.....	54

SUMÁRIO

	Página
1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
1.1. MASTITE BOVINA.....	16
1.1.1 Etiologia.....	16
1.1.2 Patogenia.....	19
1.1.3 Diagnóstico.....	21
1.1.4 Controle	23
1.1.5 Resistência antimicrobiana.....	24
1.1.6 Alternativa de controle.....	26
1.2..UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS EM MEDICINA VETERINÁRIA.....	28
1.3. CAESALPINIA FERREA.....	30
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 Geral.....	32
2.1.2 Específicos.....	32
3. REFERÊNCIAS.....	33
2 CAPÍTULO 4 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ALCOOLICO DO FRUTO DA <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart. FRENTE A BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA.....	41
4.1 RESUMO.....	41
4.2 INTRODUÇÃO.....	42
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.3.1 Material botânico.....	43
4.3.2 Obtenção de extratos.....	43
4.3.2.1 Obtenção da solução aquosa líquida e liofilizada do resíduo etanólico fracionada com clorofórmio.....	44
4.3.2.2 Obtenção da solução aquosa do resíduo etanólico liofilizada.....	44
4.3.3 Material microbiológico.....	45
4.3.4 Desenho experimental.....	46
4.3.5 Atividade antimicrobiana	46
4.3.6 Análise dos resultados.....	47
2.4 RESULTADOS.....	48
2.5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	55
2.6 REFERENCIAS.....	58
ANEXOS.....	64
ANEXO 01 - E-MAIL RESPOSTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA ORIUNDA DESTA DISSERTAÇÃO.....	64

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 MASTITE BOVINA

O principal problema que atinge a produção de leite, mundialmente, é a ocorrência acentuada de inflamação da glândula mamária ou mastite. Essa enfermidade representa um grande desafio para a exploração da bovinocultura leiteira, mesmo com várias pesquisas direcionadas para o controle dessa patologia (ALMEIDA et al., 1999).

A redução da capacidade produtora dos rebanhos infectados e as modificações do leite mamático diminuem o rendimento industrial para a fabricação de derivados acarretando grandes prejuízos econômicos que giram em torno de 10 a 15% da produção em um país de alta prevalência da enfermidade como o Brasil (NADER FILHO et al., 2007; FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). Além dessas perdas de produção, a mastite gera prejuízos para a atividade com depreciação da qualidade nutritiva do leite, custo do tratamento, custo de atendimento veterinário e laboratorial e perdas no potencial genético (FILIPPSEN et al., 1999).

1.1.1 Etiologia

A mastite surge em decorrência da contaminação por microorganismo como bactérias patogênicas, fungos e algas, como também por vírus ou por traumas provocados por agentes físicos, químicos, mecânicos, térmicos ou por alterações metabólicas (HOLANDA JÚNIOR et al., 2005). Essas causas são oriundas de um manejo não apropriado, inadequação de ordenhadeiras, falta de higiene de instalações e do ordenhador, alimentação, clima, quantidade de leite produzida por animal, entre outros, que influenciam na prevalência da enfermidade (FERREIRA et al., 2007). Teixeira et al. (2008) confirmam que os problemas que afetam diretamente os úberes das vacas estão na maioria das vezes ligados com uma boa ou insuficiente prática de higiene dos animais e instalações; uma boa ou inadequada prática

de ordenha; ao pouco tempo direcionado para avaliação do estado da glândula mamária e com um bom ou mau programa de tratamento e prevenção de mastites levando em consideração o período seco dos animais.

A mastite pode ser classificada como clínica quando há apresentação de sinais de inflamação na glândula mamária como edema, elevação da temperatura, endurecimento, dor, além de grumos, pus ou qualquer alteração evidente do leite ou subclínica onde não se evidencia sinais macroscópicos de modificações do leite, mas apresentando alterações na composição do mesmo, muito embora, não sejam visíveis os sinais de inflamação no úbere (RIBEIRO et al., 2003). A forma subclínica é a mais prevalente com cerca de 70% das perdas, as quais provocam uma queda na produção de leite em aproximadamente 45% (MÜLLER, 2002) e constitui uma fonte de infecção, persistindo a enfermidade no rebanho (REYES et. al., 2005).

De acordo com Prestes et al. (2002) os microorganismos envolvidos no desencadeamento da enfermidade podem ser divididos em dois agrupamentos, de acordo com sua origem: os patógenos contagiosos, presente no corpo do animal com ou sem mastite e os ambientais, presentes no ar, água, cama e fezes. Os microorganismos contagiosos se propagam através de procedimentos de ordenha e de contaminação da maquinaria e das mãos dos ordenhadores. A maioria desses microorganismos incita infecções novas nos primeiros dois meses de lactação, sendo capazes de gerar uma mastite subclínica. Já os microorganismos ambientais acarretam uma mastite clínica, a qual pode ser aguda ou crônica. Esses microorganismos devem estar presentes no ambiente e depois ter a chance de invadir a glândula mamária e superar os mecanismos de defesa normais para estabelecer o processo infeccioso (REBHUN, 2000).

Além dessas formas de propagação podem existir outras, pois Morais et al. (2004) estudaram a relação entre a presença da mosca *Stomoxys calcitrans* (mosca dos estábulos) e surtos de mastites em rebanhos leiteiros, uma vez que esse inseto possui hábito hematófago interrompido destacando – se como veiculador de protozoários, helmintos, riquetsias, bactérias, fungos e vírus. Dessa forma, os autores não descartaram a possibilidade da propagação de bactérias envolvidas em casos de mastite por essa mosca. Nesse trabalho foram identificadas as espécies de patógenos no leite de 188 vacas positivas para o *Califórnia Mastitis Test* (CMT) e comparadas com as espécies isoladas das moscas. Verificou-se coincidência entre isolados de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* a partir de amostras

de leite e mosca coletadas de uma mesma propriedade e foram identificadas *Staphylococcus* spp *coagulase* (+), *Bacillus* spp, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterobacter agglomerans* e *Shigella* spp tanto em amostras de leite como em amostras de moscas das propriedades avaliadas.

Os patógenos contagiosos de maior importância são os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e uma série de patógenos menores envolvidos em infecções menos severas; já os patógenos ambientais mais envolvidos nos processos de inflamação da glândula mamária são *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Streptococcus uberis*, *Enterobacter* sp, além de patógenos que aproveitam de momentos de comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro e invadem a glândula mamária como *Pseudomonas* sp, *Prototheca* sp e *Nocardia* sp, etc (PRESTES et al., 2002).

Vários trabalhos são desenvolvidos para avaliar prevalência, etiologias e diversas práticas de controle e prevenção da mastite no Brasil e no mundo. Na maioria desses trabalhos são identificados patógenos envolvidos nos processos inflamatórios em estudo.

Nunes et al. (2007) visando avaliar o perfil de sensibilidade de 234 isolados de mastites subclínicas (CMT⁺⁺⁺), oriundos de 12 propriedades comerciais leiteiras do Ribatejo-Oeste em Portugal entre 2000 e 2003 obtiveram microorganismos de natureza contagiosa (35 *Staphylococcus aureus*, 61 *Streptococcus agalactiae*, 9 *Streptococcus dysgalactiae*) e ambiental (68 *Staphylococcus coagulase*-negativos, 51 *Streptococcus* spp. e 10 bacilos gram negativos).

Almeida et al. (1999) trabalhando um tratamento homeopático coletaram amostras de leite oriundas de 20 quartos mamários positivos para mastite subclínica e encontraram uma frequência de microorganismos de 40% para *Staphylococcus aureus*, 30% para *Streptococcus* sp., 15% de *Bacillus* sp, 10% de *Escherichia coli* e 5% de *Cândida* sp. Nesse trabalho os estafilococos aparecem em maior frequência como os causadores da doença.

Watts et al. (1995) encontraram resultados semelhantes quando isolaram 1494 microorganismos de vacas leiteiras nos períodos pré e pós – parto, dos quais 135 eram *Staphylococcus aureus*, 1222 *Staphylococcus* sp, 42 *Streptococcus* sp, 15 *Enterococcus* sp, 60 espécies entéricas e 20 miscelâneas de organismos.

Entretanto, Tenhagen et al. (2006) trabalharam 9.910 amostras de leite de 2.529 vacas, atestando 2.614 positivas para patógenos de mastite. Nesse estudo realizado na Alemanha, encontraram *Corynebacterium bovis* (34.5%), estafilococos *coagulase* negativo (27.6%),

Staphylococcus aureus (21.8%), *Streptococcus uberis* (3.74%), *Streptococcus* spp (2.99%), *Streptococcus agalactiae* (2.6%), *Streptococcus dysgalactiae* (1.9%), coliformes (1.1%), *Enterococcus faecalis* (0.9%), *Enterococcus faecium* (0.7%) e outros (0.2%).

Semelhantemente, Filippesen et al. (1999) procederam exame microbiológico de 1319 quartos mamários para identificação dos agentes etiológicos nos casos de mastites clínicas e subclínicas de 20 propriedades leiteiras na região norte do Paraná buscando evidenciar a prevalência da *Prototheca zopfii* e encontrou a seguinte frequência de agentes microbianos: *Corynebacterium bovis* (33,03%), *Staphylococcus coagulase* negativo (31,97%) e *Staphylococcus aureus* (25%), seguidos do *Streptococcus uberis* (3,48%), *Actinomyces pyogenes* (3,03%), *Streptococcus dysgalactiae* (1,52%), *Streptococcus agalactiae* (0,61%), *Streptococcus bovis* (0,61%), *Prototheca zopfii* (0,45%) e *Pseudomonas* sp (0,3%).

Percebe-se nesses dois últimos trabalhos, diferentemente dos anteriores, que os estafilococos dividem a maior prevalência com o *Corynebacterium bovis*.

Nesse sentido, Reyes et al. (2005) afirmam que os microorganismos que causam a mastite variam amplamente entre países, regiões, propriedades e às vezes dentro de uma mesma propriedade. Além disso, relatam que a mastite pode ser influenciada pela ordenha e pelas condições em que a esta é praticada, sendo, portanto, necessário conhecer a realidade dessa doença nas diversas regiões e propriedades leiteiras para se implantar programas de controle de acordo com os problemas específicos. Ribeiro et al. (2003) consideram a mastite como sendo de etiologia complexa e multivariada o que torna importante a identificação dos microorganismos que geram a infecção no monitoramento dos tratamentos clínicos e na prevenção, porém relatam que o exame bacteriológico é caro e demorado para uma tomada de ação quando se trata de rebanho com grande número de animais.

1.1.2 Patogenia

A patogenia da mastite é complexa e pode ser dividida em três fases – invasão, infecção e inflamação (BLOOD; RADOSTITS, 1991). A dificuldade inicial de um patógeno para acessar o úbere é composta pela barreira formada pelo esfíncter muscular do teto e pelo tampão de queratina formado pelo epitélio queratinizado (CARNEIRO et al., 2009), o qual

associado a ácidos graxos esterificados e não-esterificados (mirístico, palmitoléico e linoléico) funcionam como agentes bacteriostáticos (SALMAN et al., 2009).

Segundo Blood e Radostits (1991) na invasão os microorganismos passam do exterior da teta para o leite no interior do canal da teta, e nesse momento, segundo Viguiet et al. (2009) descrevem que os patógenos necessitam escapar dos mecanismo de defesa humoral e celular do úbere para iniciarem a multiplicação.

Após a invasão passam a agir os fatores solúveis e as células da imunidade inata. Quanto aos diferentes fatores solúveis que possuem ação antimicrobiana, destacam-se três grupos funcionais: a) fatores que lisam a membrana celular microbiana (ex. complemento), b) peptídeos que ligam elementos essenciais, como ferro (ex. lactoferrina), c) enzimas hidrolíticas que visam estruturas bacterianas (ex. lisozima) (CARNEIRO et al., 2009). Nesses termos, pode haver a instalação da população bacteriana no canal da teta e desse ponto acontecer à extensão para o interior da glândula mamária levando ao processo infeccioso dependendo da susceptibilidade do animal (BLOOD; RADOSTITS, 1991).

As defesas celulares inatas da glândula mamária são compostas pelos neutrófilos, pelos macrófagos, pelas células epiteliais e pelas células *natural killer* (NK). Essas células são chamadas de células somáticas do leite, e a oscilação da sua quantificação no leite denota o grau de infecção na glândula mamária (CARNEIRO et al., 2009).

Em casos de infecção intramamária, a presença de bactéria ou produtos bacterianos (toxinas lipopolissacarídicas, etc.) estimula a formação de mediadores inflamatórios endógenos (complemento, vários lipopolissacarídeos, leucotrienos, interleucinas 1, 2, 6 e 8 e fator de necrose tumoral alfa), os quais recrutam os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) do sangue por diapedese (GRUET et al., 2001). A presença de PMNs funcionais é crucial para a proteção do hospedeiro contra os patógenos bacterianos e considerados a segunda linha de defesa da glândula mamária. Geralmente, PMNs no leite tem baixa atividade de enzimas proteolíticas quando comparado aos PMNs no sangue periférico, indicando que liberam proteases durante a migração para a glândula mamária (ZHAO; LACASSE, 2008).

PMNs agem por fagocitose e destroem o patógeno invasor via sistemas oxigênio-dependente e oxigênio-independente. Eles contêm grânulos intracelulares que estocam peptídeos bactericidas, proteínas, enzimas (como mieloperoxidase) e proteases (como elastase, catepsina G, catepsina B e catepsina D). A liberação de agentes oxidantes e proteases destroem o patógeno e algumas células epiteliais, resultando em diminuição na

produção de leite e liberação de enzimas, como a N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAGase) e lactato desidrogenase (LDH). Após cumprirem sua função os PMNs morrem pelo processo de apoptose, sendo subseqüentemente, os restos celulares fagocitados pelos macrófagos (VIGUIER et al., 2009).

1.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da mastite é procedido com a inspeção e a palpação da glândula mamária junto ao exame do leite, no qual se avaliam principalmente suas características macroscópicas pelo teste de Tamis ou prova do caneco de fundo escuro, sua celularidade indireta pelo *Califórnia Mastitis Test* (CMT), celularidade direta através da Contagem de Células Somáticas (CCS) e seu perfil microbiológico (ALMEIDA, 2004).

No exame do úbere, a inspeção deve atentar para o tamanho, a localização e o formato, seus quartos isolados e as tetas, por todos os ângulos de visão. Já na palpação devem ser levados em conta o canal, a cisterna e a parede da teta, além da cisterna do úbere e o tecido glandular de cada quarto. Para se palpar a teta usam-se as extremidades dos dedos, enquanto se palpa os quartos com a palma da mão. O exame deve ser procedido de baixo (bico da teta) para cima e do toque superficial para o mais profundo. Esse exame identificará possível aumento de temperatura superficial, sensibilidade, espessamento, endurecimento e elasticidade. Além disso, pode revelar: grânulos, nódulos, edema difuso, lesões e fístulas (DIRKSEN et al., 1993).

Técnicas de exame que permitem visualização de partes internas da teta são preferíveis às técnicas como palpação da teta ou exame da teta com uma sonda. Nos anos 70 e 80, a radiografia da teta era uma ferramenta diagnóstica em pacientes com desordens de fluxo de leite. Nos últimos anos, a radiografia foi totalmente substituída por ultrassonografia e endoscopia. A vantagem da ultrassonografia é não ser invasiva e permitir uma possível visualização de todas as estruturas do úbere bovino (teta e parênquima glandular) sem o uso de radiação. A vantagem do exame endoscópico da teta é averiguar em tempo real uma possível patologia. Porém, a técnica endoscópica alcança a cisterna e o canal da teta. As

estruturas anatômicas localizadas mais proximalmente não podem ser visualizados (FRANZ, et al., 2009).

As células somáticas são, geralmente, células da linha de defesa do organismo que migram para o interior da glândula mamária com o intuito de combater agentes agressores, porém podem também ser células secretoras descamadas. É a liberação de substâncias pelos próprios microorganismos que estimulam a migração de leucócitos para combatê-los, aumentando assim, a contagem de células somáticas (CCS) (COLDEBELLA, 2003).

Segundo Barbosa et al. (2002) a CCS tem como objetivo fazer uma avaliação indireta da sanidade da glândula mamária, de fêmeas em lactação, usando-se como referência, o aumento na concentração de células de defesa no leite, servindo como uma estimativa eficaz do nível de infecção, a qual está atacando o úbere. Esses autores discorrem sobre o uso em conjunto do CMT e a CCS, pois apesar do CMT ser um excelente teste de diagnóstico de mastite subclínica, tem caráter subjetivo e dependendo da interpretação dos resultados pode produzir falso-positivo ou falso-negativo, sendo, portanto importante, o uso da CCS para um diagnóstico mais preciso do rebanho.

A análise microbiológica é o melhor método de avaliação da saúde da glândula mamária, desde que, sejam coletadas amostras assépticas, direcionando as melhores alternativas de controle e prevenção. É importante, especialmente quando os resultados do CMT têm escore negativo e em contrapartida ocorre o isolamento de agentes bacterianos, fazendo desses animais ótimas fontes de infecção no rebanho (ALMEIDA, 2004).

Métodos diagnósticos têm sido desenvolvidos para checar a qualidade do leite para detecção da inflamação da glândula mamária e diagnóstico da infecção e os agentes patogênicos causadores. Dentre esses métodos, os ensaios colorimétricos e fluorométricos têm sido desenvolvidos para aferir as concentrações elevadas de enzimas durante a mastite como a NAGase ou LDH. Além desses, podem ser realizados testes de condutividade elétrica e teste de PH (VIGUIER et al., 2009). Cademartori (2001) realizou experimento para avaliar o uso da contagem eletrônica de células somáticas como método auxiliar no controle de mastite bovina. Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que a CCS contribui sobremaneira para o diagnóstico de mastite bovina quando aliado aos outros testes indicadores, como por exemplo, o CMT e as lactoculturas. Ficou evidenciada a influência na contagem de células somáticas dos fatores data de coleta, grau de reação no CMT e número de lactações. Evidenciou-se também que CCS de amostra de leite de teto de vaca serve como

indicador da presença de mastite subclínica, no entanto não deve ser utilizado como indicador de patógeno. A CCS de amostra de leite do tanque resfriador reflete a qualidade do leite servindo como indicador de mastite no rebanho.

Ademais, o desenvolvimento de modelos modernos incorporando ensaios enzimáticos, imunoenaios, biosensores e testes de ácido nucléicos estão, progressivamente, substituindo os métodos mais convencionais. Também, com os avanços em proteomas e genomas, novos biomarcadores são descobertos, permitindo o diagnóstico prematuro da mastite (VIGUIER et al., 2009).

1.1.4 Controle

Devido à diversidade de agentes etiológicos de mastite, estratégias de controle foram desenvolvidas baseadas na minimização da exposição da glândula mamária a patógenos, dos quais se salienta o plano de controle com os seguintes pontos: utilização e manutenção adequadas das salas de ordenha, a desinfecção dos tetos após a ordenha (pós-dipping), o tratamento das mastites clínicas durante a lactação, o descarte de animais afetados por mastites crônicas e a antibioticoterapia de secagem. Entretanto, mesmo com todas as indicações seguidas, novos casos de mastite surgem e o uso de antimicrobianos assume um papel importante no seu controle (NUNES et al., 2007).

Pereira et al. (2003) relatam que a maior parte dos casos de mastite são tratados com antibióticos parenterais ou intramamários, porém na maioria das vezes, sem uma avaliação da sensibilidade das bactérias para determinar o agente antimicrobiano correto, contribuindo assim para a seleção de agentes patogênicos resistentes dentro de um rebanho. Assim, para Luthje; Schwarz (2006), os resultados de testes de susceptibilidade *in vitro* são um importante guia de seleção do agente antimicrobiano eficiente para intervenções terapêuticas e profiláticas. Gentilini et al. (2000) abordam que as drogas comumente utilizadas são beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos e lincosamidas.

Apesar do considerável uso, e alguns abusos, muitos antimicrobianos continuam permanecendo efetivos nos dias atuais. Entretanto, a perda de eficácia pela emergência e

transferência de bactérias resistente a antibióticos é uma realidade crescente (WHITE; McDERMOTT, 2001).

1.1.5 Resistência antimicrobiana

O termo resistente se refere a aqueles microrganismos que não são inibidos pelas concentrações habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano, ou aqueles que apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente avaliado ao qual não havia uma adequada resposta clínica quando utilizado como tratamento (MOTA et al, 2005). De acordo com White; McDermontt (2001) a resistência bacteriana a antimicrobianos geralmente se desenvolvem através de um ou mais dos cinco mecanismos a seguir:

- 1) Modificação da permeabilidade da membrana celular, a qual limita a entrada de antimicrobiano no interior da bactéria,
- 2) Efluxo ativo de antimicrobiano para fora da célula bacteriana,
- 3) Alteração dos sítios de ação antimicrobiana,
- 4) Inativação enzimática ou destruição do antimicrobiano e,
- 5) Criação rotas enzimáticas alteradas.

Machado et al. (2008) avaliaram um total de 109 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica, em 35 fazendas, situadas em nove estados brasileiros, quanto à susceptibilidade *in vitro* a diversos agentes antimicrobianos (Amoxilina/clavulanato, ampicilina, penicilina, oxacilina, bacitracina, cefotaxima, cefalexina, eritromicina, estreptomicina, canamicina, gentamicina, neomicina, lincomicina, nitrofurantoína, tetraciclina, novobiocina e sulfas). Esses autores observaram resistência à penicilina (93,5%), sulfas (88,6%) e ampicilina (85,3%) e mostraram que todas as cepas examinadas foram resistentes a pelo menos uma das drogas testadas.

Malinowski et al. (2002) isolaram 517 cepas de *Staphylococcus aureus* e 514 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa de casos clínico e subclínico de mastite na Polônia e verificaram a sensibilidade *in vitro* a diversos antibióticos. Para todas as cepas

Staphylococcus aureus houve sensibilidade acentuada à bacitracina (92,9%) e neomicina (90,2%), enquanto a maior resistência foi verificada para a penicilina, ampicilina, amoxicilina, lincomicina e estreptomicina. Já as cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa apresentaram maior sensibilidade para neomicina (96,5%), bacitracina (94,8%), cefaperazone (86,5%), cloxacilina (84,2%), tetraciclina (83,9%), tilosina (81,3%) e amoxicilina (74,8%), e expressaram maior resistência a penicilina, ampicilina e lincomicina.

Na Turquia foi desenvolvido estudo semelhante com 300 amostras de leite bovino de vacas com mastites. Todas as cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas foram sensíveis a ciprofloxacino, neomicina associada à bacitracina e tetraciclina, e ainda foi sensível a canamicina (85,0%), cefquinome (85,0%), e amoxicilina/ácido clavulânico (84,0%), enquanto foi resistente a penicilina (95,0%) e oxacilina (60,0%). Concomitantemente, todas as cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa isoladas foram susceptíveis a cefquinome e neomicina associada à bacitracina e tetraciclina, mas resistentes para penicilina (90,0%) e oxacilina (73,0%) (KIRKAN et al., 2005).

Pesquisas realizadas em várias regiões do mundo trazem resultados semelhantes, com ênfase para o grande índice de resistência às penicilinas e cefalosporinas de primeira geração (NADER FILHO et al., 2007; GUÉRIN-FAUBLÉE et al. 2003; CALVINHO et al., 2002; GENTILINI et al., 2002; YOSHIMURA et al., 2002; COSTA et al., 2000; GENTILINI et al., 2000; ARAÚJO, 1998; MYLLYS et al., 1998).

De acordo com Silveira et al. (2006), o fenômeno da resistência bacteriana a diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública. Nesse contexto, Rapini et al. (2004) discorrem sobre a preocupação com a transmissão de bactérias resistentes ao homem pela ingestão de alimentos contaminados. Continuam afirmando que no trato gastrointestinal há possibilidade de transferência de genes que conferem a resistência antimicrobiana a outras bactérias da própria espécie ou de espécies não relacionadas, patogênicas ou não.

Considerando a importância em saúde pública e para a indústria que os resíduos de antibióticos em leite podem representar, Nero et al. (2007) avaliaram, quanto a presença de resíduos dessas substâncias, 210 amostras de leite produzido em quatro estados brasileiros e verificaram que as mesmas foram detectadas em 24 amostras (11,4%), sendo as mais frequentes nas amostras da região de Londrina-PR, com 13 amostras (20,6%) contaminadas.

Nas demais regiões, detectaram resíduos de antibióticos em quatro amostras (8,0%) da região de Botucatu-SP, quatro (8,5%) da região de Viçosa-MG e três (6,0%) da região de Pelotas-RS.

Nero et al. (2007) sugerem problemas em relação à utilização de antibióticos em animais em lactação, indicando não obediência ao período de carência dos medicamentos, e concluíram, que a presença resíduos de antibióticos em leite produzido no Brasil pode ser considerada preocupante. Baseados nessa problemática, Pinto et al. (2001) afirmam que o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes têm estimulado a busca por meios alternativos que reduzam ou eliminem tais problemas.

1.1.6 Alternativas de controle

Clemente et al. (2006) trabalhando com homeopatia, avaliaram o efeito da suplementação com uma molécula biológica na prevenção da mastite, bem como no aumento da produção do leite em vacas mestiças Holandês x Zebu. Os autores constataram que os resultados deste experimento, nas condições em que foi realizado, não evidenciaram vantagens de se utilizar uma terapia alternativa como a molécula orgânica no controle da mastite.

Almeida (2004), da semelhante forma, avaliou o tratamento homeopático comparado-o com o tratamento alopático em casos de mastite infecciosa aguda por *Staphylococcus aureus* através de infecção experimental. Através da utilização dos seguintes parâmetros: sinais clínicos, CMT, as contagens de células somáticas eletrônicas e ópticas, a autora conclui que não se evidenciou diferença estatística significativa entre os tratamentos com antibiótico e medicamentos homeopáticos para mastite clínica causada por *Staphylococcus aureus*.

Almeida et al. (1999) encontraram resultados animadores, pois avaliaram a eficiência da bioterapia para o controle de mastite subclínica em bovino, e nas condições de realização do trabalho o tratamento se mostrou eficiente na cura dos quartos mamários em estudo.

Uma alternativa para o controle da mastite é o Ozônio. O gás apresenta ação fungicida, viricida e bactericida e os efeitos contra os microorganismos da mastite são satisfatórios, quando o ozônio é insuflado diretamente nos ductos galactóforos. A ação é mais

intensa e rápida e em muitos casos o úbere inflamado é curado apenas com uma aplicação (PEREIRA et al., 2003).

Silva et al. (2008b) enfocam a possibilidade do uso do extrato de própolis e geopropolis para o controle de mastite e para avaliar a eficiência dessas substâncias, avaliou a sensibilidade *in vitro* de bactérias oriundas do leite de vacas com mastite subclínica. Os autores constataram que a própolis inibiu o crescimento da *Pasteurella* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva, enquanto o geopropolis inibiu o crescimento de *Bacillus* sp., *Pasteurella* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa.

Semelhantemente, foi desenvolvido um estudo com o objetivo de avaliar a sensibilidade *in vitro* de amostras de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp coagulase negativos, *Streptococcus agalactiae* e bactérias do grupo dos coliformes, isoladas do leite de vacas com mastite, a diferentes extratos de própolis. Os resultados mostraram que o extrato etanólico de própolis comercial, os extratos etanólico e, em menor proporção, o metanólico inibiram o crescimento das amostras de bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp coagulase negativos e *Streptococcus agalactiae*. Os extratos obtidos através da água, do acetato de etila e do clorofórmio não inibiram nenhuma amostra bacteriana, assim como os veículos etanol e metanol puros utilizados como controle. A bactéria Gram-negativa testada, do tipo coliforme, não apresentou sensibilidade a nenhum dos extratos. Todos estes resultados estimulam o prosseguimento de novas pesquisas sobre a utilização de extratos de própolis, em veículos adequados, com vistas ao tratamento da mastite bovina (PINTO et al, 2001).

Tratamento de mastite com citocinas, lipossomas, micropartículas, nanopartículas e proteína mucolítica recombinante estão sendo estudadas. As citocinas atuam promovendo quimiotaxia recrutando e ativando leucócitos e podem, além disso, melhoraram a capacidade da atividade bactericida dos fagócitos. Os lipossomas, micropartículas e nanopartículas melhoram o acesso intracelular de antibióticos (GRUET et al., 2001).

A fitoterapia é alternativa de tratamento para a mastite. Schuch et al. (2008) discorrem que produtores rurais e médicos veterinários ainda utilizam produtos oriundos de plantas, tanto para a prevenção quanto para tratamento. As práticas de tratamento predominam, com o uso de soluções ou pomadas medicinais à base de ervas para utilização local ou a administração de plantas verdes ou secas via oral.

1.2 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS EM MEDICINA VETERINÁRIA

O uso de plantas medicinais na medicina veterinária é milenar. O desenvolvimento desse conhecimento acompanhou a aprendizagem do homem nos cuidados da sua própria saúde (SCHUCH et al., 2008), sendo uma fonte de terapia alternativa explorada a séculos por várias comunidades (MUKHERJEE et al., 2005). As plantas medicinais estão dentre os produtos naturais, os quais têm considerável interesse científico devido à possibilidade de empregá-las na fitoterapia, por proporcionarem chances de obterem-se moléculas protótipos devido à diversidade de seus constituintes (SILVA et al., 2007).

A biodiversidade brasileira é rica, com milhares de exemplares em sua flora, estando o Brasil entre os setes países considerados “megadiversidades” com 50% dos vegetais do mundo, pois os cinco principais biomas estão presentes – floresta amazônica; cerrado; mata atlântica; pantanal e caatinga. Nesse contexto, o Brasil deveria ser o foco de investigações farmacológicas de novas drogas. Contudo a velocidade da extinção de espécies vegetais evidencia a necessidade de investimentos nessa área (REIS, 2006).

As propriedades curativas dos princípios e medicamentos fitoterápicos na medicina veterinária são cada vez mais estudadas, profissionais adeptos da fitoterapia externam alta frequência de bons resultados em tratamento de parasitoses e doenças infecciosas, incluindo em tratamentos de mastites (PEREIRA et al., 2009).

Silva (2008a) aborda que a utilização de plantas medicinais, de forma combinada ou isolada, como medicamentos antiinflamatórios ou analgésicos na medicina popular é uma prática corrente, proporcionando alívio de sintomas semelhantes àquele obtido com drogas alopáticas, mesmo que na maioria das vezes os princípios ativos das plantas sejam desconhecidos.

A Organização Mundial de Saúde (OMS), no começo da década de 1990, divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como único acesso aos cuidados básicos da saúde (JÚNIOR, 2005). Já aproximadamente 35% dos fármacos empregados atualmente nos países industrializados advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas superiores (YUNES; CALIXTO, 2001).

Dessa forma, tem aumentado a pesquisa, com maior número de publicações nessa área nos últimos 8-10 anos (ROCHFORD et al., 2008), posto que, em várias situações, as prováveis propriedades terapêuticas dessas plantas não passaram pelo crivo científico, por não terem sido investigadas ou por não terem tido comprovação farmacológica em testes clínicos e pré-clínicos. Nesse contexto, cresceu a busca de provas científicas sobre a segurança e eficácia terapêutica dessas plantas medicinais, e como resultado disso muitos fármacos da medicina do ocidente são baseados em compostos de origem natural em plantas da medicina popular (LUNA, 2006).

Silva (2008c) alerta que o uso pouco cuidadoso de plantas medicinais, fora de seu contexto original e sem respaldo acadêmico, tem dado origem a intoxicações, atribuíveis aos efeitos já conhecidos da planta ou ainda ao uso de planta errada, por confusão na identificação das espécies.

A planta produz os metabólitos primários para a manutenção das funções básicas dos seus órgãos (raiz, caule, galhos, folhas, flores e frutos). Os metabólitos secundários são produzidos por uma reação da planta, a partir de estímulos ambientais. Então, outro aspecto importante é desvendar sua composição química e os metabólitos secundários responsáveis pelas modificações biológicas (MITIDIERO, 2002).

O uso de plantas medicinais na saúde animal também direciona estudos. Várias pesquisas com ruminantes enfocam classes específicas de compostos bioativos como os taninos e saponinas. Há vários estudos que investigam o uso de plantas como nematocida e antimicrobiana, sendo assim uma área promissora para pesquisas (ROCHFORD et al., 2008).

Silva et al. (2008a) objetivaram determinar a atividade antibiótica do extrato do pericarpo do fruto da *Punica granatum* frente a *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes a penicilina, e atestaram a possibilidade do uso terapêutico dessa planta na medicina veterinária.

Pereira et al. (2009) trabalharam com a jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) e neem (*Azadiracta indica*) frente a *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de casos de mastite subclínica de búfalas e constataram atividade antibiótica dos extratos dessas espécies em diversas diluições.

Outra possibilidade de uso de plantas medicinais na veterinária é a imunoterapia. Mukherjee et al. (2005) desenvolveram estudo para avaliar o potencial da imunoterapia com extrato aquoso de *Ocimum sanctum*, sendo investigada a eficácia antibiótica, bem como

imunomodulatória, em casos de mastite subclínica bovina. Foi demonstrado que a infusão de extrato de folhas dessa espécie tem atividade antimicrobiana e imunomodulatória. Ambos os efeitos estão relacionados, segundo os autores, com a otimização da atividade dos neutrófilos polimorfonucleares na glândula mamária.

Nessa mesma linha foram desenvolvidas inúmeras pesquisas com diversas espécies, tendo plantas como a copaíba (*Copaifera* spp.), aroeira (*Schinus terebinthifolius*), dedaleiro (*Lafoensia pacari*), Cajueiro (*Anacardium occidentale*), Romã (*Punica granatum*), Jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), Neem (*Azadiracta indica*), Alho (*Allium sativa*), Goiaba (*Psidium guajava*), entre outras, testadas para atividade antimicrobiana apresentando bons resultados (PEREIRA et al., 2009; SILVA et al., 2008a; SILVA et al., 2007; LIMA et al., 2006; GNAN; DEMELLO, 1999).

1.3 *Caesalpinia ferrea*

Caesalpinia ferrea Mart. é uma árvore que pertence à família Leguminosae-Caesalpinioideae (Caesalpinaceae) e que cresce em todo Brasil, sendo largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste, conhecida vulgarmente como pau-ferro ou jucá (PETERS et al., 2008).

Possui flores amarelas pequenas e em cachos; frutos de cor marrom escura, do tipo legume, com sementes escuras; folhas compostas; altura de 10 – 15 m, com tronco curto de 40 – 60 cm de diâmetro, que fornece madeira para construção civil e lenha (LORENZI, 2002).

A *Caesalpinia ferrea* Mart. vêm sendo estudada para várias ações farmacológicas e pode ser uma possibilidade para uso como fitoterápico. Foram desenvolvidos diversos estudos que verificaram que esta planta possui compostos com ações farmacológicas, incluindo a analgésica, antiinflamatória, anticancerígena, antidiabética, antiulcerogênica, cicatrizante, entre outras atividades (BALBACH, 1972, BACCHI; SERTIE, 1994, BACCHI et al. 1995, CARVALHO et al. 1996, NAKAMURA et al. 2002a, NAKAMURA et al. 2002b, OLIVEIRA 2008). De acordo com González et al. (2004) essas propriedades

farmacológicas podem estar relacionadas à presença de flavanóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos.



Figura 1 – Fruto (A), Árvore (B), Flor (C) de *Caesalpinia ferrea*. Fonte: <http://www.arvores.brasil.nom.br/pferro1/index.htm>

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato alcoólico do fruto da *Caesalpinia ferrea* frente a bactérias causadoras de mastite bovina.

2.1.2 Específicos

Estudar a atividade antimicrobiana da solução aquosa do resíduo etanólico liofilizada e da solução aquosa do resíduo etanólico fracionada com clorofórmio líquida e liofilizada frente a bactérias causadoras de mastite bovina.

Analisar a atividade antimicrobiana após a liofilização como método de armazenamento do extrato de *Caesalpinia ferrea* sem perdas da atividade antimicrobiana.

Verificar a atividade antimicrobiana do extrato de *Caesalpinia ferrea* em diluições sequenciais (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64) frente a bactérias causadoras de mastite bovina.

3. 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 **R. Un. 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***. 2004. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ARAÚJO, W.P. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.** v. 35, n. 4, p. 161- 165, 1998.

BACCHI, E.M; SERTIE, J.A.A. Anti-ulcer action os *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta medica**. v. 60, 1994, p. 118 – 120.

BACCHI, E. M.; SERTIE, J.A.A.; VILLA, N.; KATZ, H. Anti-ulceration and toxicity *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta medica**. v. 61, 1995, p. 204 – 207.

BALBACH, A. **Plantas que curam**. São Paulo: Tres Press, 1972, p. 302 – 303.

BARBOSA, C. P.; BENEDETTI, E.; RIBEIRO, S.C.A.; GUIMARÃES, E.C. Relação entre contagem de células somáticas (CCS) e os resultados do "California Mastitis Test" (CMT), no diagnóstico da mastite bovina. **Biosci J.**, v. 18, n. 1 , p. 93 – 102, 2002.

BLOOD, D.C., RADOSTITS, O. M. **Clínica Veterinária**. 7 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991, 1293p.

CADEMARTORI, A.G. Contagem eletrônica de células somáticas no leite como método auxiliar no controle de mastite bovina em uma propriedade leiteira no rio grande do sul. **Arquivos da faculdade de veterinária**. v.29, n.1, p. 69 – 70, 2001.

CALVINHO, L. F.; TOSELLI, F.G.; WEIMANN, W.R.; CANAVESIO, V.R.; NEDER, V.E.; IGUZGUIZA, I.A. Antimicrobial sensitivity of coagulase-positive staphylococcal strains isolated from bovine mastitis in the central dairy catchment area of Argentina. **Rev Argent Microbiol**. v.34, n.3, p. 171 – 175, 2002.

CARNEIRO, D.M.V.F.; DOMINGUES, P.F.; VAZ, A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**. v.39, n.6, p. 60 – 70, 2009.

CARVALHO, J.C.T.; TEIXEIRA, J.R.M.; SOUZA, P.J.C.; BASTOS, J.K.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S.J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethno-Pharmacology**. v.53, p.175-178, 1996.

CLEMENTE, M.A.; ELYAS, A.C.W.; PIRES, M.F.A.; AROEIRA, L.J.M. Avaliação da molécula orgânica na prevenção da mastite em vacas mestiças. In: XXIX Semana de Biologia e XII Mostra de Produção Científica – UFJF, Juiz de Fora, Resumos..., Juiz de Fora, p.127 – 129, 2006.

COLDEBELLA, A **Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas**. 2003, Tese (doutorado), ESALQ, Piracicaba, São Paulo, 2003.

COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; GUERRA, J.L.; MELVILLE, P.A. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus* spp. isolated from Mammary Parenchymas of Slaughtered Dairy Cows **Journal of Veterinary Medicine Series B**. v. 47, n. 2, p. 99 – 103, 2000.

DIRKSEN, G., GRÜNDER, H.D., STÖBER, M. **Exame clínico dos bovinos – Rosenberger**. 3ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1993, 419p.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *staphylococcus aureus* e suas implicações na saúde pública. **Ciência Rural**. v. 34, n. 4, p. 1315 – 1320, 2004.

FILIPPSEN, L.F.; MOREIRA, F.B., SAKASHITA, A.T.; BITTENCOURT, D.R. Prevalência da mastite bovina causada por *prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região norte do Paraná. **Ciência Rural**. v. 29, n.1, p. 87 – 89, 1999.

FERREIRA, J.L.; LINS, J.L.F.H.A.; CAVALCANT, T.V., MACEDO, N.A., BORJAS, A.R. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. **Ciência Animal Brasileira**. v. 8, n. 2, p. 261 – 266, 2007.

FRANZ, S.; FLOEK, M.; HOFMANN-PARISOT, M. Ultrasonography of the bovine udder and teat. **Vet Clin Food Anim**. v. 25, p. 669 – 685, 2009.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; LIORIENTE, P.; GODALY, S.; REBUELTO, M.; DeGREGORIO, O. Argentina Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated

from Bovine Mastitis in Argentina **Journal of Dairy Science**. v. 83, n. 6, p.1224 – 1227, 2000.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; BETANCOR, A.; REBUELTO, M.; FERMEPIN, M.R.; TORRES, R.A. Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Argentina **Journal of Dairy Science**. v. 85, n. 8, p. 1913 – 1917, 2002.

GNAN, S. O.; DEMELLO, M. T. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous Goiaba extracts. **Journal of Ethno-Pharmacology**. v. 68, p. 103 – 108, 1999.

GONZALEZ, F. G.; BARROS, S.B.M.; BACCHI, E.M. Atividade Antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. Anais IX Semana da Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 40, p. 79 – 79, 2004.

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

GUÉRIN-FAUBLÉE, V.; CARRET, G.; HOUFFSCHMITT, P. In vitro activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis **Veterinary Record**. v. 152, n. 15, p. 466 – 471, 2003.

HOLANDA JUNIOR, E. V.; MADALENA, F.E.; HOLANDA, E.D.; MIRANDA, W.M.; SOUZA, M.R. Impacto econômico da mastite em seis fazendas de Araxá – MG. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**. v.13, n. 2, p. 63 – 69, 2005.

JÚNIOR, V.F.V., PINTO, A.C., MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: Cura Segura?. **Química Nova**. v.28, p. 519 – 528, 2005.

KIRKAN, S.; GOKSOY, E. O.; KAYA, O. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative Staphylococci from bovine mastitis in the Aydin Region of Turkey. **Turk J Vet Anim Sci**. v. 29, p. 791 – 796, 2005.

LIMA, M. R. F., LUNA, J.S., SANTOS, A.F., ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethno-pharmacology**. v. 105, p.137 – 147, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, p. 162.

LUNA, J. S. **Estudo de plantas bioativas**. 2006. 233 f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

LUTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide–lincosamide resistance phenotypes and genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.57, p. 966 – 969, 2006.

MACHADO, T. R. O.; CORREA, M. G.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.1, p.278-282, 2008.

MALINOWSKI, E.; KLOSSOWSKA, A.; KACZMAROWSKI, M.; LASSA, H.; KUZMA, K. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from affected with mastitis cows. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**. v.46, p. 289 – 294, 2002.

MITIDIERO, A.M.A. **Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira: avaliação dos aspectos sanitários e de produção**. 2006. 119f. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas) – Programa de Pós-Graduação em Agrossistemas do Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

MORAIS, A.P.R.; BADINI, P.V.; SOUZA, M.M.S.; BITTENCOURT, A.J. Avaliação da capacidade de *stomoxys calcitrans* (linnaeus, 1758) em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites de municípios do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.13, n. 4, p. 143 – 149, 2004.

MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana **Braz J vet Res anim Sci**, v. 42, n. 6, p. 465 – 470, 2005.

MUKHERJEE, R.; DASH, P.K.; RAM, G.C. Immunotherapeutic potencial of *Ocimum sanctum* (L) in bovine subclinical mastitis. **Research in Veterinary Science**. v.79, p. 37 – 43, 2005.

MULLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: **Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil**. 2002, Maringá, Anais... Maringá, PR, 2002, p. 212.

MYLLYS, V.; ASPLUND, K.; BROFELDT, E.; HIRVELA-KOSKI, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; JUNTILA, J.; KULKAS, L.; MYLLYKANGAS, O.; NISKANEN, M.; SALONIEMI, H.; SANDHOLM, M.; SARANPAA, T. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995--changes in prevalence and antimicrobial resistance. **Acta Vet Scand.** v. 39, n.1, p. 119-26, 1998.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite **Arq. Inst. Biol.**, v.74, n.1, p.1 – 4, 2007.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters*, v. 177, p.119 – 124, 2002a.

NAKAMURA, E.S., KUROSAKI, F., ARISAWA, M., MUKAINAKA, T., TAKAYASU, J., OKUDA, M., TOKUDA, H., NISHINO, H.; PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of Brazilian folk medicine, juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethno-Pharmacology**, v. 81, p.135 – 137, 2002b.

NERO, L. A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; FRANCO, B.D.G.M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, n. 2, p. 391 – 393, 2007.

NUNES, F. S.; CAVACO, L.M.; VILELA, C.L.; BEXIGA, R. Perfil de susceptibilidade a antibióticos de agentes etiológicos de mastite subclínica bovina em Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 102 (563-564), p. 275-280, 2007.

OLIVEIRA, A.F. **Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia ferrea* (tul.) Martius (Jucá) em lesões cutâneas de caprinos**. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós – Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró – RN, 2008.

PEREIRA, A.V.; LOBO, K.M.S.; BEZERRA, D.A.C.; RODRIGUES, O.G.; ATHAYDE, A.C.R.; MOTA, R.A.; LIMA, E.Q., MEDEIROS, E.S. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de jurema preta e neem sobre amostras de *Staphylococcus* sp isoladas de mastite em búfalas. **Arquivo do Instituto Biológico**. v.76, n.3, p.341 – 346, 2009.

PEREIRA, M. T. C.; RIBEIRO, S. C. A.; CARVALHO, S. F. M. Revisão sobre o uso do ozônio no tratamento da mastite bovina e melhoria da qualidade do leite. **Biosci. J.** v. 19, n. 2, p. 109 – 114, 2003.

PETERS, V.M.; SOUZA, S.O.; CARVALHO, J.C.T; BORGES, L.V.; GUERRA, M.O. Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats. **Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas.** v. 7, n. 5, p. 268 – 272, 2008.

PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da FZVA Uruguaiana**, v. 9, n. 1, p. 118 – 132, 2002.

PINTO, M. S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSO, M.M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**v. 38, n. 6, p. 278 – 283, 2001.

RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N.E.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 56, n.1, p.130 – 133, 2004.

REBHUN, W. C. **Doenças do gado leiteiro.** São Paulo: Roca, 2000, 642p.

REIS, M.O.R. **Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea gratissima* Gaertn – Abacateiro – (Lauraceae).** 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde , Universidade Franca, Franca, 2006.

REYES, J. F. F.; VALERO-LEAF, K.; D’POOF, G.; URDANETA, A.G.; CAGNASSO, M.A.; MORALES, D. Agentes bacterianos y contaje de células somáticas en leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual o mecánica en cuatro fincas lecheras del estado Zulia, Venezuela. **Revista Científica.** v. XV, n. 1, p. 64 – 71, 2005.

RIBEIRO, M. E. R.;PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JUNIOR, W.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul **R. Brasileira de Agrociência.** v. 9, n. 3, p. 287 – 290, 2003.

ROCHFORT, S.; PARKER, A. J.; DUNSHEA, F. R. Plant bioactives for ruminant health and productivity. **Phytochemistry.** v. 69, p. 299 – 322, 2008.

SALMAN, S.; KHOL-PARISINI, A.; SCHAFFT, H.; LAHRSSON-WIEDERHOLT, M.; HULAN, H.W.; DINSE, D.; ZENTEK, J. The role of dietary Selenium in bovine mammary gland health and immune function. **Animal Health Research Reviews**. v. 10, n. 1, p. 21 – 34, 2009.

SCHUCH, L.F.D.; WIEST, J.M.; COIMBRA, H.S.; PRESTES, L.S.; TONI, L.D.; LEMOS, J.S. Cinética da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos naturais frente a microorganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n.1, p.161 – 169, 2008.

SILVA, M.A.R.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, J.V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; PEREIRA, M.S.V. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. Over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.2, p.209 – 212, 2008a.

SILVA, R. B.; LIMA, P.M.; FERRAZ, R.E.O.; ALVES, N.D.; FEIJÓ, F.M.C. Efeito “ in vitro” de extrato alcoólico de própolis e geoprópolis sobre bactérias patogênicas isoladas de leite bovino mastítico. *Revista CFMV*. Brasília-DF, Ano XIV, n° 43, 2008b.

SILVA, A.C.C. **Avaliação das atividades citotóxica, antitumoral, antiinflamatória e analgésica do extrato bruto e de uma fração parcialmente purificada da vagem de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex. Tul. Var. *ferrea***. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia , Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008c.

SILVA, J. G. S.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n.4, p.572 – 577, 2007.

SILVEIRA, P. G.; NOME, F.; GESSER, J.C.; MANDOLES, M. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Quim. Nova**. v. 29, n. 4, p. 844 – 855, 2006.

TEIXEIRA, P.; RIBEIRO, C.; SIMÕES, J. **Prevenção de mamites em explorações de bovinos leiteiros – da teoria a prática. Ebook para veterinários, produtores e estudantes 2008** disponível em: www.veterinaria.com.pt, acesso em 15/01/2010.

TENHAGEN, B.A.; KOSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy Cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**. v. 89, n. 7, 2006.

VIGUIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N.; WELBECK, K.; O'KENNEDY, R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**. v.27, n.8, p. 486 – 493, 2009.

YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M.; KOJIMA, A. Minimum Inhibitory Concentrations of 20 Antimicrobial Agents against *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Intramammary Infections in Japan **Journal of Veterinary Medicine Series B** v. 49, n. 9, p. 457 – 460, 2002.

YUNES R. A.; CALIXTO J. B., **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Florianópolis – SC: Argus, p. 577, 2001.

WATTS, J.L.; SALMON, S.A.; YANCEY JUNIOR, R.J.; NICKERSON, S.C.; WEAVER, L.J.; HOLMBERG, G.; PANKEY, J.W.; FOX, L.K. Antimicrobial susceptibility from the mammary glands of microorganisms isolated dairy heifers. **J Dairy Sci**. v. 78, p. 1637 – 1648, 1995.

WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F. Emergence and Transfer of Antibacterial Resistance. **J. Dairy Sci**. v. 84, p. 151 – 155, 2001.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. **Journal of Animal Science**. v. 86, 57 – 65, 2008.

4. CAPÍTULO 2 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ALCOOLICO DO FRUTO DA *Caesalpinia ferrea* Mart. FRENTE A BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA

4.1 RESUMO

O tratamento usual da mastite bovina é realizado com administração de antimicrobianos, que muitas vezes, promovem a resistência bacteriana a esses compostos. Medicamentos fitoterápicos têm sido utilizados, porém nem todas essas opções apresentam comprovação científica acerca da eficácia de ação contra os agentes causadores da enfermidade. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato alcoólico do fruto da *Caesalpinia ferrea* Mart. frente a bactérias causadoras de mastite bovina. O estudo foi dividido em dois experimentos sequenciais. No experimento I, avaliou-se o potencial da atividade antimicrobiana da solução aquosa líquida (extrato 1) e liofilizada (extrato 2) do resíduo etanólico fracionado com clorofórmio e solução aquosa do resíduo etanólico liofilizado (extrato 3) frente às doze bactérias selecionadas (quatro cepas padrão e oito cepas de campo), como triagem para o experimento seguinte. No experimento II, utilizando a mesmas bactérias do experimento anterior, avaliou-se o potencial da atividade antimicrobiana do extrato que obteve melhor resultado no experimento I, em oito diluições. Esse estudo foi desenvolvido através da técnica do poço e em triplicatas. No experimento I, os resultados indicaram que 91,66% das bactérias analisadas não apresentaram diferença estatística para a atividade antimicrobiana entre os três extratos, constatando que o processo de liofilização não alterou o potencial da atividade antimicrobiana dos extratos 2 e 3. No experimento II foi utilizado o extrato 1 e os resultados indicaram que o halo de inibição antimicrobiana diminui com o aumento da diluição do extrato, e que as bactérias isoladas de vacas com mastite apresentaram uma resposta menor em relação as bactérias padrão. A *Caesalpinia ferrea* apresentou atividade antimicrobiana potencial que sugere novas avaliações experimentais a fim de avaliar a toxicidade, sendo uma possível opção terapêutica para ensaios biológicos *in vivo* no controle da mastite bovina.

Palavras chave: *Caesalpinia ferrea*, extrato, antimicrobiano, mastite bovina.

4.2 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a doença mais importante para a bovinocultura leiteira (MANGIÉRI JÚNIOR et al. 2007). Pelo menos 140 distintos microorganismos são capazes de promover infecções intramamárias (RIBEIRO et al. 2006), entretanto a maior parte são estafilococos, estreptococos e bactérias gram-negativas (TENHAGEN et al. 2006). Em função dessas infecções, os agentes antimicrobianos têm sido utilizados com frequência nas propriedades produtoras de leite (NASCIMENTO et al. 2001) visando o controle ou a prevenção de vacas lactantes ou secas (LUTHJE; SCHWARZ 2006). Contudo o uso sem critérios dessas drogas tem contribuído para o aumento progressivo da resistência bacteriana culminando em sérios problemas do ponto vista clínico devido às mesmas atuarem como agentes seletivos de microorganismo resistentes (MOTA et. al. 2005).

A resistência bacteriana tem se tornado um sério problema mundial, e os mecanismos de resistência têm sido identificados e descritos para todos os antimicrobianos atualmente utilizados na prática clínica na medicina veterinária (WHITE; MCDERMOTT 2001). Além disso, Rapini et. al. (2004) discorrem sobre a preocupação com a transmissão de cepas resistentes através dos alimentos para humanos, possibilitando a transferência de genes de resistência antimicrobiana a outras bactérias residentes do trato gastrointestinal.

Nesse contexto, os fitoterápicos são possibilidades de tratamento e prevenção da mastite bovina para serem utilizadas por agricultores e veterinários para diminuir os malefícios do uso indiscriminado de antimicrobianos (SCHUCH et al. 2008, ROCHFORT et al. 2008) tendo plantas como a copaíba (*Copaifera* spp.), aroeira (*Schinus terebinthifolius*), dedaleiro (*Lafoensia pacari*), cajueiro (*Anacardium occidentale*), romã (*Punica granatum*), jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), neem (*Azadiracta indica*), alho (*Allium sativa*), goiaba (*Psidium guajava*), entre outras, testadas para atividade antimicrobiana apresentando bons resultados (GNAN; DEMELLO 1999, LIMA et al. 2006, SILVA et al. 2007, SILVA et al. 2008, PEREIRA et al. 2009).

A *Caesalpinia ferrea* Mart., conhecida como jucá ou pau-ferro, também pode ser uma possibilidade para uso como fitoterápico. Foram desenvolvidos diversos estudos que verificaram que esta planta possui compostos com ações farmacológicas, incluindo a analgésica, antiinflamatória, anticancerígena, antidiabética, antiulcerogênica entre outras

atividades (BALBACH, 1972, BACCHI; SERTIE, 1994, BACCHI et al. 1995, CARVALHO et al. 1996, NAKAMURA et al. 2002a, NAKAMURA et al. 2002b).

A ação antimicrobiana da *Caesalpinia ferrea* foi avaliada mostrando resultados promissores com diversas finalidades (PEREIRA et al. 2006, CAMPOS et al. 2009). Por outro lado, utilização no controle da mastite bovina as pesquisas são escassas, mas Pereira et al. (2009b) revela o jucá como uma real possibilidade, sendo que, são necessários estudos adicionais nesse sentido.

Tendo em vista o exposto o presente trabalho objetiva investigar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos do fruto *Caesalpinia ferrea* frente a bactérias causadoras de mastites.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Material botânico

Os frutos da planta *Caesalpinia ferrea* Mart. (Fabaceae) foram coletados em setembro de 2009, no campus da UFERSA em Mossoró – RN e identificada pelo Prof. Odaci Fernandes de Oliveira , tendo uma exsicata depositada no herbário Dárdano de Andrade Lima sob o número 12282.

4.3.2 Obtenção de extratos

Após a coleta, os frutos foram secos em estufa de circulação de ar forçado Tecnal[®] (Tecnal Equipamentos para Laboratórios, Avenida Pasteur, n°544, Piracicaba, SP) durante 48 horas e triturados em multiprocessador. Posteriormente o material obtido foi peneirado em moinhos de facas tipo Willye[®] (DeLeo Equipamentos Laboratoriais, Av. Bento Gonçalves, n° 7150, Porto Alegre, RS) até uma granulometria de 20 mesh.

4.3.2.1 Obtenção da solução aquosa, fração líquida e liofilizada do resíduo etanólico fracionada com clorofórmio

Para a preparação das frações líquida e liofilizada da solução aquosa do resíduo etanólico fracionada com clorofórmio, foram colocados 300g da planta em um litro de álcool etílico absoluto, permanecendo em maceração por cinco dias. Este material foi filtrado, e o solvente foi removido por meio de evaporação sob pressão reduzida (evaporador rotativo Quimis[®] Q344B - Quimis Aparelhos Científicos, Rua Goma, n° 278 – 308, Diadema, SP) com temperatura máxima de 55 °C, sendo obtido o resíduo etanólico. Este resíduo foi diluído em água destilada, filtrado, e a solução foi submetida à separação com clorofórmio. A fração aquosa separada em funil de decantação foi novamente submetida à evaporação sob pressão reduzida para remoção do clorofórmio residual, sendo obtida 200ml de solução aquosa do resíduo etanólico fracionada com clorofórmio. Foram armazenados 100ml da fração líquida em frasco âmbar a 2 - 8°C, que foi denominada de extrato 1.

Para a produção do extrato 2, os 100ml restantes da fração líquida foi congelada em freezer comum (-20 °C) sendo depois liofilizada (liofilizador de bancada LD 3000, Terrone[®] - Terrone Equipamentos Científicos, Rua Paraná, n°451, Jóquei Clube, São Carlos, SP), dando origem a 26,2g da solução aquosa do resíduo etanólico fracionada com clorofórmio liofilizada.

4.3.2.2 Obtenção da solução aquosa do resíduo etanólico liofilizada

Para a preparação da solução aquosa do resíduo etanólico liofilizada, foram colocados 100g da planta em um litro de álcool etílico absoluto, permanecendo em maceração por cinco dias. Este material foi filtrado, e o solvente foi removido por meio de evaporação sob pressão reduzida (evaporador rotativo Quimis[®] Q344B) com temperatura máxima de 55 °C, sendo obtido o resíduo etanólico. Este resíduo foi diluído em água destilada e filtrado para a obtenção da solução aquosa do resíduo etanólico, cujo volume final foi ajustado para 100 ml. Essa solução foi congelada em freezer comum (-20 °C) sendo depois liofilizada (liofilizador

de bancada LD 3000, Terrone[®]), dando origem a 14,8g da solução aquosa do resíduo etanólico liofilizada. Esse material foi denominado de extrato 3.

4.3.3 Material microbiológico

Foram utilizadas nesse estudo doze cepas bacterianas compreendendo quatro cepas padrão e oito cepas isoladas do campo oriundas de amostras de leite de vacas com mastite (Quadro 1). As amostras procedentes de vacas com mastite foram semeadas em meio ágar sangue de carneiro em placas de Petri através de swabs da amostra e em seguida incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Após este período, verificou-se a formação de colônias e posteriormente foram semeados com o auxílio de alça de platina esterilizada em tubo de ensaio contendo 3ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion) por 24 a 48 horas a 37°C em estufa. As cepas padrão também passaram por este último processo. As cepas bacterianas isoladas do campo também foram semeadas em BHI ágar e incubadas a 37°C por 48 horas e enviadas ao laboratório de microbiologia da UFERSA, onde foram identificadas segundo MacFaddin (2000) e Murray (2003). Das oito cepas isoladas do campo, quatro cepas foram identificadas como *Staphylococcus aureus*, duas como *Bacillus* sp, uma como *Streptococcus* sp e uma como *Corynebacterium* sp.

QUADRO 1.
Cepas bacterianas empregadas nos testes de atividade antimicrobiana

Cepas	Bactéria
Padrão	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Klebsiella</i> sp
	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923
	<i>Enterobacter</i> sp
Isoladas	<i>Staphylococcus aureus</i> 1
	<i>Staphylococcus aureus</i> 2

	<i>Staphylococcus aureus</i> 3
	<i>Staphylococcus aureus</i> 4
	<i>Bacillus</i> sp 1
	<i>Bacillus</i> sp 2
	<i>Streptococcus</i> sp
	<i>Corynebacterium</i> sp

4.3.4 Desenho experimental

Para atender os objetivos do estudo, o mesmo foi dividido em dois experimentos sequenciais. No experimento I, avaliou-se o potencial da atividade antimicrobiana dos três extratos produzidos frente às doze bactérias selecionadas, como triagem para o experimento seguinte. No experimento II, estudou-se o potencial da atividade antimicrobiana do extrato que obteve melhor resultado no experimento I, em oito diluições.

4.3.5 Atividade antimicrobiana

Para todo o estudo foi utilizada a técnica do poço segundo Groove; Randall (1955), com modificações. Esta técnica foi conduzida da seguinte maneira: em placas contendo 30ml ágar Mueller Hinton, fizeram-se poços de 6mm de diâmetro com auxílio de ponteira estéril. Para evitar o contato do extrato da planta com a placa de Petri após a retirada do molde da ponteira, foi posta uma gota do mesmo ágar finalizando a confecção do poço. Com um swab estéril, o inóculo bacteriano com turvação 0,5 da escala de MacFarland foi distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar. No experimento I foi posto em cada poço devidamente identificado, 50µl de cada extrato da planta. No experimento II, foram utilizadas

oito diluições seriadas (Quadro 2) do extrato selecionado no experimento I, seguindo o mesmo procedimento adotado no experimento I. Nos dois experimentos as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Mediu-se em milímetros o halo de inibição do crescimento, utilizando paquímetro com auxílio de lupa. O estudo para todas as bactérias em ambas os experimentos foi desenvolvido em triplicatas e em dias diferentes.

O controle positivo para os experimentos I e II foram discos de estreptomicina[®] e gentamicina[®] (Laborclin Produtos para Laboratório LTDA, Rua Casemiro de Abreu, nº521, Pinhais, PR), respectivamente. O controle negativo para os dois experimentos foi água destilada estéril.

QUADRO 2

Concentração das diluições do tratamento empregado nos testes de atividade antimicrobiana no experimento 2

Diluição	Concentração
Inicial	262mg/ml
1/1	131mg/ml
1/2	65,5mg/ml
1/4	32,75mg/ml
1/8	16,37mg/ml
1/16	8,18mg/ml
1/32	4,09mg/ml
1/64	2,04mg/ml

4.3.6 Análise dos resultados

Os resultados obtidos nos experimentos I e II foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Para o experimento II foi realizada uma análise regressão não-linear modelo logaritmo. Adicionalmente, experimento II foi avaliado de acordo com Ostrosky et al. (2008), comparando a dimensão do halo de inibição do tratamento com o halo obtido com o controle positivo (Quadro 3).

QUADRO 3
Modelo de classificação dos halos de inibição utilizado no experimento 2

Classificação	Padrão de halo
Sensível	Halo maior ou não mais que 3mm menor que o controle positivo
Moderadamente sensível	Halo maior que 2mm e mais de 3mm menor que o controle positivo
Resistente	Halo igual ou menor a 2 mm

5. RESULTADOS

No experimento I, verificou-se, pelo método de difusão em poço, a atividade antimicrobiana dos extratos 1, 2 e 3 do fruto da *Caesalpinia ferrea* (Tabela 1.). Os três extratos demonstraram atividade antimicrobiana para todas as bactérias analisadas. Não houve diferença estatística entre as médias dos halos de inibição nos três extratos para todas as bactérias testadas, com exceção da cepa de campo *Staphylococcus aureus* 3, na qual os melhores resultados foram obtidos com o extrato 1 e 2 com halos médios de 25,3 e 22 mm, respectivamente. Entre as bactérias analisadas, 11 das 12 não apresentaram diferença estatística para a atividade antimicrobiana dos três extratos do fruto de *Caesalpinia ferrea*. Nesse contexto, foi selecionado para o experimento II o extrato 1, pela facilidade de manipulação e obtenção dos maiores halos médios de inibição de crescimento em todas as bactérias.

No experimento II, verificou-se, pelo método do poço, o potencial da atividade antimicrobiana do extrato 1 do fruto da *Caesalpinia ferrea* frente a 4 cepas bacterianas padrão e 8 cepas bacterianas oriundas de amostras de vacas com mastite, nas seguintes diluições: inicial (262mg/ml) , 1/1, 1/2 , 1/4, 1/8, 1/16/, 1/32 e 1/64 (Tabela 2 e 3).

Tabela 1. Médias dos halos de inibição antimicrobiana (mm) dos extratos 1, 2 e 3* do fruto da *Caesalpinia ferrea* frente a 4 cepas bacterianas padrão e 8 cepas bacterianas isoladas de casos de mastite bovina utilizando o teste de difusão em poço.

Bactérias	Zona de inibição (mm)				
	EXTRATO 1	EXTRATO 2	EXTRATO 3	Água	EST.
<i>Escherichia coli</i>	29,7 ± 0,9 ^a	26,7 ± 0,9 ^a	27 ± 0,9 ^a	0,0 ± 0,9 ^c	24,3 ± 0,9 ^b
<i>Klebsiella sp.</i>	26,7 ± 0,9 ^a	24,7 ± 0,9 ^a	25 ± 0,9 ^a	0,0 ± 0,9 ^c	9,3 ± 0,9 ^b
<i>S. aureus</i> 25923	22,7 ± 0,9 ^a	20,7 ± 0,9 ^a	20 ± 0,9 ^a	0,0 ± 0,9 ^c	14,7 ± 0,9 ^b
<i>Enterobacter sp.</i>	19 ± 0,9 ^a	17,3 ± 0,9 ^a	16,7 ± 0,9 ^a	0,0 ± 0,9 ^b	18,3 ± 0,9 ^a
<i>S. aureus</i> 1	20 ± 1,0 ^a	19,7 ± 1,0 ^a	19,3 ± 1,0 ^a	0,0 ± 1,0 ^b	18,5 ± 1,0 ^a
<i>S. aureus</i> 2	19 ± 1,0 ^a	18,3 ± 1,0 ^a	18 ± 1,0 ^a	0,0 ± 1,0 ^b	16,3 ± 1,0 ^a
<i>S. aureus</i> 3	25,3 ± 1,0 ^a	22 ± 1,0 ^{ab}	20,3 ± 1,0 ^{bc}	0,0 ± 1,0 ^d	16,7 ± 1,0 ^c
<i>S. aureus</i> 4	21,3 ± 1,0 ^a	20 ± 1,0 ^{ab}	19 ± 1,0 ^{ab}	0,0 ± 1,0 ^c	15,7 ± 1,0 ^b
<i>Bacillus sp.</i> 1	16,3 ± 1,0 ^a	16 ± 1,0 ^a	14,7 ± 1,0 ^a	0,0 ± 1,0 ^b	13,3 ± 1,0 ^a
<i>Bacillus sp.</i> 2	18,7 ± 1,0 ^a	20,7 ± 1,0 ^a	20,7 ± 1,0 ^a	0,0 ± 1,0 ^c	9,0 ± 1,0 ^b
<i>Streptococcus sp.</i>	20,3 ± 1,0 ^{ab}	23,7 ± 1,0 ^a	24,7 ± 1,0 ^a	0,0 ± 1,0 ^c	16,7 ± 1,0 ^b
<i>Corinebacterium sp.</i>	18 ± 1,0 ^a	15,3 ± 1,0 ^a	17 ± 1,0 ^a	0,0 ± 1,0 ^b	19,3 ± 1,0 ^a

^{a, b, c} Sobrescrito minúsculo seguido de mesma letra na coluna, não difere entre si ao nível de 5% de probabilidade (P>0,05) * Extrato 1 – Solução aquosa do resíduo etanólico fracionada com clorofórmio líquido; Extrato 2 – Solução aquosa do resíduo etanólico fracionada com clorofórmio liofilizada; Extrato 3 – Solução aquosa do resíduo etanólico liofilizado.

Considerando as cepas bacterianas padrão isoladamente, percebeu-se que a *Escherichia coli* e o *S. aureus* 25923 apresentaram os maiores halos de inibição antimicrobiana até a 1/2. A *Enterobacter sp* e a *Klebsiella sp* responderam estatisticamente igual, da diluição inicial até a diluição 1/8 e 1/16, respectivamente. Comparando os dados entre as bactérias, constataram-se os maiores halos, em todas as diluições, para a *Escherichia coli*.

A *Enterobacter sp* apresentou um padrão de resposta atípico, pois a média de halo para a diluição 1/8 foi de 15mm, enquanto para a diluição inicial (16,3mm), 1/2 (14,7mm) e 1/4 (11,7mm). Embora o padrão seja atípico, não houve diferença estatística entre essas diluições.

As cepas de campo também foram analisadas isoladamente, e constatou-se que os *S. aureus* e os *bacillus sp.* obtiveram os maiores halos de diluição até o halo 1/4. Dentre essas cepas, apenas os *S. aureus* 1 e 3 não apresentaram halos de inibição para todas as diluições.

Para o *Streptococcus* sp e o *Corynebacterium* sp os maiores halos foram obtidos até a diluição 1/2 e 1/1, respectivamente.

Obteve-se uma regressão não-linear modelo logaritmo para atividade de inibição antimicrobiana em função das diluições do extrato 1 e chegou-se a equações para estimar halos de inibição em diversas diluições para as cepas bacterianas padrão e cepas bacterianas isoladas de amostras de casos de mastite bovina (Figura 1). Constatou-se, através desse estudo, que o halo de inibição antimicrobiana diminui com o aumento da diluição do extrato. As bactérias isoladas de vacas com mastite apresentaram uma resposta menor em relação às bactérias padrão.

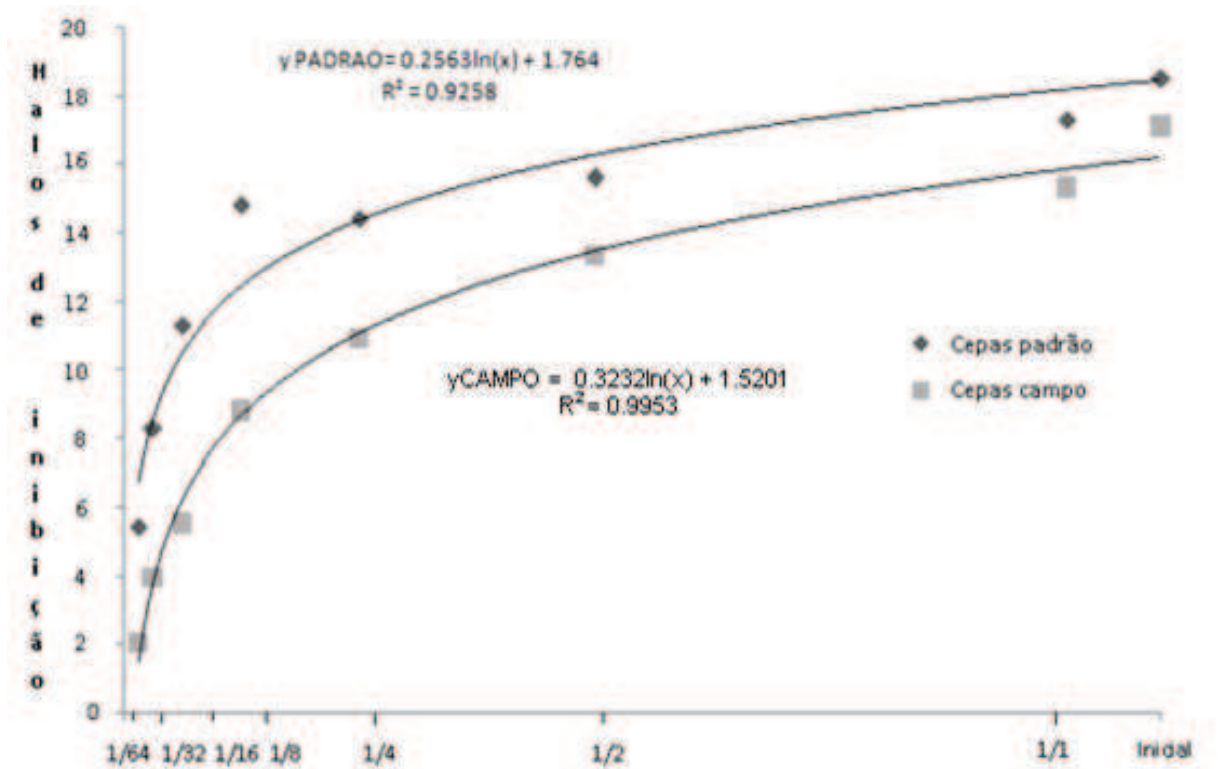


Figura – 2. Halos de inibição antimicrobiana (mm) em função das diluições do extrato 1 da *Caesalpinia ferrea* frente a cepas bacterianas padrão (yPadrão) e frente a cepas isoladas do campo (yCAMPO)

Foi analisado o nível de sensibilidade, segundo protocolo proposto por Ostrosky et al. (2008), para cada bactéria em todas as diluições avaliadas (Figura 3).

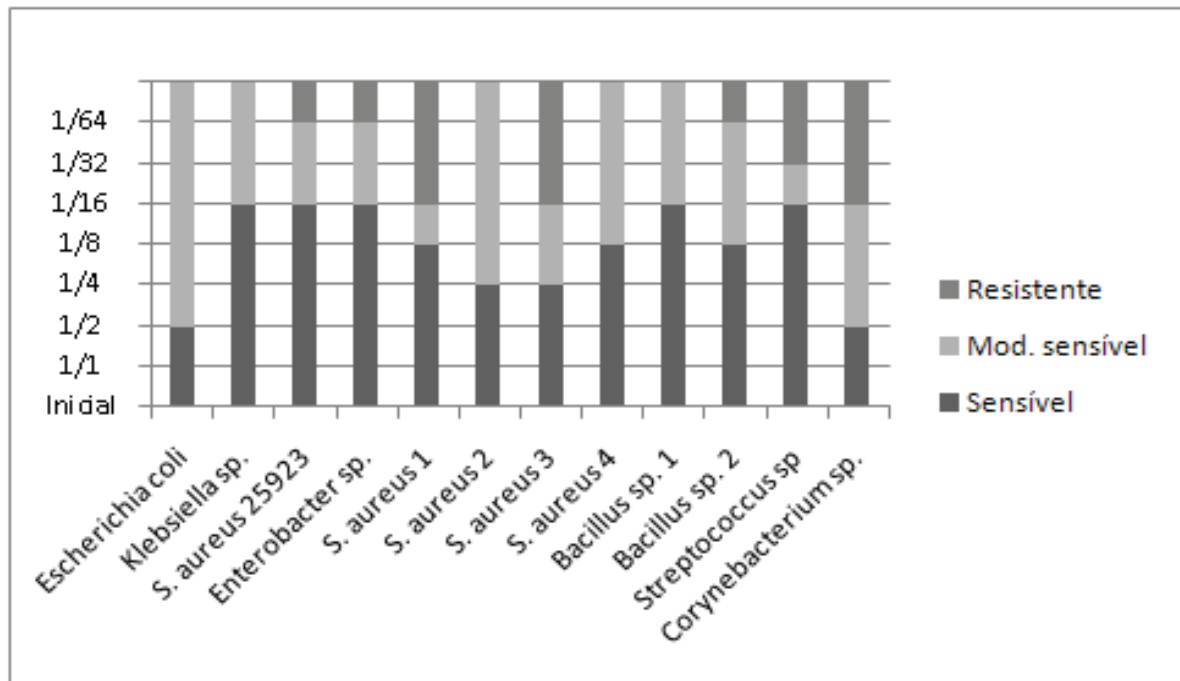


Figura 3. Sensibilidade das bactérias testadas frente às diluições do extrato 1 da *Caesalpinia ferrea*.

A *Escherichia coli* e a *Corynebacterium sp* apresentaram sensibilidade até a diluição 1/1, porém a *E. coli* foi moderadamente sensível a todas as outras diluições, enquanto a *Corynebacterium sp* foi resistente as três últimas diluições.

Para a diluição 1/8 observou-se o maior índice de sensibilidade para algumas bactérias (*Klebsiella sp*, *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterobacter sp*, *Bacillus sp* 1 e *Streptococcus sp*). A partir da diluição 1/16 observou-se resistência para algumas bactérias (*Staphylococcus aureus* 1 e 3, e *Corynebacterium sp*).

A *E. coli* apresentou baixa sensibilidade, porém não foi resistente a nenhuma das diluições, sendo este último fato, observado também para a *Klebsiella sp*, *Staphylococcus aureus* 2 e 4, e *Bacillus sp* 1.

Sete bactérias apresentaram resistência, sendo que, as três que apresentaram a partir da diluição 1/16 foram oriundas do campo. A *Corynebacterium sp* foi a única bactéria que constatou-se, concomitantemente, no grupo de bactérias que apresentaram os menores índices de sensibilidade e os maiores de resistência.

Por uma análise estatística descritiva foi analisado o nível de sensibilidade aos tratamentos, independente da bactéria (Figura 4). Constatou-se que para as diluições inicial e 1/1 todas as bactérias foram sensíveis. A sensibilidade diminui a partir da diluição 1/2

(83,33%) atingindo o limiar mínimo na diluição 1/8 (41,66%). A resistência bacteriana surge a partir da diluição 1/16 para 25% das cepas, chegando a atingir 58,33% para a diluição 1/64.

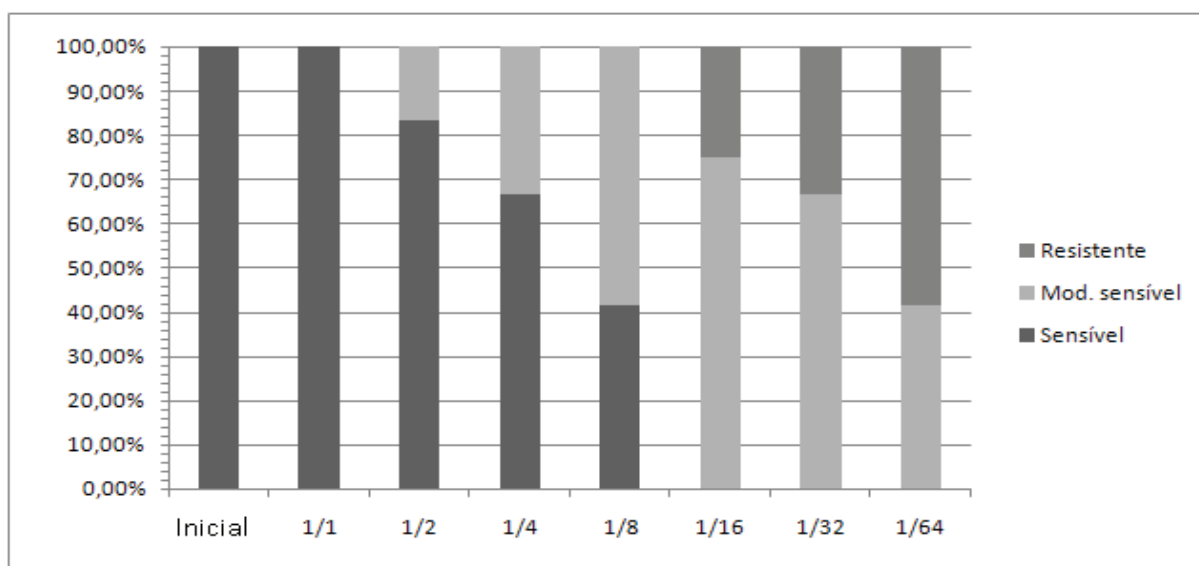


Figura 4. Sensibilidade geral das bactérias avaliadas frente as diluições do extrato 1 do fruto da *Caesalpinia ferrea*.

Tabela 2. Médias dos halos de inibição antimicrobiana (mm) do extrato 1 do fruto da *Caesalpinia ferrea* em 8 diluições frente a 4 cepas bacterianas padrão utilizando o teste de difusão em poço.

Bactérias	Zona de inibição (mm)								
	Inicial	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Gent.
<i>Escherichia coli</i>	22,3 ± 0,9 _{aA}	21 ± 0,9 _{abA}	18,7 ± 0,9 _{abcA}	17 ± 0,9 _{bcdA}	15,3 ± 0,9 _{cdeA}	14 ± 0,9 _{cdeA}	13 ± 0,9 _{deA}	11 ± 0,9 _{eA}	22 ± 0,9 _{aA}
<i>Klebsiella</i> sp.	16,7 ± 0,9 _{aB}	17 ± 0,9 _{aAB}	16 ± 0,9 _{aAB}	16,3 ± 0,9 _{aAB}	16 ± 0,9 _{aA}	13,7 ± 0,9 _{abA}	10 ± 0,9 _{bcAB}	8,7 ± 0,9 _{cA}	17,7 ± 0,9 _{aAB}
<i>S. aureus</i> 25923	18,7 ± 0,9 _{aAB}	16,7 ± 0,9 _{abAB}	14,7 ± 0,9 _{abAB}	12,7 ± 0,9 _{bcAB}	12,7 ± 0,9 _{bcA}	8,7 ± 0,9 _{cB}	2,3 ± 0,9 _{dC}	0,0 ± 0,9 _{dB}	14 ± 0,9 _{abB}
<i>Enterobacter</i> sp.	16,3 ± 0,9 _{aB}	14,7 ± 0,9 _{aB}	13 ± 0,9 _{abB}	11,7 ± 0,9 _{abcB}	15 ± 0,9 _{aA}	8,7 ± 0,9 _{bcB}	7,7 ± 0,9 _{cB}	2 ± 0,9 _{dB}	14,3 ± 0,9 _{aB}

_{a, b, c, d, e} Sobrescrito minúsculo seguido de mesma letra na coluna, não difere entre si ao nível de 5% de probabilidade (P>0,05)

_{A, B, C} Sobrescrito maiúsculo seguido de mesma letra na linha, não difere entre si ao nível de 5% de probabilidade (P>0,05)

Tabela 3. Médias dos halos de inibição antimicrobiana (mm) do extrato 1 do fruto da *Caesalpinia ferrea* em 8 diluições frente 8 cepas bacterianas isoladas de casos de mastite bovina utilizando o teste de difusão em poço.

Bactérias de campo	Zona de inibição (mm)								
	Inicial	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Gent.
<i>S. aureus</i> 1	19,3 ± 0,9 _{aA}	17,7 ± 0,9 _{aA}	14,7 ± 0,9 _{abAB}	9,7 ± 0,9 _{cB}	4 ± 0,9 _{dC}	0,0 ± 0,9 _{dB}	0,0 ± 0,9 _{dC}	0,0 ± 0,9 _{dB}	12,3 ± 0,9 _{bcB}
<i>S. aureus</i> 2	19 ± 0,9 _{aA}	17,7 ± 0,9 _{abA}	16,3 ± 0,9 _{abA}	14,7 ± 0,9 _{abcA}	14 ± 0,9 _{bcdA}	11,3 ± 0,9 _{cdeA}	9,7 ± 0,9 _{deA}	7,3 ± 0,9 _{eA}	19,3 ± 0,9 _{aA}
<i>S. aureus</i> 3	16,7 ± 0,9 _{aA}	15,7 ± 0,9 _{aAB}	13 ± 0,9 _{abAB}	10,3 ± 0,9 _{bAB}	9 ± 0,9 _{bB}	0,0 ± 0,9 _{cB}	0,0 ± 0,9 _{cC}	0,0 ± 0,9 _{cB}	15,7 ± 0,9 _{aAB}
<i>S. aureus</i> 4	16 ± 0,9 _{aA}	15,3 ± 0,9 _{aAB}	14 ± 0,9 _{abAB}	12,3 ± 0,9 _{abcAB}	9,3 ± 0,9 _{bcAB}	8,4 ± 0,9 _{cdAB}	7,6 ± 0,9 _{cdA}	3 ± 0,9 _{dAB}	14,3 ± 0,9 _{aB}
<i>Bacillus</i> sp. 1	16,7 ± 0,9 _{aA}	15 ± 0,9 _{abAB}	13 ± 0,9 _{abcAB}	10,3 ± 0,9 _{bcdAB}	9,7 ± 0,9 _{cdAB}	8 ± 0,9 _{dfA}	6,7 ± 0,9 _{efAB}	4 ± 0,9 _{fgAB}	12,7 ± 0,9 _{abcdB}
<i>Bacillus</i> sp. 2	14,9 ± 0,9 _{aA}	12,1 ± 0,9 _{abB}	11,1 ± 0,9 _{abB}	10,3 ± 0,9 _{abcAB}	9,3 ± 0,9 _{bcAB}	8,7 ± 0,9 _{bcA}	5 ± 0,9 _{cdAB}	1,7 ± 0,9 _{deB}	13,3 ± 0,9 _{abB}
<i>Streptococcus</i> sp.	16,7 ± 0,9 _{aA}	14,3 ± 0,9 _{abAB}	13 ± 0,9 _{abcAB}	10,7 ± 0,9 _{bcdAB}	9,3 ± 0,9 _{cdAB}	7,3 ± 0,9 _{dA}	2 ± 0,9 _{eBC}	0,0 ± 0,9 _{eB}	12 ± 0,9 _{abcdB}
<i>Corinebacterium</i> sp.	17,3 ± 0,9 _{aA}	14,3 ± 0,9 _{abAB}	11,3 ± 0,9 _{bcB}	9,0 ± 0,9 _{cdB}	5,7 ± 0,9 _{dBC}	0,0 ± 0,9 _{eB}	0,0 ± 0,9 _{eC}	0,0 ± 0,9 _{eB}	15,3 ± 0,9 _{abAB}

^{a, b, c, d, e} Sobrescrito minúsculo seguido de mesma letra na coluna, não difere entre si ao nível de 5% de probabilidade (P>0,05)

^{A, B, C} Sobrescrito maiúsculo seguido de mesma letra na linha, não difere entre si ao nível de 5% de probabilidade (P>0,05)

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A resistência bacteriana relaciona-se ao tratamento com antimicrobianos, e que por este motivo é necessária a busca de fontes terapêuticas alternativas, as quais sejam eficientes na cura de doenças de difícil controle, como uma infecção na glândula mamária (SILVA et al. 2007).

Nesse sentido, várias plantas têm sido alvo de estudos para avaliar a atividade antimicrobiana frente a patógenos causadores de mastite bovina (ABATNEH; SINTAYEHU 2001, SILVA et al. 2008, SCHUCH et al. 2008, MIN et al. 2008, GIACINTI et al. 2008, DHANABALAN et al. 2008, AVANCINI et al. 2008, BASKARAN et al. 2009, DANTAS et al. 2009, DE; MUKHERJEE 2009, FON et al. 2009, PEREIRA et al., 2009). O presente estudo é um dos pioneiros utilizando *in vitro* o extrato etanólico (líquido e liofilizado) do fruto da *Caesalpinia ferrea* frente a bactérias causadoras de mastite, e, assim, os resultados demonstraram que os extratos possuem efeito antibacteriano contra todas as bactérias avaliadas, sendo uma possível opção terapêutica para ensaios biológicos *in vivo*.

Nesse estudo foi constatado que o processo de liofilização não altera o potencial de atividade antimicrobiana do extrato do fruto da *C. ferrea*. A liofilização utilizada como meio de secagem para obtenção do extrato seco concorre positivamente para a manutenção das características químicas dos constituintes ativos presentes no extrato vegetal (MICHELIN et al. 2005). Foi observado nesse estudo que não houve perda de substâncias ativas dos extratos no processo de liofilização, como também, no momento da reconstituição para o experimento. Segundo Ayrosa et al. (2007) os produtos liofilizados apresentam facilidade na reconstituição devido à estrutura porosa deixada pela saída da água, garantindo a reprodução fiel do produto original uma vez em contato com a fase líquida primitiva. Com isso, o extrato liofilizado oferece a alternativa de armazenamento, a possibilidade de melhor controle de concentrações em estudos e a confecção de formulações para estudos *in vivo*.

Observou-se que a sensibilidade das bactérias ao extrato diminuiu com o aumento das diluições para todas as bactérias testadas. Esta resposta já havia sido observada para o extrato da casca da *C. ferrea* frente a cepas de *S. aureus* e *E. coli* (PEREIRA et al. 2006), como também para as plantas, *Caesalpinia sappan* (KIM et al. 2004), *Anacardium occidentale* (SILVA et al. 2007), *Punica granatum* (SILVA et al. 2008), *Mimosa tenuiflora*, *Azadiracta*

indica (PEREIRA et al. 2009), e *Bauhinia reticulata* (FON et al. 2009). Outro aspecto observado foi que as cepas bacterianas de campo apresentaram maiores índices de resistência em comparação às cepas padrão. Esse fato, provavelmente, pode estar ligado a questões de manejo que contribuam para que as bactérias de campo estejam sujeitas a uma pressão de seleção mais acentuada (WHITE; MCDERMOTT 2001), tendo em vista que a planta é observada com frequência em pastos da região nordeste (CAVALHEIRO et al. 2009) e utilizada na cultura popular como tratamento para a mastite clínica bovina através da raspa da casca na alimentação (TOMAZ, 2008).

Estudos para avaliar a atividade antibacteriana da *C. ferrea* frente a bactérias causadoras de mastite são escassos na literatura. PEREIRA et al. (2009) estudaram o efeito antibacteriano do extrato etanólico da casca dessa planta frente a três cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina, e, utilizando a técnica do poço, apresentaram resultados que confirmam a atividade antimicrobiana dessa planta. Vale ressaltar, que PEREIRA et al. (2009) utilizaram somente cepas de *S. aureus*, enquanto o presente estudo foi mais abrangente, comprovando a atividade antibacteriana dos extratos do fruto da *C. ferrea* para as principais bactérias isoladas de casos de mastite bovina (ALMEIDA et al. 1999, PRESTES et al. 2002, TENHAGEN et al. 2006, NUNES et al. 2007). Segundo SILVEIRA; OLEA (2009), os estudos de ação antimicrobiana com plantas medicinais necessitam de ensaio *in vitro* com pelo menos um tipo de bactéria Gram-positiva e Gram-negativa, sendo tal recomendação seguida pela metodologia deste trabalho e comprovando o efeito antibacteriano frente às bactérias: *E. coli*, *Klebsiella* sp, *S. aureus* (padrão e de campo), *Enterobacter* sp, *Bacillus* sp, *Streptococcus* sp e *Corynebacterium* sp.

Outros trabalhos não direcionados para a mastite bovina confirmam a atividade antibacteriana da *C. ferrea* (PEREIRA et al. 2006, CAMPOS et al. 2009). Por sua vez, Cavalheiro et al. (2009) utilizando a técnica de difusão em disco não constatarem ação antimicrobiana para o extrato aquoso da *C. ferrea* frente a *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogens*, *Salmonella choleraensis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Essa discordância pode ser explicada, principalmente, pela diferença da técnica utilizada e do solvente de extração. O presente estudo utilizou a técnica do poço em ágar que permite a difusão radial dos extratos favorecendo melhor ação antimicrobiana (CAETANO et al. 2002). Silveira et al. (2009) comprovaram que a técnica do poço é mais sensível para a determinação da ação antimicrobiana de extratos vegetais que a técnica do disco. Quanto ao

solvente, o presente estudo, diferentemente de Cavalheiro et al. (2009), utilizou o álcool etílico, que é considerado o melhor solvente para extração de substâncias antimicrobianas ativas (CHANWITHEESUK et al. 2007).

A ação antimicrobiana da *C. ferrea* constatada neste estudo é relacionada à presença de flavanóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos nessa planta, sendo especulado que um ou mais destes compostos podem ser o(s) responsável(is) (GONZÁLEZ et al. 2004). Fernandes et al. (2005) detalham que os taninos são substâncias fenólicas e hidrossolúveis, que podem inibir o crescimento de bactérias e fungos, e que os flavanóides são compostos que possuem efeitos biológicos, incluindo o antimicrobiano. Existem três hipóteses para o mecanismo de ação dos taninos e flavanóides: inibição de enzimas das bactérias e/ou ligação ao substrato dessas enzimas; agindo na membrana plasmática, modificando-a; ou ainda, pela ligação com íons metálicos, a qual diminuiria a disponibilidade desses íons, essenciais ao metabolismo dos microorganismos (LOQUERCIO et al. 2005, MIN et al., 2007).

Não se conhece o princípio ativo para a *C. ferrea*, entretanto, outras plantas do gênero *Caesalpinia* apresentaram ação antimicrobiana frente a diversos microorganismos, incluindo bactérias do mesmo gênero das utilizadas nesse estudo, tendo sido isolados princípios ativos, os quais podem ser responsáveis pela ação antimicrobiana de plantas desse gênero (KIM et al. 2004, KLOUCEK et al. 2005, SUDHAKAR et al. 2006, LIMA et al. 2006, SGARIGLIA et al. 2006, PAREKH; CHANDA 2007, CHANWITHEESUK et al. 2007, ARIF et al. 2009, CHAKRABORTHY; KAUSHIK 2009). Da *Caesalpinia pulcherrima* foram isolados furanoditerpenóides, ellagitaninos, peltoginóide e homoisoflavanóides (SUDHAKAR et al. 2006). Chanwitheesuk et al. (2007) apresentam o ácido gálico (tanino hidrolizado) como o princípio ativo da *Caesalpinia mimosoides* responsáveis pela ação antimicrobiana desta planta. Estes compostos ou outros correlatos, provavelmente, podem estar presentes na *C. ferrea* e atuar como antibacterianos.

3.7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. C.; FONSECA, Y.M.; SOARES, T.M.P.; BUELTA,T.T.M; SILVA, G.L.M.E. Tratamento de mastite subclínica em bovinos utilizando bioterapia. **R. Un. Alfenas**. v. 5, p. 199 – 203, 1999..

ABATNEH, D.; SINTAYEHU, A. Treatment trial of subclinical mastitis with the herb persicaria senegalense (Polygonaceae). **Tropical Animal Health and Production**. v. 33, p. 511 – 519, 2001.

ARIF, T.; MANDAL, T.K.; KUMAR, N.; BHOSALE, J.D.; HOLE, A.; SHARMA, G.L.; PADHI, M.M.; LAVEKAR, G.S.; DABUR, R.. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of seeds of *Caesalpinia bonduc* (Lin.) Roxb. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 123, p. 177 – 180, 2009.

AYROSA, A.M.I.B.; MAIZATO, M.J.; POLAKIEWICZ, B.; BEPPU, M.M.; PITOMBO, R.N.M. Estudo do comportamento higroscópico do pericárdio bovino liofilizado. **Revista Matéria (UFRJ)**. v. 12, p. 313 – 321, 2007.

AVANCINI, C.; WIEST, J.M.; DALL'AGNOL, R.; HAAS, J.S.; POSER, G.L.V. Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.27, n. 6, p.894 – 899, 2008..

BACCHI, E.M.; SERTIE, J.A.A. Anti-ulcer action os *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta medica**. v. 60, p. 118-120, 1994.

BACCHI, E. M.; SERTIE, J.A.A.; VILLA, N.; KATZ, H. Anti-ulceration and toxicity *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta medica** v. 61, p. 204-207, 1995.

BALBACH, A. **Plantas que curam**. Tres Press, São Paulo, 1972, 302-303p.

BASKARAN, S.A.; KAZMER, G.W.; HINCKLEY, L.; ANDREW, S.M.; VENKITANARAYANAN, K. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. **Journal of Dairy Science**.. v. 92, n. 4, p. 1423 – 1429, 2009..

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M.C.B.; MAIA, M.B.S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. **Rev. Bras. Farmacogn**. v. 12, p. 132 – 135, . 2002.

CAMPOS, A.M.; BANDEIRA, M.F.C.L.; MARREIRO, R.O.; SOUSA, T.P.; OLIVEIRA, N.C.C. Estudo preliminar do extrato de *Caesalpinia ferrea* L. para a formulação de um novo enxaguatório bucal. XVIII Encontro do Grupo Brasileiro de Professores de Dentística, Foz do Iguaçu, PR, 2009. Disponível em: www.uepg.br/encontrobpd (Resumo expandido).

CARVALHO, J.C.T.; TEIXEIRA, J.R.M.; SOUZA, P.J.C.; BASTOS, J.K.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S.J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethno-Pharmacology**. v. 53, p. 175-178, 1996.

CAVALHEIRO, M.G.; FARIAS, D.F.; FERNANDES, G.S.; NUNES, E.P.; CAVALCANTI, F.S.; VASCONCELOS, I.M.; MELO, V.M.M.; CARVALHO, A.F.U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 19, n. 2B, p.586 – 591, 2009.

CHAKRABORTHY, G.S.; KAUSHIK, K.N. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Caesalpinia pulcherrima* (Linn.). **Journal of Herbal Medicine and Toxicology**. v. 3, n. 1, p.:65 – 67, 2009.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J. D.; RAKARIYATHAM, N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Food Chemistry**. v. 100, p. 1044 – 1048, 2007.

DANTAS, S.A.F; SENA, L.V.T.; MELO, D.J.A.; DUARTE, F.T.; CARVALHO, A.S. Avaliação de plantas medicinais no combate a mastite bovina. **Holos**. Ano 25, v. 4, p. 96 – 102, 2009.

DE, U. K.; MUKHERJEE, R. The inhibitory response of *Azadirachta indica* extract on nitric oxide production by milk leukocytes during clinical mastitis. **Veterinarski Arhiv**. v. 79, n. 1, p. 41 – 50, 2009.

DHANABALAN, R.; DOSS, A.; JAGADEESWARI, M.; BALACHANDAR, S.; KEZIA, E.; PARIVUGUNA, V.; JOSEPHINE, C.M.R.; VAIDHEKI, R.; KALAMANI, K. *In vitro* phytochemical screening and antibacterial activity of aqueous and methanolic leaf extracts of *Tridax procumbens* against bovine mastitis isolated *Staphylococcus aureus*. **Ethnobotanical leaflets**. v. 12, n. 1, p. 1090 – 1095, 2008.

FERNANDES, T.T.; SANTOS, A.T.F.; PIMENTA, F.C. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Revista de Patologia Tropical**. v. 34, n. 2, p. 113 – 122, 2005.

FON, T.E.; MATHIAS, A.I.; ANTHONY, C.A.; MGBOJIKWE, L.; VENASIUS, K. Susceptibilities of aerobic bacteria associated with bovine mastitis to leaf extracts of *Bauhinia reticulata*. **Vet Scan. On Line Veterinary Journal**. v. 4, n. 2, 2009. Disponível em www.vetscan.co.in

GIACINTI, G.; ROSATI, R.; BOSELLI, C.; TAMMARO, A.; AMATISTE, S.; RONCHI, B. Controlo f bovine sub-clinical mastitis by using herbal extract during lactation. **Anais...** 16th IFOAM Organic World Congress, Modena, Italy, 2008..

GNAN, S.O., DEMELLO, M.T. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous Goiaba extracts. **Journal of Ethno-Pharmacology**. v. 68, p. 103-108, 1999.

GONZALEZ, F. G., BARROS, S.B.M. & BACCHI, E.M.. Atividade Antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. 2004. Anais IX Semana da Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**.v. 40, p. 79 – 79, 2004.

GROOVE, D.C.; RANDALL, W.A. Assay **metods of antibiotic: a laboratory manual**. **Medical Encyclopedia**. New York, 1955, 238p.

KIM, K.J.; YU, H.H.; JEONG, S.I; CHA, J.D.; KIM, S.M.;YOU, Y.O. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethno-Pharmacology**. v. 91, p. 81 – 87, 2004.

KLOUCEK, P.; POLESNY, Z.; SVOBODOVA, B.; VLKOVA, E.; KOKOSKA, L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. **Journal of Ethno-Pharmacology**. v. 99, p. 309 – 312, 2005.

LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethno-Pharmacology**. v. 105; p. 137-147, 2006.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; CASTAGNA, A.V.; NIURA, A.H.; WITT, M.. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**. v. 35, n. 2; p. 371 – 376, 2005.

LUTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide–lincosamide resistance phenotypes and genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 57, p. 966 – 969, 2006.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 3rd ed. USA: Philadelphia, 2000, 901p.

MANGIÉRI JÚNIOR, R.; SOUTO, L.I.M.; MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R. Avaliação de tratamento homeopático na mastite bovina subclínica. **Vet. e Zootec**. v. 14, n. 1, p.91- 99, 2007.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade anti-helmíntica de extratos vegetais. **Saúde Rev.** v. 7, n. 16, p. 7-10, 2005.

MIN, B.R.; PINCHAK, W.E.; ANDERSON, R.C.; CALLAWAY, T.R. Effect of tannins on the in vitro growth of *Escherichia coli* O157:H7 and in vivo growth of generic *Escherichia coli* excreted from steers. **Journal of Food Protection.** v. 70, n. 3, p. 543 – 550, 2007.

MIN, B.R.; PINCHAK, W.E.; MERKEL, R.; WALKER, S.; TOMITA, G.; ANDERSON, R.C. Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens. **Sci. Res. Essays.** v. 3, n. 2, p. 66 – 73, 2008.

MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz J Vet Res anim Sci.** v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology.** 8th ed. Washington: ASM Press, 2003, 2113p.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters.** v. 177, p. 119-124, 2002a.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of Brazilian folk medicine, jucá, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethno-Pharmacology.** v. 81, p. 135-137, 2002b.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Rev. Nutr.** v. 14, n. 2, p. 119-124, 2001.

NUNES, F. S.; CAVACO, L.M.; VILELA, C.L.; BEXIGA, R. Perfil de susceptibilidade a antibióticos de agentes etiológicos de mastite subclínica bovina em Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.** v. 102(563-564), p. 275 – 280, 2007.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 18, n. 2, p. 301 – 307, 2008.

PAREKH, J.; CHANDA, S.V.. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turk J. Biol.** v. 31, p. 53 – 58, 2007.

PEREIRA, M.S.V.; RODRIGUES, O.G.; FEIJÓ, F.M.C.; ATHAYDE, A.C.R.; LIMA, E.Q.; SOUSA, M.R.Q. 2006. Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no Semi-Árido Paraibano. **Agropecuária Científica no Semi-árido**. v. 2, n. 1, p. 37 – 43, 2006.

PEREIRA, A.V.; LÔBO, K.M.S.; BEZERRA, D.A.C.; RODRIGUES, O.G.; ATHAYDE, A.C.R.; MOTA, R.A.; LIMA, E.Q.; MEDEIROS, E.S. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de jurema preta e neem sobre amostras de *Staphylococcus* sp isoladas de mastite em búfalas. **Arquivo do Instituto Biológico**. v. 76, n. 3, p. 341 – 346, 2009a.

PEREIRA, A.V.; RODRIGUES, O.G.; AZEVÊDO, T.K.B.; BEZERRA, D.A.C.; LIMA, E.Q.; PEREIRA, M.S.V. Perfil de extrato de plantas sobre *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. **BioFarm – Rev. de Biologia e Farmácia**. v. 3, n. 1, p. 105 – 111, 2009b.

PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da FZVA Uruguaiana**. v. 9, n. 1, p. 118 – 132, 2002.

RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N.E.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp isoladas de queijo tipo coalho. **Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoo**.v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; BARBOSA, R.S.; ZANELA, M.B.; GOMES, J.F.; STUMPF JR.; W. SCHRAMM, R. Ocorrência de mastite causada por *Nocardia* spp em rebanhos de unidades de produção. **R. Bras. Agrobiologia**. v. 12, n. 4, p. 471 – 473, 2006.

ROCHFORD, S.; PARKER, A.J.; DUNSHEA, F.R. Plant bioactives for ruminant health and productivity. **Phytochemistry**. v.69, p. 299 – 322, 2008.

SCHUCH, L.F.D.; WIEST, J.M.; COIMBRA, H.S.; PRESTES, L.S.; TONI, L.D.; LEMOS, J.S. Cinética da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos naturais frente a microorganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**. v. 9, n. 1, p. 161 – 169, 2008.

SILVA, J. G. S.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 4, p. 572 – 577, 2007.

SILVA, M.A.R.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, J.V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; PEREIRA, M.S.V. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 2, p. 209 – 212, 2008.

SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G. Isolamento de compostos com atividade antibacteriana em *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae). **Rev. Bras. Farm.**v. 90, n. 2, p. 148 – 153, 2009.

SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, J.S.; CRUZ, A.L.N.; MENDES, J.C. Metodologias de atividade de antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.** v. 90, n. 2, p. 124 – 128, 2009.

SGARIGLIA, M.A.; SOBERÓN, J.R.; QUIROGA, E.N.; SAMPIETRO, D.A.; VATTUONE, M.A. Evaluation of the antibacterial activity of different extractive forms of *Guayacán ritidome*. **Molecular Medicinal Chemistry**. v. 11, p. 21 – 23, 2006.

SUDHAKAR, M.; RAO, C.V.; RAO, P.M.; RAJU, D.B.; VENKATESWARLU, Y. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. **Fitoterapia**. v. 77, p. 378 – 380, 2006.

TENHAGEN, B.A.; KOSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**. v. 89, n. 7, p. 2542 – 2551, 2006.

TOMAZ, K.L.R. Comunicação pessoal (Hospital Veterinário Dix-Huit Rosado Maia, Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, RN), 2008.

WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F. Emergence and Transfer of Antibacterial Resistance. **J. Dairy Sci**. v. 84 (E), p. 151-155, 2001.

ANEXOS

ANEXO 01 – E-MAIL RESPOSTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA ORIUNDA DESTA DISSERTAÇÃO

Prezado Autor,

Recebemos o artigo "**Atividade antimicrobiana do extrato alcoólico do fruto de *Caesalpinia ferrea* Mart. frente a bactérias causadores de mastite bovina**", de autoria de Klívio Loreno Raulino Tomaz, Maria Rociene Abrantes, Manuella de Oliveira Cabral Rocha, Benito Soto-Blanco, Jean Berg Alves da Silva & Francisco Marlon Carneiro Feijó, submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira e registrado como **Trabalho 2023 LD**.

Atenciosamente,
Jürgen Döbereiner
Editor Pesq.Vet.Bras.