



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL-DMFA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL-PPGCAT**

DIELSON DA SILVA VIEIRA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* e *in vivo* DA FOLHA DA *Hymenaea
martiana* Hayne COMO MEDIDA PREVENTIVA DA MASTITE CAPRINA**

Recife, PE

2016

DIELSON DA SILVA VIEIRA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* e *in vivo* DA FOLHA DA *Hymenaea martiana* Hayne COMO MEDIDA PREVENTIVA DA MASTITE CAPRINA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Recife, PE

2016

Ficha catalográfica

V658a Vieira, Dielson da Silva
Atividade antimicrobiana in vitro e in vivo da folha da
Hymenaea martiana Hayne como medida preventiva da mastite
caprina / Dielson da Silva Vieira. – Recife, 2016.
57 f. : il.

Orientador: Mateus Matiuzzi da Costa.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2016.
Inclui referências e anexo(s).

1. Profilaxia 2. Caprinocultura leiteira 3. Fitoterapia 4. Mastite
5. Folhas I. Costa, Mateus Matiuzzi, orientador II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL-DMFA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL-PPGCAT**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta Universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.”

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* e *in vivo* DA FOLHA DA *Hymenaea Martiana* Hayne COMO MEDIDA PREVENTIVA DA MASTITE CAPRINA

Dielson da Silva Vieira

APROVADO em: 23/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa (UNIVASF)

Orientador – Presidente

Prof. Dr. Rodolfo de Moraes Peixoto (IF-SERTÃO)

Membro externo

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Sampaio de Medeiros (UFRPE)

Membro externo

Recife-PE

2016

Dedicatória

Dedico aos meus pais, Janilda da Silva Vieira e José Vieira da Silva

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, ao meu anjo da guarda, sem à força e proteção de destas forças eu não teria trilhado meus caminhos e não teria encontrado e convivido com pessoas tão especiais.

Agradeço aos meus pais José Vieira da Silva e Janilda da Silva Vieira, por toda força, amizade, compreensão, paciência. O apoio de vocês foi fundamental e sempre será importante, saibam que amo muito vocês e serei eternamente grato por cada dia ao lado de vocês e por todo apoio diante dos dias que passaram e dos que estão por vir. Aos meus irmãos também, Gustavo da Silva Vieira, Denilson da Silva Vieira e Danilo da Silva Vieira, obrigado por toda paciência e ajuda, obrigado meus irmãos.

Com muita admiração, que agradeço ao meu professor e orientador Dr. Mateus Matiuzzi da Costa, pela oportunidade de ser seu aluno de mestrado. O senhor professor é um exemplo, um ser humano admirável, sou muito grato por todos seus ensinamentos, paciência, todo apoio e amizade, aprendi muito com o senhor e irei levar sempre comigo para minha vida profissional e pessoal. Agradeço ao meu orientador, Dr. Rodolfo de Moraes Peixoto, obrigado por todos os ensinamentos, pelas palavras de luz e principalmente pela amizade e esperança.

Um grande obrigado e de coração aos meus amigos, Jusciene Bagagi Moura, nos momentos difíceis estava lá para me ouvir, me ajudar, um anjo, uma amiga, uma irmã que a vida me deu. A minha amiga e companheira de todas as horas Michelline Lins, sentirei falta de sua risada, obrigado “Michell”, seu apoio, ajuda e palavras, foram fundamentais. Ao Davi que apareceu num momento muito crucial e me ajudou primorosamente, se tornou um grande amigo e o qual jamais esquecerei. Jéssica Sousa que veio lá de Viçosa/MG e deixou sua marca de muito carinho, e amizade, além de sempre estar disposta e me ajudar quando precisei. Muito Obrigado também para Roberta Lomonte, sem sua ajuda jamais estaria aqui.

Agradeço também a Êlane Rafela, uma das primeiras pessoas que graças ao PGCAT conheci e se tornou uma grande amiga. Érica Chaves, por toda amizade e companheirismo durante todo o processo.

Obrigado aos colegas de PGCAT, as disciplinas foram muito enriquecedoras graças à companhia e participação de todos, mais especialmente a Cecinha Carvalho, Cecilia Leão, Thais Castelo Branco, André Lucas, Camila Brito e Edson Moura. Agradeço aos meus

colegas do laboratório de Doenças Infecciosas da UFRPE, pelos momentos de risadas e aprendizado, principalmente Erika Samico, Renatinha, Grasiene, Jonatas Campos.

Muito obrigado ao Jonata Campos, toda amizade e ajuda foram fundamentais. Agradeço demais a amizade do Edson Moura, me ajudou muito na minha estadia em Recife e me apresentou a família Almeida, Dona Guiomar Almeida, Carina, Alice, Arthur e Enoque Almeida, que me acolheram, foram meus amigos, foram palavras de carinho e conforto, foram a paz e fortaleza, obrigado por serem pessoas tão especiais, verdadeiros anjos da guarda, serei eternamente grato por ter conhecido vocês e por agora fazer parte desta família tão querida.

Aos professores Dr^a. Ana Amélia Domingues Gomes e Dr. Mário Adriano Ávila Queiroz, que assim como professor Mateus Matiuzzi me apresentaram a oportunidades, que a cada dia me fizeram amar o mundo científico. Agradeço a Dr^a. Sandra Yamamoto por todo apoio no manejo e utilização dos animais, mas não somente isto pela força e amizade durante todo este período. Obrigado também a Dr^a. Eva Sarmento, em vários momentos ao conversar com a senhora tive momentos de muita luz.

Agradeço a todos os companheiros de jornada, todos os colegas que me ajudaram a chegar neste ponto tão importante, aos colegas do laboratório Microbiologia e Imunologia da UNIVASF, aprendi muito com vocês, meus companheiros do dia-a-dia e sem sua ajuda eu não haveria de ter conseguido realizar meu experimento.

Obrigado à Dr^a Tânia Sarmento (UFRPE) e seus bolsistas que realizaram a análise fitoquímica do extrato utilizado neste trabalho. Agradeço também a professora Dr^a Francesca Dias Nobre por momentos de esclarecimento e aprendizagem. Serei também muito grato a professora Dr^a Xirley Pereira Nunes, e a técnica do seu laboratório Amanda Guimarães, que me ajudaram ao ceder espaço e material para a preparação do extrato.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, ao prof. Dr. Anísio Soares pelo apoio e praticidade.

Fontes Financiadoras

A pesquisa foi financiada com recursos provenientes da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio da concessão da bolsa de pós-graduação.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	15
2 - REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Mastite Caprina: Aspectos gerais	17
2.1.1 Etiologia e epidemiologia.....	17
2.1.2 Mastite caprina causada por <i>Staphylococcus</i> spp.....	18
2.2 Resistência aos antimicrobianos, desinfetantes e produção de biofilme	19
2.3 Métodos de prevenção da mastite caprina	22
2.3.1 Uso do pré- <i>dipping</i> na linha de ordenha.....	23
2.4 Produtos fitoterápicos na produção animal	25
2.4.1 <i>Hymenaea</i> sp. e seu potencial antimicrobiano.....	27
3 - OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO 1.	42
Artigo: Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do extrato etanólico bruto da folha da <i>Hymenaea martiana</i> Hayne frente à <i>Staphylococcus</i> spp. e avaliação de seu potencial como desinfetante em cabras	
4 - CONCLUSÕES	55
ANEXOS	56
ANEXO 1. Parecer de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIVASF	

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1. Estrutura básica dos flavonóides.....	28
--	----

Capítulo 1

Figura 1. Cromatograma (HPLC-DAD em 310nm) do extrato etanólico das folhas de <i>Hymenaea martiana</i> Hayne.....	53
Figura 2. Comparação da Concentração Bactericida Mínima entre isolados que são <i>blaZ</i> positivo ou <i>blaZ</i> negativo e dois diluentes utilizados no EEB da <i>H. martiana</i>	54

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Revisão de Literatura

Quadro1. Triagem fitoquímica do EEB da casca da <i>H. martiana</i>	28
---	----

Capítulo 1

Quadro 1. Médias obtidas para UFC/cm ² nos diferentes tempos experimentais em cabras tratadas duas soluções diferentes, 2015.....	53
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Acurácia
ADA	Água destilada autoclavada
AEA	Álcool etílico absoluto
ATCC	American type culture collection
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CBM	Concentração bactericida mínima
CEUA	Cômite de ética em experimentação humana e animal
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CCS	Contagem de células somáticas
CMT	California mastitis test
EEB	Extrato etanólico bruto
FAO	Food and agriculture organization
HPLC	High performance liquid chromatography
HVASF	Herbário do Vale do São Francisco
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
IN	Instrução normativa
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NMC	National Mastitis Council
OMS	Organização mundial de saúde
PGCAT	Pós-graduação em Ciência Animal Tropical
PCA	Plate Counting Ágar
ppm	Partes por milhão
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
Se	Sensibilidade
SPSS	Statistical package for the social sciences
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco

LISTA DE SÍMBOLOS

N.º	Número
%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
+	Positivo
-	Negativo
µL	Microlitro
X	Multiplicação
°C	Graus Celsius
K	Índice kappa
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
cm ²	Centímetro quadrado

RESUMO

A caprinocultura leiteira apesar de apresentar grandes avanços tecnológicos, ainda é bastante afetada pelas doenças infecciosas, como a mastite, que é ainda um grande problema, causando sérios prejuízos e necessitando de alternativas na sua prevenção. Este trabalho objetivou avaliar a composição fitoquímica do Extrato Etanólico Bruto (EEB) da folha da *Hymenaea martiana*, além de avaliar seu potencial antimicrobiano *in vitro* e *in vivo*. Para avaliação fitoquímica das folhas, estas foram preparadas para a obtenção do EEB, e então foi avaliada em HPLC-DAD. Em relação aos estudos *in vitro*, foram utilizados 18 isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de caprinos com mastite subclínica, sendo algumas cepas com gene *blaZ* (n=9) e outras não (n=9), e quatro cepas de referência clínica (MRSA, ATCC 12228, ATCC 25923 e ATCC 6538). O EEB foi diluído em álcool etílico absoluto e em água destilada autoclavada para determinação da concentração bactericida mínima (CBM), subsidiando os estudos *in vivo*. Em relação à pesquisa *in vivo*, foram utilizadas 10 cabras saanen, sendo cinco animais tratados com uma solução aquosa a 5% do EEB da *H. martiana* e cinco animais tratados com um produto comercial contendo 1400 ppm de cloro diluído em água destilada autoclavada. Estes animais então passaram por pré-*dipping*, sendo coletado um swab de uma região de 2cm² no intermédio do teto antes da imersão com os produtos utilizados. Os tetos então foram submergidos por 30", após a imersão foram coletados swabs do mesmo local inicial com um minuto, 30' e 60' após a imersão. Para isolamento de *Staphylococcus* spp., foi utilizado o meio ágar sangue numa concentração de 8%, e para a realização da contagem de mesófilos aeróbios totais, o meio PCA, ambos em estufa a 37°C por 48h. Como resultado da avaliação do EEB, obteve-se a dominância dos flavonóides. Não houve diferença estatística para o extrato da folha utilizado em diferentes diluentes e também em relação a presença ou ausência do gene *blaZ* (P<0,05). Quanto à atividade antisséptica do EEB em comparação com o produto comercial, ambos foram eficientes na redução da UFC/cm². A solução aquosa do extrato etanólico da folha da *H. martiana* apresentou a capacidade de reduzir as contagens bacterianas totais *in vivo* nas superfícies das glândulas mamárias, podendo ser uma alternativa para a prevenção da mastite caprina.

Palavras-chave: Profilaxia. Caprinocultura leiteira. Fitoterapia. Mastite. Folhas.

ABSTRACT

Dairy goat despite having major technological advances, it is still quite affected by infectious diseases such as mastitis, which is still a major problem, causing serious damage and requiring alternatives in its prevention. The aim of this study was to evaluate the phytochemical composition of the Crude Ethanolic Extract (CEE) of *Hymenaea martiana* leaves, and to evaluate its antimicrobial potential *in vitro* and *in vivo*. For leaves phytochemical evaluation, these were prepared to obtain the CEE, and then was evaluated in HPLC-DAD. In the *in vitro* studies, 18 isolates of *Staphylococcus* spp. were used, arising from goats with subclinical mastitis, with *blaZ* gene (n=9) and without it (n=9), and four strains for clinical reference (MRSA, ATCC 12228, ATCC 25923 e ATCC 6538). The CEE was diluted in absolute ethyl alcohol and autoclaved distilled water to determine the minimum bactericidal concentration (MBC), supporting the *in vivo* studies. Regarding the *in vivo* research, 10 Saanen goats were used, five animals treated with a 5% aqueous solution of CEE of *H. martiana*, five animals treated with a commercial product containing 1400 ppm of chlorine diluted in autoclaved distilled water. These animals were under went to a pre-wash, and then a swab of 2cm² was collected in through the teat before the immersion with the products used. The teats were submerged for 30". After the immersion, swabs were collected from the same starting location with a minute, 30' and 60' after immersion. For the isolation of *Staphylococcus* spp., blood agar medium containing 8% of sheep blood was used, and for the counting of the total mesophilic aerobic, PCA medium was used, both in a glasshouse at 37°C for 48h. After an evaluation of CEE, a dominance of flavonoids was obtained. There was a higher bacterial inhibition activity conferred to the extract diluted in absolute alcohol (P<0.05). Comparing the presence or absence of *blaZ* gene, there was no statistical difference. The comparison of the antiseptic activity of the CEE and the commercial product was that both diminished the CFU/cm². Based on these results, the aqueous solution of the ethanolic extract of *H. martiana* leaves showed the capacity to reduce total bacterial counts *in vivo* on the surfaces of glands, and it can be used in the prevention of goat mastitis.

Keywords: Prevention. Dairy goat. Herbal medicine. Mastitis. Leaves.

1. INTRODUÇÃO

O leite de cabra é um alimento de alto valor nutritivo, indicado inclusive para indivíduos que sofrem de problemas digestivos e que não toleram o leite bovino (Langoni et al. 2006). O preço atrativo dos produtos é um dos fatores que impulsionam a caprinocultura leiteira, permitindo a profissionalização dos produtores rurais (Gonçalves et al. 2001). Neste caso, a utilização de caprinos leiteiros na região Nordeste, age como um meio de fixação do homem no campo, levando ao desenvolvimento da área rural, mas não somente isto, ocorre deste modo o crescimento destes indivíduos devido à incrementação financeira ocorrida com a produção do leite e seus derivados.

Com o aprimoramento da criação de caprinos e o aumento na produção leiteira, tem surgido uma maior preocupação com a qualidade do leite, o que requer o controle de alguns fatores que possam alterar suas características, e o principal deles é a mastite (Langoni et al. 2006). Esta é uma das doenças mais difundidas entre os rebanhos leiteiros mundiais, e traz uma série de complicações e prejuízos, financeiros, culturais, sociais, materiais, imateriais, para o rebanho, como para a indústria leiteira e para a saúde pública.

A caprinocultura leiteira é uma atividade relevante para a região do semiárido nordestino, contudo a mastite não é um problema local, ela possui amplitude global, e seus prejuízos precisam ser evitados, não somente pelo tratamento, mas também com medidas preventivas. Esta enfermidade é caracterizada como uma inflamação da glândula mamária, provocada por um complexo de agentes etiológicos, que promovem mudanças patológicas no tecido mamário, assim como alterações físicas e químicas no leite (Hogan et al. 1989, Harmon 1994, Ali et al. 2014 e Reshi et al. 2015).

As bactérias são a principal causa da mastite infecciosa e ambiental, em bovinos, caprinos e outras espécies, como exemplo de micro-organismos temos a *E.coli*, *Pseudomona aeruginosa*, os *Streptococcus* spp., as *Corynebacterium* spp., e a *Klebsiella* spp. (Sharma et al. 2012). O gênero *Staphylococcus* é um dos mais prevalentes agentes etiológicos causadores da mastite (Harmon, 1994, Sharma et al. 2012, Bergonier et al. 2014 e Ludberg et al. 2014). Assim como o *S. aureus* é um dos principais agentes causadores da mastite contagiosa e ambiental (Saidi et al. 2013).

A mastite pode ser uni ou bilateral, ou seja, acomete uma ou as duas metades mamárias, e pode ser caracterizada como clínica, de menor proporção no rebanho, ou subclínica, associado

ao maior número de casos, bem como aos maiores prejuízos (Mavrogianni et al. 2011 e Fragkou et al. 2014).

Deste modo é possível prevenir a mastite caprina, mantendo um processo de ordenha higiênica, evitando que outros animais circulem durante a segregação dos animais, e fazendo a manutenção dos utensílios ali presentes. Assim como, ter cuidado com o material empregado na filtração do leite, ter cuidado com a higiene do ordenhador, e dos locais de armazenamento do leite, e não menos importante, um dos principais pontos de prevenção é a limpeza da pele do teto, do úbere e do óstio.

Assim, as técnicas de higienização do teto demonstram-se como parte importante da produção leiteira. O *pré-dipping* é uma fase importante, diminuindo a microbiota presente na pele, e fazendo com que as chances de contaminação do leite e seus derivados possa não ocorrer. Um dos fatores de desenvolvimento de mastite a contaminação da parte externa e próxima ao óstio (Dingwell et al. 2003 e Langoni, 2013).

Mordmuang et al. (2015) discutem que o processo de mastite começa depois dos organismos passarem pelo canal do teto, e esta invasão do teto geralmente ocorre durante a ordenha. A utilização da desinfecção na pré e pós-ordenha são muito importantes, pois o cuidado com a higiene dos tetos e úbere são fatores essenciais no controle de mastite (Aiemsraad et al. 2011).

Neste caso, muitos produtos são indicados, desinfetantes que por vezes, já apresentam limitações quanto a sua atividade, e podem até deixar resíduos no leite. Sendo assim, a fitoterapia torna-se uma alternativa para o uso como desinfetante, devido as propriedades antibacterianas, anti-oxidantes e muitas outras, encontradas nas plantas medicinais e seus derivados.

Desta forma uma das plantas que está sendo estudada no semiárido nordestino é a *Hymenaea martiana*, conhecida como “jatobá”, que possui comprovada ação anti-inflamatória e demonstra atividade antimicrobiana frente a estirpes bacterianas, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, todos provenientes de produção leiteira (Araújo et al. 2013, Cipriano et al. 2014 e Peixoto et al. 2015). Com isto objetivou-se neste trabalho, avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana* Hayne como medida preventiva da mastite caprina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mastite Caprina: aspectos gerais

2.1.1. Etiologia e epidemiologia

A caprinocultura constitui uma importante atividade em todo o mundo, seja para produção de carne ou leite. De acordo com FAO (2006), a quantidade de caprinos no mundo é de quase 800 milhões de cabeças. O IBGE (2012) destaca que a região Nordeste tem cerca de 90% do efetivo caprino do país. O estado da Bahia possui em média três milhões de cabeças, seguida por Pernambuco com quase dois milhões e Piauí com quase um milhão e meio de animais, sendo as principais cidades produtoras: em Floresta (PE), Casa Nova (BA) e Petrolina (PE), 268.900, 163.236 e 135.800 respectivamente (IBGE, 2012).

A produção de leite destaca-se dentro do rebanho caprino mundial, sendo produzido em média 14 toneladas deste produto (FAO, 2006). O leite é um produto que tem seu consumo difundido e de importância regional, assim como, seus derivados estão sendo comercializados, gerando então uma forte alternativa de renda, e havendo com que a saúde destes animais seja um foco. Portanto os cuidados com as doenças devem ser prioridade, tendo visto que os produtos da cadeia leiteira não sejam afetados e os micro-organismos patogênicos cheguem ao consumidor (Antonio Filho et al. 2010).

Uma importante doença que acomete caprinos leiteiros é a mastite, que se apresenta como um processo inflamatório que ocorre na glândula mamária e pode ser causada por micro-organismos incluindo bactérias, vírus e fungos, assim como por traumas ou injúrias (Schmidt et al. 2009 e Marogna et al. 2010). Trata-se de uma enfermidade de difícil controle e com significativo impacto econômico e social, pois tem reflexo direto na produção do animal (Melo, 2012 e Almeida et al. 2013). Na maioria dos casos a mastite é decorrente da invasão da glândula mamária por bactérias através do óstio do teto (Mavrogianni et al. 2011).

A grande maioria das ocorrências é de mastite subclínica, em que sua prevalência é em média de 50% (Radostitis et al. 2007). Ribeiro et al. (2003) revelam que valores aceitáveis para mastite subclínica dentro de um rebanho são de 15%. Neste caso ocorrem alterações na composição do leite, com presença ou não de sinais da inflamação no úbere (Ribeiro et al. 2003 e Tyller e Cullor, 2006). Já na forma clínica da doença, que se apresenta em 5% dos casos, há sinais evidentes de edema, aumento da temperatura, enrijecimento da glândula

mamária e dor, além da presença de grumos e liberação de exsudatos serosos ou sanguinolentos (Fonseca e Santos, 2000, Ribeiro et al. 2003 e Tyller e Cullor, 2006)

Assim, a ocorrência desta enfermidade pode ter várias origens, destacando a contaminação bacteriana, como fator de principal atenção (Langoni et al. 2006). Neste caso, vários agentes podem causar a mastite, como os *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Micrococcus* spp., *Pasteurella* spp., *Mycoplasma* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, fungos, algas, protozoários e até vírus (Bergonier et al. 2003, Langoni et al. 2006 e Peixoto et al. 2009).

Jamali et al. (2015) discutem investigações feitas acerca das espécies de bactérias presentes em leites e derivados. Jorgensen et al. (2005), afirmam que os *S. aureus* foram isolados em cerca de 75% da população de bovinos estudada, enquanto que das amostras de leite caprino, 96% possuíam o agente. Os estafilococos obtiveram proporção, sendo então considerados como importantes causadores da mastite caprina (Cremonesi et al. 2007).

2.1.2. Mastite caprina causada por *Staphylococcus* spp.

Os estafilococos estão presentes na pele e mucosas de animais, e podem ser isolados também do ambiente, solo e de materiais utilizados por seres humanos (Seo et al. 2008). São cocos gram-positivos, possuem forma esférica, não apresentam esporos, e agrupam-se em cachos, sendo também imóveis, podem ser anaeróbios facultativos e tem tolerância até 10% de cloreto de sódio (Koneman et al. 2008). Podem ser coagulase positivo (SCP) ou negativo (SCN) e são agentes etiológicos comuns da mastite caprina (Quinn et al. 1994 e Jamali et al. 2015).

De acordo com Yamamoto et al. (2010), o *S. aureus* colonizam a mucosa nasal de aproximadamente 30% dos indivíduos. São bactérias mesófilas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 47,8°C, no entanto, as enterotoxinas estafilocócicas são produzidas entre 10°C e 46°C, sendo altas, variado entre 40°C e 45°C.

Os extremos de temperatura estão na dependência dos demais parâmetros que devem se encontrar em condições ótimas (Subcomitê de taxonomia dos *Staphylococcus* e *Micrococcus*, 1965.). Ou seja, o que aumenta as chances de que estes indivíduos se desenvolvam em variadas condições. De acordo com Correa et al. (2010) a identificação dos agentes de mastite bem como dos fatores predisponentes e determinantes desta enfermidade se fazem necessários para seu controle, nos animais de produção leiteira.

Neste caso, quando se fala de estafilococos causadores de mastite, o *S. aureus* é amplamente citado (Seo et al. 2008, Yamamoto et al. 2010, Dal Pozzo et al. 2011, Cavalcante et al. 2013, Silanikove et al. 2014 e Peixoto et al. 2015), porém outros estudos tem demonstrando a ocorrência de SCN também em casos de mastite subclínica (White e Hinckley, 1999 e Schmidt et al. 2009).

Welborn (1994) e Wendt et al. (1994), já citavam os estafilococos no ciclo da mastite, assim como Radostits et al. (2002), retravam o *Staphylococcus* spp. como principais causadores da mastite caprina. Diante do exposto, Freitas et al. (2004) colocam em destaque a importância de se ter atenção na mastite causada por *Staphylococcus* spp., pois estes produzem enterotoxinas, que causam danos ao tecido mamário e aos consumidores. A maioria dos casos de mastite subclínica ocorre em caprinos, sendo que os mesmos patógenos encontrados nos rebanhos bovinos, também são encontrados nos pequenos ruminantes (Silanikove et al. 2014).

Os *Staphylococcus* spp. são gênero bacteriano mais frequentemente isolados em infecções intramamárias em caprinos e que podem ser responsáveis por mais de 90% de todas as espécies de bactérias identificadas nesta doença (Hall e Rycroft, 2007 e Leitner et al. 2007). O *S. aureus*, um dos mais importantes agentes causadores de mastite é bastante encontrado, podendo variar de 4% até 40% dos casos (Moroni et al. 2005). Peixoto et al. (2010) isolaram cerca de 29,9% de isolados do gênero em questão, os quais destes 16,9% eram *S. aureus*. Já Cavalcante et al. (2013) encontraram cerca de 90,3% de isolados como sendo estafilococos.

2.2 Resistência aos antimicrobianos, desinfetantes e produção de biofilme

A mastite é uma doença infecciosa e que possui muitos agentes causadores, dentre eles os estafilococos. Na prevenção da contaminação ambiental, estão situações básicas de manejo, neste caso, quando este ponto é deficiente na produção animal, predispõe os animais às doenças (Prestes et al. 2002). Na linha da ordenha, os princípios que orientam um correto manejo desta, incluem, procedimentos de desinfecção dos tetos antes da ordenha, estimulação da ejeção e extração higiênica do leite. Quando utilizados em conjunto, estes procedimentos constituem a estratégia mais eficiente na prevenção da transmissão dos agentes contagiosos e, em menor escala, de agentes ambientais no momento da ordenha (Fonseca e Santos, 2000).

Estas ações não previnem somente a transmissão, elas também tendem a evitar a formação de biofilme. De acordo com Malheiros et al. (2010) a organização das bactérias em variadas superfícies, denomina-se biofilme. É considerada uma matriz polimérica, produzida

pelos micro-organismos e aderidas às superfícies bióticas ou abióticas (Costerton et al. 1999). A formação de biofilme acontece quando as células bacterianas se fixam numa superfície e produzem substâncias viscosas, que servem como âncoras celulares (Seo et al. 2008), representando um grande problema quando se trata de desinfecção e prevenção de doenças. François et al. (1996) e Donlan et al. (2001), já retratavam que os biofilmes podem se formar em uma ampla variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos, habitando em dispositivos/materiais médicos, tubulação do sistema de água potável ou industrial, ou sistemas aquáticos naturais.

O biofilme ou “slime” é uma importante forma de defesa das bactérias patogênicas, destacando-se como notável fator de virulência destes indivíduos (Futagawa-Saito et al. 2006 e Lee, et al. 2014). Os *Staphylococcus* spp. se adaptam a várias superfícies e temperaturas, principalmente o *S. aureus*, formando biofilme e gerando processos de contaminação secundária, por contato com o material ou com o ambiente em que se encontram (Ciccio et al. 2015). Entre as espécies existentes de *Staphylococcus* spp., os *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* são os que possuem o maior potencial, diversidade e patogenicidade, e os *S. aureus* estão entre os patógenos gram positivos clinicamente mais significativos (McKenny et al. 1998, Martineau et al. 2000, Gotz, 2002 e Jager et al. 2005).

A formação de biofilme contribui para patogênese bacteriana em uma série de condições, como infecções na pele, infecções das vias aéreas recorrentes, osteomielite e mastite (Brady et al. 2006, Psaltis et al. 2007, Tu Quoc et al. 2007 e Kania et al. 2008). Os biofilmes são vistos como reservatórios ambientais para agentes patogênicos, determinando proteção, um ambiente de crescimento e proliferação, indicando vantagens frente a adversidades que possam ocorrer em determinado meio. Esta defesa microbiana, ocorre também devido a genes já identificados, o genes *ica*, que possui os locus A, B, C e D, sendo o *icaA* e *icaD*, mais comumente encontrado nas estirpes de *Staphylococcus* spp (Tu Quoc et al. 2007 e Kania et al. 2008).

Assim como, os resíduos de produtos desinfetantes e antibióticos acumulam-se no leite e seus derivados, afetando negativamente o ambiente, a saúde animal, a saúde humana, refletindo fortemente na economia e na saúde pública (Hameed et al. 2006). O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva de uso de drogas bactericidas no futuro é incerta (Vargas et al. 2004). Sabe-se que a utilização de antibióticos e sanitizantes ainda é o principal método de controle de doenças bacterianas em rebanhos, e sua utilização

indiscriminada pode aumentar a resistência aos fármacos em muitos micro-organismos (Rola et al. 2015).

As bactérias apresentam uma versatilidade enorme para adquirir resistência, devido à expansão de seus mecanismos de ação, e que cada vez mais se tem buscado métodos eficientes para o diagnóstico e entendimento destes mecanismos. Em prol de utilizar o produto bactericida adequado, os laboratórios têm investido em pesquisas de ponta, com alta qualidade, em busca de um resultado eficaz e não prejudicial (Baughman, 2002).

Um dos agentes que necessita de mais atenção são os micro-organismos do gênero *Staphylococcus*. As espécies de *Staphylococcus* spp. resistentes a antimicrobianos representam um problema cosmopolita, sendo o controle de sua disseminação um importante desafio (Coelho et al. 2007). Assim, a vigilância dos padrões de sensibilidade aos antimicrobianos principalmente do *S. aureus* é de grande importância para a compreensão das tendências crescentes de desenvolvimento da resistência (Colli et al. 2009).

Sabe-se que este agente encontra-se na pele e mucosas, e está presente também no ambiente dos ruminantes, sendo frequentemente associado com as mastites clínica ou subclínica, havendo a contaminação dos produtos lácteos (Thoria et al. 2011). Esta bactéria é considerada como o principal agente patogénico mais frequentemente ocorrendo da glândula mamária de vaca, cabras e ovelhas (Chaffer et al. 2003, Peixoto et al. 2009 e Fragkou et al. 2014). É fato que os *S. aureus* existem extracelularmente ou intracelularmente dentro da glândula mamária caprina (Thoria et al. 2011). Seu desenvolvimento está intimamente ligado a sobrevivência ao substrato em que se encontra neste caso, possui mecanismos de defesas que foram adquiridos com o tempo e fazem parte de seu genótipo. Para os *S. aureus* existem os genes *mecA* e *mecC* relacionados a resistência aos β -lactâmicos e estes são comumente encontrados (Blair et al. 2015).

Assim como relatou Wu et al. (1996), que os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* tem seu gene *mecA* de fonte desconhecida quando se trata da medicina veterinária, embora em humanos tenha evidências que este gene tenha vindo do *Staphylococcus sciuri* (SCN), e que em determinado momento ocorreu transferência horizontal para o *S. aureus*. Mas não somente o gene *mec* codifica resistência, o gene *blaZ*, também se destaca, desencadeando uma inativação enzimática do fármaco pela enzima β -

lactamase, desta forma, conferindo ao agente patológico em questão um potencial de resistência (Fuda et al. 2005).

A presença do gene *blaZ* tem sido bem relatada em *Staphylococcus* spp. de bovinos e de cães e gatos (Malik et al. 2007 e Asfour e Darwish, 2011). Porém não somente a presença do gene, mas outras características devem ser observadas, quando se fala de um agente que afeta humanos e animais. As cepas descritas como *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (MRSA), podem apresentar resistência a um ou mais produtos farmacêuticos, representando uma ameaça a saúde pública (Spanu et al. 2012). É um patógeno que pode causar infecções em várias espécies, e de grande importância na medicina humana (Febler et al. 2010).

A cepa MRSA encontrada nos animais, cabras, vacas, parecem agir de maneira similar, porém, o fato de MRSA ser encontrada nos animais é preocupante, pois tem um reflexo na saúde pública (Kefee, 2012). Este tipo de cepa tem sido relatado como um agente com potencial zoonótico, indicando que várias espécies animais como cães, gatos, bovinos, caprinos, podem servir como reservatórios do micro-organismo refletindo na saúde pública (Pantosti, 2012). Pesquisas sobre mastite em ruminantes encontraram cepas MRSA circulantes nos rebanhos. (Vanderhaeghen et al. 2010, Gindonis et al. 2013 e Van Duijkeren et al. 2014), fator preocupante para os seres humanos, já que por vários modos, estes micro-organismos podem estar presentes nos alimentos, sendo então um fator de ameaça a vida.

Assim, o *S. aureus*, um dos principais agentes causadores da mastite caprina, tem uma vasta gama de fatores de virulência, o que pode ajudar a superar as defesas imunológicas do hospedeiro e aumentar a gravidade de infecções (Kim et al. 2012 e Zeconi e Scali, 2013). Deste modo a prevenção, nas propriedades torna-se um processo chave na produção leiteira e diminuição das doenças infecciosas e segurança tanto do animal quanto do homem.

2.3. Métodos de prevenção da mastite caprina

A prevenção das doenças é parte crucial dentro da produção animal, neste caso, evita-se que ocorram perdas econômicas e prejuízos a saúde animal. Rollin e Dhuyvetterb (2015) discutem que o planejamento do produtor diante de métodos preventivos reforça esta idéia. Frente a bactérias como o *S. aureus* a vacinação é uma alternativa de prevenção da mastite causada por estafilococos (Scali et al. 2015).

Para diminuir as taxas de mastite subclínica, sugere-se que sejam aplicadas medidas de sanitização rigorosas objetivando melhorar a qualidade do leite e, assim, incrementar a produção leiteira nos rebanhos. Desta forma devem-se estabelecer medidas de manejo que possam refletir positivamente para o animal e para o produtor, prevenindo as mastites subclínica e a clínica (Silanikove et al. 2014).

Neste caso, a higiene pré-ordenha do úbere é essencial para a produção de leite de alta qualidade, pois a presença de sedimentos é minimizada e a incidência da mastite é reduzida pela diminuição na contagem bacteriana na pele do teto (Vlieghe et al. 2012 e Cardozo et al. 2015). Isso demonstra a importância dos procedimentos de higiene adequados em cada ordenha (Pankey, 1989 e Goetsch et al. 2011).

Em vacas leiteiras, o *pré-dipping* é eficaz na redução da carga bacteriana, sendo uma ferramenta utilizada para reduzir a incidência da mastite ambiental causada por patógenos (Galton et al. 1988 e Skrzypek et al. 2004). Assim, a prevenção é a chave para controlar a mastite causada por *Staphylococcus* spp. (Leitner et al. 2004 e Langoni, 2013). As técnicas pré-ordenha de desinfecção demonstram-se com capacidade para atingir o objetivo de evitar a contaminação por agentes causadores da mastite, diminuindo ou evitando prejuízos aos produtores (Koop et al. 2012).

2.3.1. Uso do *pré-dipping* na linha de ordenha

Micro-organismos causadores da mastite, como *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli*, são transmitidos principalmente pelas mãos dos ordenhadores e equipamentos de ordenha (Ceballos-Marquez et al. 2013). O número de infecções podem ser reduzidas significativamente através da desinfecção dos equipamentos de ordenha e antissepsia dos tetos dos animais e das mãos dos ordenhadores (Miguel et al. 2012), neste caso a ordenha deve ser realizada em condições higiênicas adequadas, assim como também em um ambiente apropriado.

Diversos autores têm estudado as formas de preparação do úbere antes da ordenha, demonstrando os efeitos benéficos de práticas sanitizantes na redução da contaminação dos tetos e do leite (Galton et al. 1988, Brito et al. 2000 e Ceballos-Marquez et al. 2013). Uma diminuição na carga bacteriana na pele do teto pré-ordenha pode ser obtida quando os tetos são mergulhados com um desinfetante por 30 segundos (Ceballos-Marquez et al. 2013).

O *National Mastitis Council* (NMC, 1999), discute a importância do *pré-dipping*, como fator de prevenção de novos casos de infecções intramamárias. A principal função do *pré-dipping* é a desinfecção dos tetos antes da ordenha, visando diminuir a quantidade de micro-organismos presentes nos tetos, evitando assim uma maior contaminação e reduzindo a taxa de novas infecções (Ramalho et al. 2012). Sua utilização, então, é um processo essencial na produção leiteira (NMC, 1999; Ramalho et al. 2012).

Os cuidados com a integridade da pele do teto constituem etapa importante no controle e profilaxia, pois lesões podem abrigar bactérias como *S. aureus* e espécies de *Streptococcus* que podem causar a mastite (Amaro et al. 2011). Além do monitoramento, técnicas preventivas que atuam na qualidade global do leite vêm se mostrando satisfatórias (Amaro et al. 2011). As boas práticas de ordenha, com procedimentos conhecidos como ordenha higiênica, reduzem o impacto da contaminação principalmente nas etapas de manipulação e distribuição do leite (Gottardi et al. 2008 e Dimech et al. 2013). Dessa forma, deve-se entender que na obtenção do leite cru, os principais pontos de contaminação microbiana considerados são o interior da glândula mamária, o exterior do úbere e do teto e os equipamentos utilizados para ordenha e armazenamento (Yamazi et al. 2010).

Muitos produtos podem ser utilizados no *pré-dipping*, de acordo com o *Nacional Mastitis Council* (NMC, 1999). Desinfetantes a base de iodo, ou que contenham clorexidina, ácido sulfônico, cloro, peróxidos, lauricidina, ácido cloroso e ácido láctico (Medeiros et al. 2009 e Ramalho et al. 2012), produtos estes que podem gerar resíduos para o leite, indicando uma falsa adulteração do produto. Bons desinfetantes devem ter eficácia contra os principais patógenos encontrados nas mastites, devem ser econômicos, fáceis de aplicar, e devem manter ou promover boas condições de higiene (Sartori et al. 2012).

A higienização antes da ordenha é fator importante na produção leiteira e a utilização de produtos comerciais pode acarretar a resistência dos micro-organismos, ou sujidades que impeçam sua ação. Assim, os fitoterápicos mostram-se capazes de serem produtos alternativos na produção animal (Dimech et al. 2013).

O *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e outros patógenos são primariamente encontrados no interior e/ou na superfície do teto e do úbere (Cardozo et al. 2015). Estes microrganismos podem ser transferidos da superfície das teteiras para os tetos da próxima vaca ordenhada. Isso ocorre porque na extremidade do teto há um filme de leite capaz de dar

suporte ao crescimento bacteriano (Nascif Junior, 2005 e Dimech et al. 2013). Se essas bactérias não forem destruídas prontamente, podem representar risco de infecção intramamária (Nascif Junior, 2005).

2.4. Produtos fitoterápicos na produção animal

As doenças infecciosas continuam a representar um importante desafio para a saúde pública, tanto nos países desenvolvidos, quanto nos em desenvolvimento (Bell et al. 2013). O uso indiscriminado desses produtos pode contribuir para o estabelecimento de infecções persistentes, o que é um fator limitante no tratamento de mastite (Faccin, 2013).

Plantas medicinais são caracterizadas a medida que um ou mais de seus órgãos (folha, casca, frutos, dentre outros) possuam substâncias ativas que atuem com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos (OMS, 1998). O Fitoterápico, de acordo com a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2011), é "todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário." A fitoterapia é então caracterizada pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (Cipriano et al. 2014).

As informações úteis sobre as plantas medicinais ainda são passadas de uma geração para outra por meio de comunicação oral, podendo se perder algum conhecimento no decorrer do tempo (Maregesi et al. 2007). Sendo importante a documentação e identificação destes produtos e práticas medicinais, com o intuito de preservação da memória medicinal do País (Maregesi et al. 2007). Desta forma a utilização das plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades étnicas (Calderon et al. 2009). Como exemplo os indígenas, que utilizam estes produtos como remédio para suas doenças e como veneno em suas guerras e caças (Carvalho, 2004).

As plantas têm desempenhado um papel vital no tratamento de doenças durante séculos (Sala-Cirtog et al. 2015). Podem ser utilizadas em várias funções terapêuticas como antiparasitário, cicatrizante, antimicrobiano, repelente, antitérmico, antiinflamatório, anti-diarréico, anti-emético e antiespasmódico (Mendonça et al. 2014).

Os produtos naturais derivados de plantas medicinais têm provado ser uma fonte abundante de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais têm sido a base para o

desenvolvimento de novas substâncias químicas e de produtos farmacêuticos. Estas plantas já estão sendo introduzidas nas propriedades agrícolas, como alternativa para o controle de pragas e parasitas, uma vez que em sua maioria são biodegradáveis e de baixa ou nenhuma toxicidade (Palombo, 2009 e Corrêa e Salgado, 2011).

A maioria dos estudos sobre a atividade antimicrobiana de extratos de plantas têm sido restritas a análise da sua atividade bacteriostática e propriedades bactericidas *in vitro* (Peixoto et al. 2009, Marino et al. 2010, Lima et al. 2012 e Mendonça et al. 2014). Demonstrando a importância para a substituição de produtos farmacêuticos e assim a diminuição do processo de resistência. Na Etiópia, os remédios à base de plantas ainda são os mais importantes e, por vezes, as únicas fontes de terapias para quase 80% da população de humanos e mais de 90% da população de bovinos (Kalayou et al. 2012). Os mesmos autores avaliaram a utilização de plantas medicinais no combate a mastite e observaram atividade antimicrobiana de várias espécies presentes no país.

Plantas medicinais e aromáticas são conhecidas por possuírem atividade antibacteriana contra diferentes agentes patogênicos. Baskaran et al. (2009) e Mubarack et al. (2011) já relatavam tratamentos alternativos para a mastite em bovinos, já Schiavon (2011), discute em seu trabalho o uso de fitoterápicos para prevenção de mastite no rebanho bovino.

Em relação a mastite caprina, Peixoto et al. (2009) e Pozzo et al. (2011) já relataram a utilização de fitoterápicos nesta patologia. Assim a fitoterapia é um método racional e alopático, baseado em evidências científicas, empregado no tratamento médico de várias patologias e que possui efeitos satisfatórios e na maioria das vezes sem efeitos colaterais (Schulz et al. 2001, Sousa, 2008 e Lima et al. 2012).

O maior desafio na utilização de extratos vegetais tem sido a identificação e o estabelecimento dos efeitos exercidos pelos compostos ativos presentes nessas plantas sobre o organismos animais, e não somente isto, de que forma realmente agem (Rizzo et al. 2010, Peixoto et al. 2015 e Silva et al. 2012). Os fitoterápicos são comumente utilizados pela população nos tratamentos de diversas enfermidades, possuem boa aceitação, o baixo custo no preparo e na aquisição são os principais motivos do sucesso dos fitoterápicos (Cipriano et al. 2014).

2.4.1. *Hymenaea* spp. e seu potencial antimicrobiano

O gênero *Hymenaea* (Caesalpinioideae) é predominante em clima neotropical com 16 espécies distribuídas a partir da América Central para América do Sul e no litoral leste da África, 13 das espécies estão presentes no Brasil (Maranhão et al. 2013). Entretanto Ribeiro (2010) relata que existem apenas 12 espécies no país, alguns exemplos são a *Hymenaea aurea*, *H. courbaril*, *H. intermedia*, *H. maranhensis*, *H. martiana* e *H. stigonocarpa*. As espécies do gênero *Hymenaea* ocorrem na Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica e Pantanal (Ribeiro, 2010).

As plantas de *Hymenaea*, popularmente conhecidas como “jatobás”, são árvores de troncos retos e cilíndricos, de súber liso e de coloração cinza, suas folhas são compostas, bifolioladas, de filotaxia alterna com estipulas e pecíolo livre do lado interno, a floração e a frutificação têm início entre oito e doze anos de idade da planta, e não são necessariamente anuais (Cipriano et al. 2014). Paes et al. (2005) relatam que as espécies desse gênero tem elevado valor econômico, devido à alta resistência ao ataque de insetos e fungos que costumam destruir a madeira.

A madeira desta planta tem excelente qualidade e é usada na construção naval e civil (Rizzini, 1971 e Ramos et al. 2007). As plantas desse gênero têm uma grande capacidade de se adaptar em diferentes cenários com características edafoclimáticas, pois são pouco exigentes quanto a fertilidade e umidade do solo (Melo e Mendes, 2005). Além de ser uma planta de utilização ampla em atividades manuais, os exemplares do gênero *Hymenaea* têm seu potencial medicinal (Agra et al. 2007).

A *Hymenaea stigonocarpa*, também conhecida pelo seu nome comum jatobá-do-cerrado, é uma espécie endêmica do cerrado e economicamente uma árvore valiosa, que do seu cerne foram isolados quatro grupos de flavonóides e produtos de atividade antitérmica (Oliveira et al. 2010 e Santana et al. 2010).

Assim, as plantas do gênero *Hymenaea* são utilizadas no tratamento de processos inflamatórios e infecções bacterianas (Agra et al. 2007). Sá et al. (2011) ao realizarem ensaios de atividade antimicrobiana com uma variada gama de espécimes de plantas da caatinga, destaca que houve atividade de seus extratos etanólicos brutos diante do desafio em bactérias gram positivas e gram negativas, confluindo com as possibilidades descritas por Agra et al. (2007). Além disto, os melhores resultados em trabalhos destacam que uma das partes da

planta, onde os metabólitos estão mais concentrados é a casca do caule (Fernandes et al. 2005), metabólitos como os compostos fenólicos, terpenos e flavonóides (Figura 1).

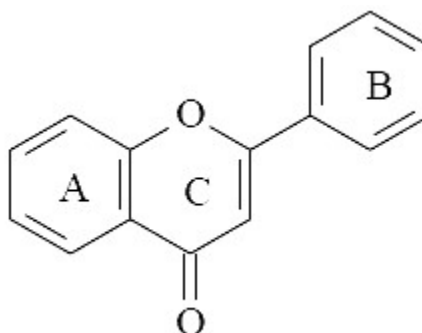


Figura 1. Estrutura básica dos flavonóides. Fonte: Ássimos (2014)

Na *H. stagnocarpa* a presença de amidos, açúcares, terpenos e taninos no súber desta planta e terpenos em suas folhas (Pinto et al. 2000 e Lorenzi e Matos, 2002). Observou-se também a presença de flavonóides e ácido oleanólico na *H. coubaril* (Rossi, 2008, Bezerra, 2013 e Cipriano et al. 2014)

O gênero *Hymenaea*, estudado neste trabalho já demonstrou atividade antifúngica e antimicrobiana. Souza et al. (2009) avaliando extratos e frações hidroalcoólicas de *H. martiana* sobre fungos do gênero *Cryptococcus* e sobre dermatófitos. Como constituintes da casca da *H. martiana* Hayne, presentes no quadro 1, produtos os derivados antracênicos, as naftoquinonas e os flavonóides que se apresentam como produtos de composição dominante na planta, e a *H. martiana* tem então atividade antimicrobiana (Braga et al. 2007, Zampini et al. 2009 e Peixoto et al. 2015).

Classes de Metabólitos	EEB
Derivados Antracênicos	+++
Flavonóides	++
Lignanas	+
Mono e diterpenos	+
Naftoquinonas	+++
Triterpenos/Esteróides	+

Quadro 1. Triagem fitoquímica do EEB da casca da *H. martiana*.

EEB - extrato etanólico bruto, +++ Forte presença, ++ Moderada presença e + Fraca presença. Fonte: Adaptado de Peixoto et al. (2015)

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana da *Hymenaea martiana* Hayne como medida preventiva da mastite caprina.

3.2 Específicos

- Realizar a caracterização fitoquímica do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana* Hayne (Jatobá);
- Avaliar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico bruto de *Hymenaea martiana* Hayne (Jatobá) frente a cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite caprino provenientes de propriedades rurais do semiárido pernambucano;
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) *in vitro* do extrato etanólico bruto de *Hymenaea martiana* Hayne (Jatobá) sobre cepas de *Staphylococcus* spp. com presença ou ausência do gene *blaZ*;
- Avaliar o efeito *in vivo* do extrato etanólico bruto da folha de *H. martiana* Hayne como desinfetante pré-ordenha de cabras leiteiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. (2007) Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacog.*, 17: p. 114-140.
- AIEMSAARD, J.; AIUMLAMAI, S.; AROMDEE, C.; TAWEECHAISUPAPONG, S.; KHUNKITTI, W. (2011) The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* dmst 4745. *Res. In Veterinary Sci.*, 91, p.E31–E37
- ALI, T.; RAHMAN, A.; QURESHI, M. S.; HUSSAIN, M. T.; KHAN, M. S.; UDDIN, S.; IQBAL, M.; HAN, B. (2014) Effect of management practices and animal age on incidence of mastitis in *Nili ravi* buffaloes. *Trop. Anim. Health Prod.*, 46, p.1279-1285.
- ALMEIDA, J.F.; AQUINO, M.H.C.; MAGALHÃES, H.; NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A.; FERREIRA, T.; BARRETO, M.L. (2013) Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de minas gerais e rio de janeiro. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, .80, 1, p.13-18.
- AMARO, L.P.A.; MACIEL, M. V.; LUCENA, J. A.; LIMA JUNIOR, D.M.; SOMBRA, S.S. (2011) Utilização do extrato aquoso da babosa (*Aloe vera*) no manejo higiênico de ordenha em cabras. *Agropec. Científ. No Semi-Árido*, v.7, 1, p.06-10.
- ANTONIO FILHO, N.; CARLOS JÚNIOR, A. F.; YAMAMOTO, A. (2010) Mercado de carne, leite e pele de caprinos e ovinos no nordeste. 27. Ed. Fortaleza: Banco Do Nordeste Do Brasil, 2010. 128p.
- ANVISA- Agência Nacional De Vigilância Sanitária. (2011) Fitoterápicos. Disponível em: <[Http://Portal.Anvisa.Gov.Br/Wps/Wcm/Connect/9b3b5b80482293e390d7b5bdc15bfe28/Notificacao%C3%A7%C3%A3o+De+Ptf.Pdf?Mod=Ajperes](http://Portal.Anvisa.Gov.Br/Wps/Wcm/Connect/9b3b5b80482293e390d7b5bdc15bfe28/Notificacao%C3%A7%C3%A3o+De+Ptf.Pdf?Mod=Ajperes)> Acesso em: 13 Nov. 2015.
- ARAÚJO, R.M.P.; PEIXOTO, R.M.; LIDIANI, K.C.F.; COSTA, M.M. (2013) Genotipificação de isolados de *staphylococcus epidermidis* provenientes de casos de mastite caprina. *Ciência Rural*, v.43, 2, p.322-325.
- ASFOUR, H.A.E.; DARWISH, S.F. (2011) Phenotypic and genotypic detection of both mecA and blaZ-genes mediated b-lactam resistance in staphylococcus strains isolated from bovine mastitis. *Glob Vet.*, 6, p.39–50.
- ÁSSIMOS, A. A. (2014) Avaliação da concentração e dos tipos de flavonóides na própolis utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- BASKARAN, S.A.; KAZMER, G.W.; HINCKLEY, L.; ANDREW, S.M.; VENKITANARAYANAN, K. (2009) Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. *J Dairy Sci.*, 92:p.1423–9.
- BAUGHMAN, R. P. (2002) Antibiotic resistance in the intensive care unit. *Current Opinion in Critical Care*, v. 8, 5, p. 430-434.

BELL, I.R.; SCWARTZ, G.E.; BOYER, N.N.; KOITHAN, M.; BROOKS, A.J. (2013) Advances in integrative nanomedicine for improving infectious disease treatment in public health. *European Journal of Integrative Medicine*. 5, p.126–140.

BERGONIER, D.; DE CRÉMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFOUL, G.; BERTHELOT, X. (2003) Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.*, 34, p.689–716.

BERGONIER, D.; SOBRAL, D.; FEBLER, A. T.; JACQUET, E.; GILBERT, F. B.; SCHWARZ, S.; TREILLES, M.; BOULOC, P.; POURCEL, C.; VERGNAUD, G. (2014) *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (mlva). *Veterinary Research*, 45 (97).

BEZERRA, G.P. (2013) Estudo farmacológico bioquímico guiado pela atividade miorelaxante do extrato etanólico das cascas e do caula da *Hymenaea coubaril* L. (jatobá). Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de pós graduação em ciências farmacêuticas da Universidade federal do ceara, Fortaleza.

BLAIR, J.M.A.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L.J.V. (2014) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiology*, 13 (1), p. 42-51.

BRADY, A.; LOUGHLIN, R.; GILPIN, D.; KEARNEY, P.; TUNNEY, M. (2006) In Vitro Activity Of Tea-Tree Oil Against Clinical Skin Isolates Of Meticillin-Resistant And -Sensitive *Staphylococcus Aureus* And Coagulase-Negative *Staphylococci* Growing Planktonically And As Biofilms. *J Med Microbiol.*, 55: p.1375–1380.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.; FABRI, R.L.; DE O MATOS, M.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. (2007) Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, 2, p.396–402.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P; VERNEQUEZ, B.R.S. (2000) Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. *Rev. Univ. Fed. Santa Maria*, V.30, N.5.

CALDERON, L.A.; SILVA-JARDIM, I.; AVAN ZULIANI, J.; SILVA, A.A.; CIANCAGLINI, P.; SILVA, L.H.; STÁBELI, R.G. (2009) Amazonian biodiversity: a view of drug development for leishmaniasis and malaria. *J. Braz. Chem. Soc.* v. 20, 6, p. 1001-1023.

CARDOZO, L.L.; THALER NETO, A.; SOUZA, G.N.; PICININ, L.C.A.; FELIPUS, N.C.; RECHE, N.L.M.; SCHMIDT, F.A.; WERNCKE, D.; SIMON, E.E. (2015) Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. *Journal Of Dairy Science* Volume 98, Issue 11, p.7675–7685.

CARVALHO, J.C.T. (2004) Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd. 480 p.

CAVALCANTE, M.P.; ALZAMORA FILHO, F.; ALMEIDA, M.G.A.R.; SILVA, N.S.; BARROS, C.G.G.; SILVA, M.C.A. (2013) Bactérias envolvidas nas mastites subclínicas de cabra da região de Salvador, Bahia. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.80, 1, p.19-26.

- CEBALLOS-MARQUEZ, A.; HEMLING, T.; RAUCH, B.J.; LOPEZ-BENAVIDES, M.; SCHUKKEN, Y.H. (2013) Noninferiority trial on the efficacy of premilking teat disinfectant against naturally occurring new intramammary infections using a novel 2-step diagnostic process. *Journal of Dairy Science*. v.96, 12.
- CHAFFER, M.; LEITNER, G.; ZAMIR, S.; WINKLER, M.; Glickman, A.; ZIV, N.; SARAN, A. (2003) Efficacy of dry-off treatment in sheep. *Small Rumin Res.*, 47, p.11–6.
- CICCIO, P.D.; VERGARA, A.; FESTINO, A.R.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. (2015) Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control*. v. 50, p.930-936.
- CIPRIANO, J.; MARTINS, L.; DEUS, M. S. M.; PERON, A. P. (2014) O Gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes do ponto de vista econômico e medicinal para o Brasil. *Caderno De Pesquisa. Série Biologia*, 26 (2), p.41-51.
- COELHO, M.L.V.; NASCIMENTO, J.S.; FAGUNDES, C.P.; MADUREIRA, D.J.; OLIVEIRA, S.S.; BRITO, M.A.V.P.; BASTOS, M.C.F. (2007) Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. *Research In Microbiology*, 158, p.625-630.
- COLLI, V.C.; PIZZOLITTO, A.C.; RADDI, M.S.G. (2009) Determinação da resistência de *Staphylococcus aureus*: um desafio? *Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 30 (1), p.115-118
- CORREA, C.M.; MICHAELSEN, R.; RIBEIRO, M.E.R.; PINTO, A.T.; ZANELA, M.B.; SCHMIDT, V. (2010) Composição do leite e diagnóstico de mastite em caprinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 38(3), p.273-278.
- CORREA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. (2011) Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. *Rev. Bras. de Plantas Medicinai*s, Botucatu, v.13, p.500-506.
- COSTERTON, J. W.; STEWART PHILIP, S.; GREENBERG, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*,v. 284, p. 1318-1322.
- CREMONESI, P.; PEREZ, G.; PISONI, G.; MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; CASTIGLIONI, B. (2007) Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, p.586–591.
- DIMECH, G.S.; SOARES, L.A.L.; FERREIRA, M.A.; OLIVEIRA, A.G.V.; CARVALHO, M.C.; XIMENES, E.A. (2013) Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* mart. ex hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. *Scientific World Journal*. p.1-8.
- DINGWELL R., LESLIE K., SCHUKKEN Y., SARGEANT J., TIMMS L. (2003) Evaluation of the california mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. *CanadianVeterinaryJournal*, 44, p.413– 415.
- DONLAN, R.M.; MURGA, R.; BELL, M.; TOSCANO, C.M.; CARR, J.H.; NOVICKI, T.J. ZUCKERMAN, C.; COREY, L.C.; MILLER, J.M. (2001) Protocol for detection of biofilms on needleless connectors attached to central venous catheters. *J. Clin. Microbiol.* 39 (2), p.750-753.

- FACCIN, A. (2013). Atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo* de *Schinus terebinthifolius* raddi no controle da mastite bovina. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 69p.
- FAO- Food and agriculture organization of the united nations. (2006) Acesso Em : 12 de nov. 2015. Disponível Em: <[Http://Www.Fao.Org/Docrep/009/A0800e/A0800e00.Htm](http://Www.Fao.Org/Docrep/009/A0800e/A0800e00.Htm) Rome, 2006>.
- FEBLER, A.; SCOTT, C.; KADLEC, K.; EHRICHT, R.; MONECKE, S.; SCHWARZ, S. (2010) Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, 4, p. 619-625.
- FERNANDES, T.T.; SANTOS, A.T.F.; PIMENTA, F.C. (2005) Atividade antimicrobiana das plantas – *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia* Rev. Patol. Trop. 34, p. 113–122.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. (2000) Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
- FRAGKOU, I.A.; BOSCOS, C.M.; FTHENAKIS, G.C. (2014) Diagnosis of clinical or subclinical mastitis in ewes. *Small Ruminant Research*. 118, p.86–92.
- FRANCOIS, P.; VAUDAUX, P.; FOSTER, T.J.; LEW, D.P. (1996) Host-bacteria interactions in foreign infections. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 17, p.514–520.
- FREITAS, M.F.L.; LEAL, T.C.B.; MOTA, R.A.; STAMFORD, T.L.M. (2004) Exotoxinas estafilocócicas. *Ciênc. Vet. Tróp.* 7(2/3), p.63-74.
- FUDA, C.C.; FISHER, J.F.; MOBASHERY, S. (2005) Beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62, p.2617–2633.
- FUTAGAWA-SAITO, K.; BA-THEIN, W.; SAKURAI, N.; FUKUYASU, T. (2006) Prevalence of virulence factor in *Staphylococcus Intermedius* isolates from dogs and pigeons. *Bmc Vet. Res.* 26, p.2-4.
- GALTON, D.M.; PETERSON, L.G.; MERRILL, W.G. (1988) Evaluation of udder preparations on intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 71, p.1417–1421
- GINDONIS, V.; TAPONEN, S.; MYLLYNIEMI, A.-L.; PYORALA, S.; NYKASENOJA, S.; SALMENLINNA, S.; RANTALA, M. (2013) Occurrence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococci* from bovine mastitis milk samples in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), p. 61
- GOETSCH, A.L.; ZENG, S.S.; GIPSON, T.A. (2011) Factors affecting goat milk production and quality. *Small Ruminant Research*. 101, p.55– 63
- GONÇALVES, H.C.; SILVA, M.A.; WECHSLER, F.S.; RAMOS, A.A. (2001) Fatores genéticos e de meio na produção de leite de caprinos leiteiros. *Botucatu*. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v30n3/5240.pdf>> Acessado em 25 out. 2015

GOTTARDI, C.P.T.; MURICY, R.F.; CARDOSO, M.; SCHMIDT, V. (2008) Qualidade higiênica de leite caprino por contagem de coliformes e estafilococos. *Ciênc. Rural*, 38, 3, p.743-748.

GOTZ, F. (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *molecular microbiology*, Baltimore, v. 43, p.1367-1378.

GREGORY, L., BIRGEL, E., HOEDEMAKER, M.; GRUNERT, E. (2001) Mastite dos bovinos: histórico de suas formas clínicas. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, 4(3), p.31-38.

HALL, S.M.; RYCROFT, A.N. (2007) Causative microorganisms and somatic cell counts in subclinical intramammary infections in milking goats in the uk. *Vet. Rec.* 160, p.19–22.

HAMEED, K.G.A.; SENDER, G.; KORWIN-KOSSAKOWSKA, A. (2006) Public health hazard due to mastitis in dairy cows. *Anim. Sci. Paper Rep.*, 25, p.73–85

HARMON, R. J. (1994) Symposium: mastitis and genetic evaluation for somatic cell count. *Journal of Dairy Science*. 77 (7), p. 2103-2112.

HOGAN, J. S.; SMITH, K. L.; HOBLET, K. H.; SCHOENBERGER, P. S.; TODHUNTER, D. A.; HUESTON, W. D.; PRITCHARD, D. E.; BOWMAN, G. L.; HEIDER, L. E.; BROCKETT, B. L.; CONRAD, H. R. (1989) Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *Journal of Dairy Science*. 72 (6), p.1547-1556.

IBGE.(2012) Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho (cabeças). Disponível Em: <[Http://Www.Sidra.Ibge.Gov.Br/Bda/Tabela/Protabl.AsP?C=73&Z=T&O=24&I=P](http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?C=73&Z=T&O=24&I=P)>. Acesso Em: 05 Nov 2015.

JAGER, S.; MACK, D.; ROHDE, H.; HOSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K.M. (2005) Deterioration of *Staphylococcus epidermidis* biofilms under glucose-limiting conditions depends on the activity of the alternative sigma factor σ^B . *Appl. Env. Microbiol.* 71, p.5577–5581.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DADRASNIA, A. (2015) Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. *Food Control*, 54, p.383-388.

JORGENSEN, H.J.; MORK, T.; RORVIK, L.M. (2005) The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 88, p.3810–3817.

KALAYOU, S.; HAILESELASSIE, M.; GEBRE-EGZIABHER, G.; TIKU'E, T.; SAHLE, S.; TADDELE, H.; GHEZU, M. (2012) In vitro antimicrobial activity screening of some ethnoveterinary medicinal plants traditionally used against mastitis, wound and gastrointestinal tract complication in Tigray Region, Ethiopia. *Asian Pacific J. Trop. Biomed.*, 2, p.516–22.

KANIA, R.E.; LAMERS, G.E.M.; VONK, M.J.; DORPMANS, E.; STRUIK, J.; TRAN HUY, P.; HIEMSTRA, P.; BLOEMBERG, G.V.; GROTE, J.J. (2008) Characterization of mucosal biofilms on human adenoid tissues. *Laryngoscope*. 118, p.128–134.

KEEFE, G. (2012) Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Journal of Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 28, n.2, p. 203-216.

KIM, H.K.; THAMMAVONGSA, V.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. (2012) Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Microbiology*. 15, p.92–99.

KONEMAN, E.W.; ALLEN S.D.; JANDA, N.M. SCHRECKEMBERGER, P.C., WINN JR, W.C. (2008) *Diagnostico microbiológico: texto e atlas colorido*. Rio De Janeiro. Editora Medis, 2008, 1565p.

KOOP, G.; DE VliegHER, S.; DE VISSCHER, A.; SUPRÉ, K.; HAESEBROUCK, F.; NIELEN, M.; VANWERVERN, T. (2012) Differences between coagulase-negative *Staphylococcus* species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 95, p.5075–5084

LANGONI H.; DOMINGUES P. F.; BALDINI S. (2006) Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Rev. Bras. Ciên. Vet.*, 13, p.51-54.

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

LEE, S.H.I.;MANGOLIN, B.L.C.;GONÇALVES, J.L.;NEEFF, D.V.; SILVA, M.P.; CRUZ, A.G.; OLIVEIRA, A.F. (2014) Biofilm producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from brazilian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 97, p.1812–1816.

LEITNER, G.; MERIN, U.; SILANIKOVE, N. (2004) Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *J. DairySci.* 87, p.1719–1726.

LEITNER, G.; MERIN, U.; LAVI, U.; EGBER, A.; SILANIKOVE, N. (2007) A etiology of intramammary infection and its effect on milk composition in goat flocks. *J. Dairy Res.* 74, p.186–193.

LIMA, R. P.; PALITOT, K.M.; REGO, M.A.E.; XAVIER, F.J.R.; SOUZA, A.E.F. (2012) Emprego de plantas medicinais em animais de companhia e de produção da zona rural do município de Juru-PB. *Rev. de Biol e Farmácia*, v.08, p.85-92.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. (2002) *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LUDBERG, A.; ASPÁN, A.; NYMAN, A.; UNNERSTAD, H. E.; WALLER, K. P. (2014) Associations between bacterial genotype and outcome of bovine clinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 56 (2).

MALHEIROS, P. S.; PASSOS, C. T.; CASARIN, L. S.; SERRAGLIO, L.; TONDO, E. C. (2010) Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Control*, 21, p.298 - 301.

MALIK, S.; CHRISTENSEN, H.; PENG, H.; BARTON, M.D. (2007) Presence and diversity of the beta-lactamase gene in cat and dog *Staphylococci*. *Vet. Microbiol.*, 123, p.162–168.

- MARANHÃO, C.A.; PINHEIRO, I.O.; SANTANA, A.L.B.D.; OLIVEIRA, L.S.; NASCIMENTO, M.S.; BIEBER, L.W. (2013) Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 79, p.9-13.
- MAREGESI, S.M.; NAGSSAPA, O.D.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.. (2007) Ethnopharmacological survey of the bunda district, tanzania: plants used to treat infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 113, p.457–470.
- MARINO, A.; BELLINGHERI, V.; NOSTRO, A.; MICELI, N.;TAVIANO M.F.; GUVENC, AY. S.;BISIGNANO, G. (2010) In vitro effect of branch extracts of *Juniperus* species from turkey on *Staphylococcus aureus* biofilm. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 59, p.470–476.
- MAROGNA, G.; ROLESU, S.; LOLLAI, S.; TOLA, S.; LEORI, G. (2010) Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. *Small Ruminant Research*, 88, 119–125.
- MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; KE, D.; PARADIS, S.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. (2001) Development of a PCR assay for identification of *Staphylococci* at genus and species levels. *J. Clin. Microbiol.*, 39, p. 2541–2547.
- MAVROGIANNI, V.S.; MENZIES, P.I.; FRAGKOU, I.A.; FTHENAKIS G.C. (2011) Principles of mastitis treatment in sheep and goats. *Vet Clin Food Anim.*, 27: p.115–120.
- MCKENNY, D.; HUBNER, J.; MULLER, E.; WANG, Y.; GOLDMANN, D.A.; PIER, G.B. (1998) The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect. Immun.*, 66, p.711–4720.
- MEDEIROS, E.S.; SANTOS, M.V.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; FARIA, E.B.; WANDERLEY, G.G.; TELES, J.A.A.; MOTA, R.A. (2009) Avaliação in vitro da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-*dipping* frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, 29(1), p.71-75.
- MELO, M.G.G.; MENDES, A.M.S. (2005) Informativo técnico de sementes da amazônia, manaus, N. 9. Disponível em:< https://www.inpa.gov.br/sementes/sementes_it2.php>. Acesso em: 15 nov 2015.
- MELO, D.B. Mastite Subclínica Em Cabras No Semiárido Paraibano. (2012) Dissertação (Mestrado). Universidade Federal De Campina Grande, paraíba: Patos, Centro De Saúde E Tecnologia Rural, 59p.
- MENDONÇA, V.M.; SANTOS; A. J.; NASCIMENTO, I. R.; OLIVEIRA, M. A. S.; ROCHA, S. S.; CABRAL, E.S. (2014) Perspectivas da Fitoterapia Veterinária: Plantas Potenciais na Terapia dos Animais de Produção. *Cadernos de Agroecologia*, v.9, 4.
- MIGUEL, P.R.R.; POZZA, M.S.S.; CARON, L.F.; ZAMBOM, M.A.; POZZA, P.C. (2012) Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos Incidence. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, 1, p. 403-416.
- MORDMUANG, A.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. (2015) *Rhodomyrtus Tomentosa* (Aiton) Hassk. leaf extract: an alternative approach for the treatment of *Staphylococcal* bovine mastitis. *Res In Veterinary Sci.*, 102, p. 242–246.

- MORONI P.; PISONI G.; ANTONINI M.; RUFO G.; VARISCO G.; BOETTCHER P. (2005) Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus Caprae* and *Staphylococcus Epidermidis* isolated from two Italian goat herds. J. Dairy Sci., 88, p.1694-1704.
- MUBARACK, H.M.; DOSS, A.; DHANABALAN, R.; VENKATASWAMY, R. (2011) Activity of some selected medicinal plant extracts against bovine mastitis pathogens. J Anim Vet Adv., 10, p.738-41.
- NASCIF JUNIOR, I.A. (2005) Avaliação da eficácia do ácido láctico frente ao iodo na anti-sepsia dos tetos após a ordenha na prevenção da mastite bovina. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2005. 84p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) Universidade Estadual Paulista.
- NMC- Nacional Mastitis Council. Laboratory Handbook On Bovine Mastitis. (1999) USA: Nacional Mastitis Council. 222p.
- NOCARD, P.; MOLLEREAU, R. Mastite contagiosa. (1885) Paris: Masson, p. 817-831.
- OLIVEIRA, L.S.; MARANHÃO, C.A.; SANTANA, A.L.B.D.; MIRANDA, R.C.M.; GALVÃO DELIMA, V.L.A.; SILVA, S.I.; NASCIMENTO, M.S.; BIEBER, L.W. OLIVEIRA, L.S. (2010) Natural resistance of five woods to *Phanerochaete chrysosporium* degradation. International Bio- deterioration & Biodegradation, 64, p.711-715.
- PAES, J.B.; MORAIS, V.M.; LIMA, C.R. (2005) Resistência natural de nove madeiras do semi-árido brasileiro a fungos causadores da podridão-mole. Revista Árvore, 29, p. 365-371.
- PALOMBO, E.A. (2009) Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2009, 15p.
- PANKEY, J.W. (1989) Premilking udder hygiene. Journal of Dairy Science. v.72, 5, p.1308-1312.
- PANTOSTI, A. (2012) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. Front Microbiology, v.3, 127.
- PEIXOTO, R.M. (2009) Mastite em pequenos ruminantes: etiologia, fatores de risco, diagnóstico e sensibilidade aos agentes antimicrobianos e extratos de plantas. Dissertação (Mestrado em ciência animal). Programa de Pós graduação em Ciência Animal. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 123p.
- PEIXOTO, R.M.; FRANÇA, C.A.; S. JÚNIOR, A.F.; VESCHI, J.L.A.; COSTA, M.M. (2010) Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.30, 9, p.735-740.
- PEIXOTO, R. M.; ARAÚJO, R. M. P.; PEIXOTO, L. J. S.; BOMFIM, S. A. G.; SILVA, T. M. G.; SILVA, T. M. S.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M. (2015) Treatment of goat mastitis experimentally induced by *Staphylococcus Aureus* a formulation containing *Hymenaea Martiana* Extract. Small Ruminant Research, 130, p.229-235.

- PINTO, C.N.; DANTAS, A.P.; MOURA, KCG, EMERY, F.S.; POLEQUEVITCH, P.F., PINTO M.C.; DE CASTRO, S.L.; PINTO, A.V. (2000) Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. *Arzneim-Forsch/Drug Res.*, 50, p.11-20
- POZZO, M. D.; VIEGAS, J.; SANTURIO, D.F.; ROSSATO, L.; SOARES, I.S.; ALVES, S.H.; COSTA, M.M. (2011) Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente A *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. *Ciênc. Rural*, v.41, p.667-672.
- PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. (2002) Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. . *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia*. v. 9, 1, p. 118-132.
- PSALTIS, A.J.; HA, K.R.; BEULE, A.G.; TAN, L.W.; WORMALD, P.J. (2007) Confocal scanning laser microscopy evidence of biofilms in patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 117, p.1302–1306.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. (1994) *Clinical veterinary medicine*, London: Mosby-Year Ed. 648 p.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.E. (2007) *Veterinary medicine: a text book of disease of cattle, horses, sheep, pig and goats*, 10 Th Edition, Philadelphia: Saunders Elsevier, p.173-187.
- RAMALHO, A.C.; SOARES, K.D.A.; SILVA, D.F.; BARROS, M.R.C.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; OLIVEIRA, J.M.B.; MOTA, R.A.; MEDEIROS, E.S. (2012) Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-*dipping* frente a *Staphylococcus* Spp. isolados em rebanhos leiteiros. *Pesq. Vet. Bras.*, 32(12), p.1285-1288.
- RAMOS, A.C.S.; LEMOS-FILHO, J.P.; RIBEIRO, R.A.; SANTOS, F.R.; LOVATO, M.B. (2007) Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. *Annals of Botany*, 100, p.1219-1228.
- RESHI, A. A.; HUSAIN, I.; BHAT, S. A.; REHMAN, M. U.; RAZAK, R.; BILAL, S.; MIR, M. R. (2015) Bovine mastitis as an evolving disease and its impact on the dairy industry. *Int. J. Cur. Res. Rev.*, 7 (5).
- RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L.A. ; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. (2003) Relation between clinical, subclinical infectious and non infectious mastitis in milk production units in the southern region of the rio grande do sul state. *Rev. Brasileira Agric.*, 9(3), p.287-290.
- RIBEIRO, R. D. (2010) *Hymenaea*. In: lista de espécies da flora do brasil. jardim botânico do rio de janeiro. Disponível em < <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/fb083198>> Acesso em: 20 dez. 2015
- RIZZINI, C.T. (1971) *Árvores e madeiras úteis do Brasil*. Manual de Dendrologia Brasileira, second ed. Edgard Blucher, São Paulo.

- RIZZO, P.V.; MENTEN, J.F.M.; RACANICCI, A.M.C.; TRALD, A.B.; SILVA, C.S.; PEREIRA, P.W.Z. (2010) Extratos vegetais em dietas para frangos de corte. *Revista Brasileira De Zootecnia*, 39(4), p.801-807.
- ROLA, J.G.; SOSNOWKI, M.; OSTROWSKA, M.; OSEK, J. (2015) Prevalence and antimicrobial resistance of coagulase-positive *Staphylococci* isolated from raw goat milk. *Small Ruminant Research*, 123, p.124–128.
- ROLLIN, K.C. E.; DHUYVETTERB, M.W. (2015) Overton the cost of clinical mastitis in he first 30 days of lactation: an economic modeling tool. *Preventive Veterinary Medicine*, v.122, 3, p.257-264.
- ROSSI, T. *Hymenaea Coubaril* Var. *Stignocarpa* (Jatobá). (2008) Disponível em:< [Http://Www.Ipéf.Br/Identificacao/Hymenaea.Courbaril.Asp](http://Www.Ipéf.Br/Identificacao/Hymenaea.Courbaril.Asp) > Acesso em: 03 nov 2015.
- SÁ, M.C.A; PEIXOTO, R.M; KREWER, C.C.; ALMEIDA, J.R.G.; VARGAS, A.C.; COSTA, M.M. (2011) Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bactéria. *R. bras. Ci. Vet.*, v.18, 2/3, p. 62-66.
- SAIDI, R.; KHELEF, D.; KAIDI, R. (2013) Bovinemastitis: prevalence of bacterial pathogens and evaluation of early screening test. *Afr. J. Microbiol.*, 7, p.777–782.
- SALA-CIRTOG, M.; MARIAN, C.; ANGHEL, A. (2015) New insights of medicinal plant therapeutic activity, the mRNA transfer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 74, p.228–232.
- SANTANA, A.L.B.D.; MARANHÃO, C.A.; SANTOS, J.C.; CUNHA, F.M.; CONCEIÇÃO, G.M.; BIEBER, L.W.; NASCIMENTO, M.S., (2010) Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. *International Bio-deterioration&Biodegradation*, 64, 7-12.
- SARTORI, L.C.A.; SANTOS, R.C.; MARIN, J.M. (2012) Avaliação in vitro da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente à candida spp isolada de leite mastítico bovino. *Ars Veterinária*, v.28, 4, p.240-243.
- SCALI, F.; CAMUSSONE, C.; CALVINHO, L.F.; CIPOLLA, M.; ZECCONI, A. (2015) Which are important targets in development of s. aureus mastitis vaccine? *Research In Veterinary Science*, 100, p.88–99.
- SCHMIDT, V.; PINTO, A.T.; SCHNEIDER, R.N.; SILVA, F.F.P.; MELLO, F.A. (2009) Caracterização da mastite subclínica em caprinos produzidos em sistema orgânico no rio grande do sul. *Pesq. Vet. Brasileira*, 29(9), p774-778.
- SCHIAVON, D.B.A. (2011) Aplicação de um fitoterapico a base de *Tagetes minuta* na anti-sepsia de tetos de vacas pos ordenha. *Dissertacao (Mestrado em Sanidade Animal)*. Programa de Pos-Graduacao em Veterinaria da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 36p.
- SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. (2001) *Rational Phytotherapy* (4th Edition), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 424p.
- SEO, Y.; LEE, D.Y.; RAYAMAHJI, N.; KANG, M.L.; YOO, H.S. (2008) Biofilm-Forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. *Research in Veterinary Science*, 85, p.433–438.

SHARMA, N.; RHO, G.J.; HONG, Y.H.; KANG, T.Y.; LEE, H.K.; HUR, T.Y.; JEONG, D.K. (2012) Bovine mastitis: an asian perspective. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, 7, p.454–476.

SILANIKOVE, N.; MERIN, U.; SHAPIRO, F.; LEITNER, G. (2014) Milk Metabolites As indicators Of Mammary Gland Function And Milk Quality. *J. Dairy. Res.*, 81(3), p.358-63.

SILVA, M.E.G.S.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; ARAÚJO, C.S.; SIQUEIRA FILHO, J.A.; FONTANA, A.P.; DAMASCENO, P.K.F.; BRANCO, C.R.C.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J.R.G.S. (2012) Hplc-Dad analysis and antioxidant activity of *Hymenaea Martiana* Hayne (Fabaceae). *J. Chem. Pharm. Res.*, 4, 1160-1166.

SKRZYPEK, R.; WOJTOWSKI, J.; FARH, R.D. (2004) Effects of various methods of udder and teat preparation for milking on the hygienic quality of milk. *Med. Weter.*, 60, p.1002–1005.

SOUZA, A.C.M. (2008) Potencial Antifúngico De Extratos De *Hymenaea Martiana*. Dissertação (Mestrado), Instituto De Patologia Tropical E Saúde Pública, Universidade Federal De Goiás, Goiânia. 84p.

SOUZA, G.; BRITO, J.R.F.; APARECIDA, M.; BRITO, V.P.; LANGE, C.; FARIA, C.; MORAES, L.; FONSECA, R.G.; SILVA, Y. (2009) Composition and bulk somatic cell counts of milk from dairy dairy goat herds in Southeastern Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci.*, 46, p.19-24.

SPANU, V.; SPANU, C.; VIRDIS, S.; COSSU, F.; SCARANO, C.; DE SANTIS, E. P. L. (2012) Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 153, 1-2, p. 53-57.

SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF STAPHYLOCOCCI AND MICROCOCCI. (1965) Minutes of First Meeting (5th-6th October, 1964). *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.*, 15, p.107-8.

THORIA O.O.; GALAL M.A.; ASHOUR N.A.; HUSSAIN A.M. (2011) Treatment of experimentally induced mastitis in Nubian goats by *Staphylococcus aureus* using methanolic extract of *Terminalia brownii* leaves. *J. Sci. Technol.*, 12, p. 32–37.

TU QUOC, P.H.; GENEVAUX, P.; PAJUNEN, M.; SAVILAHTI, H.; GEORGOPOULOS, C.; SCHRENZEL, J.; KELLEY, W.L. (2007) Isolation And Characterization of biofilm formation-defective mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.*, 75, p.1079–1088.

TYLER, J.W.; CULLOR J.S. (2006) Sanidade e distúrbios da glândula mamária. In: *Tratado de medicina interna de grandes animais*. 3.Ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, p.1019-1038.

VANDERHAEGHEN, W.; CERPENTIER, T.; ADRIAENSEN, C.; VICCA, J.; HERMANS, K.; BUTAYE, P. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Veterinary Microbiology*, v. 144, p. 166–171.

VAN DUIJKEREN, E.P.D. HENGVELD, P.D.; ALBERS, M.; PLUISTER, G.; JACOBS, P.; HERES, L.; VAN DE GIESSEN, A.W. (2014) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecA* or *mecC* in dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, 171(3-4), p. 364-7.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. (2004) Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, 1, p.159-163.

VLIEGHER, S.; DE, L.K.; FOX, S.; PIEPERS, S.; MCDOUGALL, H.W.; BARKE, M. (2012). Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J. Dairy Sci.*, 95, p.1025–1040.

WELBORN, R. (1994) Para o diagnóstico e classificação da mastite. *Deutsche Tierärzliche Wochenschrift*, v. 65, p. 497- 503.

WENDT, K.; BOSTEDT, H.; MIELKE, H.; FUCHS, A. W. (1994) Euter-und Gesäugekrankheiten. Stuttgart: Fischer, p.226-431.

WHITE, E. C.; HINCKLEY, L. S. (1999) Prevalence Of Mastitis Pathogens in goat milk . *Small Rumin.Res.*, v.33 (2), p.117-121.

WU, S.; PISCITELLI, C.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. (1996) Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microb. Drug Resist.*, 2, p.435-441.

YAMAMOTO, T.; NISHIYAMA, A.; TAKANO, T.; YABE, S.; HIGUCHI, W.; RAZVINA, O.; SHI, D. (2010) Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: Community Trans- Mission, Pathogenesis, And Drug Resistance. *Journal of Infection and Chemo- Therapy*, 16, p.225–254.

YAMAZI, A.K.; MORAES, P.M.; VIÇOSA, G.N.; ORTOLANI, M.B.T.; NERO, L.A. (2010) Producing practices applied on the control of microbiological contamination in raw milk production. *Biosci. J.*, v. 26, 4, p. 610-618.

ZAMPINI, I.C.; CUELLO, S.; ALBERTO, M.R.; ORDOÑEZ, R.M.; ALMEIDA, R.; SOLORZANO, E.; ISLA, M.I. (2009) Antimicrobial activity of selected plant species from ‘the Argentine Puna’ against sensitive and multi-resistant bacteria. *J. Ethnopharmacol.*, 124, p.499–505.

ZECCONI, A.; SCALI, F. (2013) *Staphylococcus Aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunology Letters*, 150,p.12–22.

CAPÍTULO 1

Artigo

Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana* Hayne frente à *Staphylococcus* spp. e avaliação de seu potencial como desinfetante em cabras

Submetido à Revista: Pesquisa Veterinária Brasileira

Normas: www.pvb.com.br

Artigo submetido a “Pesquisa Veterinária Brasileira”

Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana* Hayne frente à *Staphylococcus* spp. e avaliação de seu potencial como desinfetante em cabras¹

Dielson da Silva Vieira², Rodolfo de Moraes Peixoto³, Mateus Matiuzzi da Costa⁴, Davi Pereira Freire⁴, Telma Maria Guedes da Silva², Tania Maria Sarmento da Silva²

ABSTRACT: Vieira, D.S., Peixoto, R.M., Costa, M.M., Freire, D. P., Silva, T.M.G., Silva, T.M.S. 2016. [*In vitro* antimicrobial activity of ethanolic extract of *Hymenaea martiana* Hayne leaf on strains of *Staphylococcus* spp. and evaluation of its potential as a disinfectant in goats.] **Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana* Hayne frente à *Staphylococcus* spp. e avaliação de seu potencial como desinfetante em cabras** Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: dielson.vieira@ig.com.br

This study aimed to evaluate the antimicrobial and antiseptic action of the crude ethanolic extract of *Hymenaea martiana* leaves. The study was conducted at the Laboratory of Microbiology and Immunology of UNIVASF, city of Petrolina, state of Pernambuco. The extracts were prepared using different solvents, such as absolute ethyl alcohol and distilled water. Then, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) techniques were used. All assays were performed in triplicate. The average of MBC extract diluted in ethanol was 358 µg/µL, and the extract diluted in distilled water was equal to 520.82 µg/µL. There was no difference ($P < 0.05$) and bacterial inhibition to extract diluted in absolute ethanol or autoclaved distilled water. Comparing the activity of the extract diluted in ethanol and the relation with the presence of *blaZ* gene, it was observed that the negative strains for this searched gene showed a MBC equal to 412.3 µg/µL in relation to those that were positive for *blaZ* gene, that was 308.80 µg/µL, and, however, there was no statistical difference. The bacterial inhibition activity using an aqueous extract was equal for the bacteria that had or not the *blaZ* gene (520.82 µg/µL). Thus, the extract diluted in absolute ethanol in autoclaved distilled water as demonstrated antimicrobial activity, suggesting that occurred extraction of bioactive substances. Regarding the antiseptic potential, *H. martiana* had the same action of chlorine, although, this acted immediately, while the chlorine action happened properly an hour after the application. Both results pointed out that the crude ethanolic extract of *H. martiana* leaves has potential to combat the proliferation of environmental and infectious bacteria, emerging as a way to prevent mastitis.

Keywords: Udder cleaning. Natural extract. Milk quality. Milking preparation. Goats.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), *Câmpus* Dois irmãos, Recife, PE- Brazil. Corresponding author. Tel.: +55 87 38633350 dielson.vieira@ig.com.br

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Rodovia BR 235, km 22, Projeto Senador Nilo Coelho-N4, Petrolina, PE 56300-000, Brasil.

⁴ Campus Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Rodov. BR 407 Km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho s/n, Petrolina, PE 56300-990, Brasil.

Resumo

Com esse estudo objetivou avaliar a ação antimicrobiana e antisséptica do Extrato Etanólico Bruto da folha da *H. martiana* (Jatobá). O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIVASF, na cidade de Petrolina-PE. Os extratos foram preparados utilizando diferentes diluentes, sendo estes: álcool etílico absoluto e a água destilada. Em seguida, foi empregada a técnica da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A CBM média do extrato diluído em etanol foi de 358 µg/µL e do extrato diluído em água destilada foi igual a 520,82 µg/µL. Não houve diferença ($P < 0,05$) quanto à inibição bacteriana para o extrato diluído em álcool etílico absoluto ou água destilada autoclavada. Ao comparar a atividade do extrato diluído em álcool etílico absoluto e a relação com a presença do gene *blaZ*, observou-se que os isolados negativos para o gene pesquisado apresentaram uma CBM igual a 412,3 µg/µL, e, quando comparadas aos que foram positivos para o gene *blaZ*, que foi de 308,80 µg/µL, contudo sem diferença estatística. Quanto a inibição das bactérias utilizando extrato aquoso, a atividade foi igual para as bactérias com ou sem o gene (520,82 µg/µL). Desse modo, o extrato diluído em álcool etílico absoluto quanto em água destilada autoclavada demonstrou atividade antimicrobiana, sugerindo que ocorreu extração de substâncias bioativas. Em relação ao potencial antisséptico, *H. martiana* teve ação pareada com o cloro, contudo este agiu mais rapidamente, enquanto o cloro agiu de modo ideal com uma hora após aplicação, ambos resultados destacam que o Extrato Etanólico Bruto das folhas de *H. martiana* possui potencial de combate a proliferação de bactérias ambientais e infecciosas, surgindo como uma forma de prevenir a mastite.

Palavras-chave: Limpeza do úbere. Extrato natural. Qualidade do leite. Preparação da ordenha. Caprinos.

1. Introdução

A mastite é uma enfermidade que acomete muitos rebanhos leiteiros, causando prejuízos tanto para a saúde animal, quanto para o produtor. Possui uma vasta etilogia, e entre os agentes mais isolados, estão os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* (Peixoto et al. 2010), sendo também um dos principais agentes etiológicos da mastite subclínica.

Para o tratamento e prevenção desta doença, foram utilizados no decorrer dos anos produtos como antibióticos e desinfetantes, ocorrendo então a seleção de micro-organismos resistentes, o que dificulta a gestão do tratamento e da prevenção da mastite em caprinos (Bhasme et al. 2013). Um dos fatores a se observar, quando se trata de resistência a antibióticos, é a presença de genes de resistência nos indivíduos, que por ventura podem ser expressos e impedir a ação dos produtos, e dentre eles está o gene *blaZ* (Palaniappan & Holley 2010, Wendlandt et al. 2013). Uma vez ativo, este gene promove a inativação do fármaco pela enzima β-lactamase produzida por micro-organismos. Esta enzima é codificada pelo gene *blaZ*, que sob o sistema de classificação mais simples, possui quatro classes (A, B, C e D), neste caso uma importante defesa as β-lactamases (Chen et al. 2015).

De acordo com estes fatores, as soluções sanitizantes têm sido estudadas, uma vez que podem representar um importante fator de diminuição da inflamação da glândula mamária. Neste caso, bons desinfetantes devem ser eficazes contra os principais patógenos da glândula mamária, ser econômicos, de fácil aplicação, e manter ou promover boas condições de higiene (Agostinho Sartori et al. 2012). Devido a isto, há uma busca por alternativas aos antibióticos e desinfetantes, reduzindo o risco potencial de resíduos nos alimentos e possível promoção de patógenos resistentes, tais como o *Staphylococcus aureus* (Klocke et al. 2010). Desta forma, deve-se considerar a utilização dos fitoterápicos na produção animal, os quais são considerados uma importante alternativa quando se trata de prevenir e tratar doenças (Viegi et al. 2003, Mothana & Lindequist 2005, Albuquerque et al. 2007 e Peixoto et al. 2015).

A *Hymenaea martiana* Hayne está presente no território brasileiro e é conhecida por seu potencial medicinal. Peixoto et al. (2015) demonstraram seu potencial antimicrobiano *in vitro* e *in vivo*. Outras plantas do gênero *Hymenaea* possuem capacidade bactericida citada por vários autores (Sá et al. 2011, Dimech et al. 2013 e Aleixo et al. 2015). Diante disto, o seguinte estudo tem como objetivo avaliar a nível fitoquímico a composição do extrato etanólico bruto (EEB) da folha da *Hymenaea martiana*, determinar a atividade antimicrobiana deste produto frente a isolados de *Staphylococcus* spp. e avaliar o potencial antisséptico do EEB *in vivo*.

2. Material e Métodos

Esse trabalho passou por avaliação do Comitê de Ética em Estudos Humanos e Animais (CEUA), da Universidade Federal do Vale do São Francisco, e foi aprovado sob número de protocolo 0001/101214.

Utilização e produção do extrato etanólico da folha da *Hymenaea martiana* Hayne. As folhas foram coletadas de um exemplar, identificado como exsicata da planta 21868, que se encontra depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF). A extração e produção do extrato etanólico bruto (EEB) da folha da *Hymenaea martiana* Hayne foi realizada de acordo com metodologia descrita por Peixoto et al. (2015), com um pequeno diferencial após a coleta das folhas elas, passaram sete dias em estufa com circulação de ar a 45°C, para então serem maceradas e colocadas para produção do EEB.

Análise do extrato das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne. Para a análise por HPLC-DAD, o extrato das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne foi extraído em SPE C-18 (Extração em fase sólida). O cartucho foi previamente ativado utilizando 10 mL de metanol e 10 mL de água ultrapura. Cerca de 100 mg do extrato foi solubilizado em 500 µL de água acidificada (pH=2 com HCl) e 500 µL de MeOH. Após a aplicação do extrato no cartucho, foram adicionados 10 mL de água ultrapura e logo em seguida a fração com os compostos orgânicos foi eluída com 10 mL de metanol. Esta fração metanólica foi analisada por CLAE-DAD.

Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE-DAD. A análise foi realizada utilizando um cromatografo líquido de alta eficiência da Shimadzu Prominence LC-20AT com um detector de arranjo de diodo (SPDM20), injetor automático SIL-20AC, forno CTO-20A e degaseificador DGU-20A5. A separação cromatográfica foi feita com uma coluna Luna C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm, Phenomenex). Foi utilizado como fase móvel a mistura de H₂O: ácido fórmico (99:1, Solvente A) e metanol (Solvente B), com sistema de eluição: 0-10 min, 90-100 % de B, 10-30 min, 100% de B fluxo de 1,0 mL/minuto, temperatura de 35°C e para monitoramento foi utilizado o comprimento de onda de 320nm. Para a filtração das amostras foram utilizados filtros de nylon (Whatman) 0,45 µm. Todos os solventes utilizados foram grau HPLC.

Determinação da atividade antibacteriana. Neste estudo foram utilizados 22 isolados de *Staphylococcus* sp., sendo 18 obtidos de casos de mastite subclínica no estado de Pernambuco (9 apresentando gene bla_Z e 9 com ausência deste gene), e três cepas de ATCC (25923, 6538, 12228) e um isolado clínico MRSA de origem humana. A concentração bactericida mínima (CBM), foi realizada seguindo o padrão do documento M7-A7 (CLSI, 2012). Os extratos foram diluídos em dois diluentes, Álcool etílico absoluto (AEA) e água destilada autoclavada (ADA), após diluição dos extratos a concentração de 25mg/mL, seguiu-se a metodologia com a preparação do inóculo, em uma suspensão bacteriana com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mac Farland. O material então foi levado a estufa a 37°C/24h, em condições de aerobiose e na seqüência realizou-se a CBM, semeando o material líquido em Ágar muller hinton e devolvendo a estufa a 37°C/24h, sendo considerada eficaz a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Os ensaios foram realizados em triplicata, e no estudo utilizando álcool absoluto, foi realizado o controle deste produto.

Desinfecção de animais naturalmente infectados com *Staphylococcus* spp. Foram utilizadas 10 fêmeas caprinas da raça Saanen, com faixa etária variando de 2 a 5 anos, e entre a segunda e a terceira lactação. No total, fez-se a desinfecção em 20 metades mamárias. Os animais foram avaliados clinicamente (frequência cardíaca e respiratória, temperatura retal e superficial, avaliação das mucosas e da hidratação) demonstrando estarem aptos ao estudo. Os animais foram negativos em três lactoculturas consecutivas, sendo adotado um intervalo de sete dias entre estas coletas.

Os animais foram submetidos ao pré-*dipping* (30 segundos de imersão), utilizando duas formas, como segue abaixo:

Grupo 01 (5 animais) - Imersão em solução de extrato hidrossolúvel da *Hymenaea martiana* Hayne, na concentração de 5% seguido da secagem com papel toalha descartável (estéril).

Grupo 02 (5 animais) - Imersão em solução a base de Hipoclorito Agrisept® MC Tabs (1400 ppm de cloro) e secagem com papel toalha descartável (estéril).

Em cada tratamento a análise da população da microbiota das metades mamárias foi realizada nos tempos um minuto, 30 minutos e uma hora, além de uma amostra controle.

A coleta dos espécimes clínicos para o isolamento e quantificação das UFC/cm² de cada teto foi obtido com "swab" bacteriológico estéril e molde de papel cartolina estéril com abertura central de 2cm por 2cm. Para coleta, foram realizados quatro movimentos cruzados sobre uma área de 2cm² na região mediana do

teto evitando a região proximal do esfíncter mamário (Finger, 2001). O “swab” foi semeado em Ágar sangue ovino a 5% e submetido a estufa por 24 horas a 37°C, e uma alíquota de 1mL foi administrada em Ágar Padrão de Contagem (PCA) em duplicata, seguindo após com identificação dos espécimes encontrados.

Contagem e isolamento bacteriano. Após o processo citado no tópico anterior, os “swabs” foram vertidos em 5mL de água peptonada tamponada e transportados ao laboratório e então realizou-se as diluições decimais sucessivas até 10^{-4} em 9mL de caldo Muller-Hinton. Posteriormente, foram plaqueados 1 mL das amostras diluídas em placas de Petri estéreis e adicionado o meio de Contagem Padrão em Placa (PCA). Após homogeneização (*pour plate*), as placas foram incubadas em estufa 37°C por 48 horas, quando então serão contadas as unidades formadoras de colônias (UFC) bacterianas para determinação da quantidade de micro-organismos totais no teto, avaliando a eficácia e acurácia das técnicas utilizadas. Para o isolamento, o *swab* foi semeado em meio ágar sangue ovino 8%, e a caracterização fenotípica dos agentes foi realizada de acordo com Koneman et al. (2008).

Análise dos dados. Foi realizada a técnica de estatística descritiva por meio da distribuição das frequências relativa e absoluta para os achados microbiológicos. A ausência de normalidade dos dados foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. Dessa forma, os valores obtidos para UFC/cm² foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 (\log_{10}) para análise estatística, e a função antilogarítmica para apresentação dos resultados. Os valores obtidos de UFC/cm² foram comparados entre os grupos (jatobá e cloro), utilizando-se o teste T para amostras independentes e entre os tempos experimentais pela análise de variância para medidas repetidas, usando o teste de Bonferroni para comparação de médias. Para análise dos dados, foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0 para Windows.

3. Resultados

Análise fitoquímica. A análise do cromatograma HPLC-DAD (Figura 1) permitiu sugerir que os principais picos presentes na amostra podem ser fenólicos do tipo flavonóides. Com comprimentos de onda máximos em torno de 310 nm. Para a identificação dos compostos serão necessárias outras análises como LC-MS.

Atividade antimicrobiana *in vitro*. Quanto a atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto (EEB) da folha da *Hymenaea martiana* Hayne, observou-se melhor atividade do extrato quando este foi diluído em álcool etílico absoluto, demonstrando uma melhor exposição dos compostos bioativos presentes. A diluição em água destilada também foi relacionada ao potencial antibacteriano, porém não tão eficaz quanto a diluição etanólica. Contudo os valores não diferiram estatisticamente, demonstrando que os dois diluentes podem ser utilizados.

Dos 22 isolados utilizados, 50% (11/22) isolados que tiveram o extrato diluído em água destilada autoclavada (ADA), tiveram sua CBM em 781,25 µg/mL. Em relação ao AEA a CBM foi de 390,6 µg/mL (11/22) para 50% dos isolados, seguidos de 40,9% (9/22) dos isolados neste mesmo diluente. Quanto a variação da CBM entre os diluentes, 22,7% apresentaram os mesmos valores em ambos diluentes, e 5/22 tiveram melhor resultado quando desafiados com extrato diluído em ADA. A CBM média do extrato diluído em etanol foi de 358 µg/mL e do extrato diluído em água destilada foi igual a 520,82 µg/mL. Ao se comparar a atividade do extrato diluído em etanol e a relação com a presença do gene *blaZ*, observou-se que os isolados negativos para o gene pesquisado apresentaram uma CBM igual a 412,3 µg/mL, quando comparou-se com aqueles que foram positivos para o gene *blaZ* (308,80 µg/mL), contudo sem diferença estatística. Quanto à inibição das bactérias utilizando extrato aquoso, a atividade foi igual para as bactérias com ou sem os genes (520,82 µg/mL).

Como é possível observar nas figuras 2 a presença ou ausência do gene *blaZ*, não é fator determinante e nem foi observado ($P < 0,05$) atividade do EEB frente aos *Stapylococcus sp.* Em relação à ausência do gene *blaZ*, na figura 2 (A), a CBM do EEB diluído em etanol foi de 390,6 µg/mL 78% (7/9), já quando diluído em ADA aproximadamente 45% dos isolados tiveram sua CBM em 781,25 µg/mL (4/9), 33% com 195,3 µg/mL e 22 % com 390,6 µg/mL. Já na imagem B, a CBM do EEB diluído em etanol foi 195,3 µg/mL 67% (6/9) dos isolados, e ao diluir em ADA, a CBM foi 4 isolados 45% (4/9) com 781,25 µg/mL, assim como 33% com 390,6 µg/mL e 22 % com 195,3 µg/mL.

Atividade antimicrobiana *in vivo*. Foram testadas duas soluções, a comercial (Agrisept® MC Tabs) que possui 1.400 ppm de cloro, e uma solução com 5% do EEB da folha da *Hymenaea martiana*

Hayne. Não foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tratamentos, quanto a sua capacidade bactericida. Porém observou-se que a *H. martiana* Hayne agiu prontamente assim que foi colocada em contato com a pele do teto, diferente do produto comercial que agiu no seu potencial máximo apenas uma hora após a imersão ($P < 0,05$). No Quadro 1, o extrato etanólico bruto da *H. martiana* Hayne tem potencial como produto bactericida, devido a sua atividade observada frente aos mesófilos presentes na pele da teta, podendo ser utilizado com potencial para antisséptico pré-ordenha.

4. Discussão

Análise fitoquímica. De acordo com a avaliação fitoquímica do extrato etanólico bruto (EEB) da folha da *Hymenaea martiana* Hayne, obteve-se a informação da dominância de três tipos flavonóides, que precisam de melhores análises por técnicas mais apuradas para sua identificação. Dimech et al. (2013), também encontraram os flavonóides como componentes principais ao avaliar a *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne, e Silva et al. (2012) relatam a dominância do flavonóide astilbina como o principal composto fenólico presente na *H. coubaril*.

Os flavonóides são metabólitos secundários de baixo peso molecular, amplamente distribuídos no reino vegetal, com várias atividades biológicas (Hernandez et al. 2000), que de acordo com Mishra e Tiwari (2011), apresentam destaque como produto terapêutico, além disso estes autores afirma que as áreas de doenças infecciosas e oncologia se beneficiaram dessas numerosas classes de drogas, capazes de interagir com muitas áreas dentro das células, e de fato têm sido fundamentais na descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Assim como, relataram a atividade antimicrobiana de extratos brutos que possuem flavonóides em sua composição, frente a estirpes de *S. aureus* (Chattopadhyay et al. 2001, Cushnie e Lamb, 2011). Além disso, Peixoto et al. (2015), ao explorar o EEB feito com a casca da *Hymenaea martiana* Hayne, observou também presença deste composto, e não somente isto, também um potencial bactericida.

Atividade antimicrobiana in vitro. O EEB da folha da *Hymenaea martiana* Hayne teve sua ação bactericida avaliada *in vitro*, observando-se atividade frente a isolados de *S. aureus* e *S. epidermidis*, bactérias gram positivas comumente causadoras de mastite caprina. Os produtos naturais têm melhor ação sobre as bactérias gram positivas, podendo atuar de modo diferenciado nos micro-organismos (Palaniappan & Holley, 2010).

Nesse estudo 50% (11/22) dos isolados apresentaram CBM de 781,25 $\mu\text{g/mL}$ quando diluídos em água destilada autoclavada. Já quando a diluição foi realizada com etanol, a CBM foi de 390,6 $\mu\text{g/mL}$ (11/22). Garcia et al. (2011) ao estudar o extrato hidroalcoólico da *H. coubaril* frente a *S. aureus* obteve 98% de atividade da CBM em 53,25 mg/mL , assim como este trabalho demonstrando o potencial das plantas do gênero *Hymenaea*. Neste estudo não houve diferença ($P < 0,05$) quanto ao diluente utilizado. Contudo, alguns grupos obtiveram melhor atividade ao diluir em etanol seus extratos (Schnitzler et al. 2008, Kannaiyan et al. 2012 e Peixoto et al., 2015). O diluente pode não ser fator determinante na ação do extrato. Sá et al. (2011), obtiveram menor atividade bactericida ao desafiar *S. aureus* com o extrato etanólico da *H. coubaril* e Aleixo et al. (2015) ao utilizar o extrato hidroetanólico. O uso do etanol na sanitização da glândula mamária pode causar um ressecamento, em que causa danos na pele do teto e pode deixar resíduos, sendo mais indicada a utilização do extrato em meio à base de água.

Várias frações foram testadas do extrato da casca da *Hymenaea Stigonocarpa* Mart. Ex Hayne por Dimech et al. (2013), em que os valores de atividade antimicrobiana estiveram entre 64 e 512 $\mu\text{g/mL}$, o que se aproxima do presente trabalho onde foram obtidos valores de 195,3 até 781,25 $\mu\text{g/mL}$ ao se utilizar uma planta do mesmo gênero. Justificam esta atividade frente a isolados de *S. aureus*, a grande variedade de compostos fenólicos, além da presença dos flavonóides no extrato (Dimech et al., 2013).

Estudos têm descrito que os *Staphylococcus* spp. possuem vários fatores de resistência, dentre eles a presença do gene *blaZ*, sendo caracterizados como resistentes aos beta-lactâmicos (Bush e Jacoby, 2010, Chen et al. 2015). Esta resistência justifica a busca por compostos alternativos que atuem tanto sobre formas multiresistentes, como sensíveis de *Staphylococcus* spp. (Garcia et al. 2011). Neste estudo, não se observou diferença na atividade antimicrobiana do extrato de *H. martiana* Hayne frente a isolados que possuíam ou não o gene *blaZ*. Dessa forma, isto pode ser considerado um fator positivo quando se discute a ação dos produtos naturais em bactérias gram positivas. Dimech et al. (2013) ao utilizarem o extrato hidroalcoólico da casca do caule da *Hymenaea Stigonocarpa* Mart. Ex Hayne em *S. aureus* relataram que o extrato gerou vários processos na cepa utilizada, dentre eles falhas ao inserir peptídeoglicanos na membrana externa, falha na pressão osmótica interna, devido à ação de produtos na membrana externa, alterações nos componentes intracelulares, tais como ácidos nucleicos e proteínas (Dimech et al. 2013).

As cepas utilizadas neste trabalho tiveram do extrato diluído em meio aquoso a CBM entre 781, 25 e 195,3 $\mu\text{g/mL}$, neste caso ocorrendo uma atividade bactericida com valores variando de 390, 6-195,3 $\mu\text{g/mL}$ em 50% dos isolados, assim como a outra metade (11/22) obteve ação moderada (781, 25 $\mu\text{g/mL}$). Valores dentro dos padrões descritos por Sartoratto et al. (2004) sendo agentes de ação forte no intervalo de 50-500 $\mu\text{g/mL}$, ou de ação moderada sendo obtidos valores de 600 até 1500 $\mu\text{g/mL}$. Ressaltando o grande potencial de utilização das plantas do gênero *Hymenaea* como antimicrobianos.

Atividade antimicrobiana *in vivo*. Quando comparados os dados referentes ao tratamento dos animais entre os grupos experimentais (1.400ppm de cloro x EEB da folha da *H. martiana* Hayne), não foram observadas diferenças estatísticas em nenhum dos momentos experimentais. Ao se observar a atividade do EEB da folha da *H. martiana* diluída a 5%, um potencial como antisséptico foi evidenciado, pois agiu de modo rápido, um minuto após a imersão. Faz-se necessários produtos de ação imediata, pois na rotina da ordenha o tempo é um fator que pode interferir na coleta e armazenamento do leite (Langoni, 2013). Devido ao fato do óstio de liberação do leite estar acessível por até duas horas (Langoni, 2013). O esfínter do teto e o canal do teto são importantes barreiras primárias contra a invasão dos patógenos presentes no úbere, assim é essencial que tais estruturas estejam em condições físicas e de higiene perfeitas para prevenir a infecção intramamária (Manzi et al. 2012).

O objetivo da rotina de higiene do teto não é apenas para reduzir risco de infecção de mastite, mas também para melhorar a qualidade do leite (Gleeson et al. 2009). A redução da atividade bacteriana está descrita no quadro 1. Neste caso, o cloro após a imersão obteve uma redução nas contagens bacterianas de 95% e a *H. martiana* de 86%. Gleeson et al. (2009), obtiveram uma redução de 30% ao utilizar o cloro como desinfetante pré-ordenha. A realização do pré-*dipping* reduz em 50% a incidência de ocorrer mastite causada por patógenos ambientais (Oliver et al. 1993). Sendo que no presente trabalho a redução foi em média de 80%. Assim o pré-*dipping* é uma importante ferramenta para controle dos patógenos causadores da mastite em rebanhos leiteiros, e assim ser fundamental na prevenção de doenças de origem ambiental e infecciosa (Gibson et al. 2008, Gleeson et al. 2009 e Kamal e Bayoumi, 2015).

O cloro e a *H. martiana* agiram com uma hora após a imersão dos tetos, mantendo a redução de UFC/cm² de 98% e 89% respectivamente. Fator muito importante, já que o óstio de saída do leite fica aberto durante este tempo, ajudando na prevenção da mastite pós-ordenha (Langoni, 2013). O tempo de ação dos produtos deve ser compatível ao manejo que os animais são submetidos e não devem possuir efeito colateral sobre a pele do animal e muito menos deixar resíduo no leite (Gleeson et al. 2009 e Langoni, 2013).

A atividade do extrato utilizado como sanitizante é importante, pois reforça a capacidade de utilização dos produtos naturais pela população, e os seguintes autores Mishra e Tiwari (2011), Cipriano et al. (2014) e Peixoto et al. (2015) justificam este potencial pela complexidade de compostos presentes em um extrato de planta, favorecendo sua utilização na produção animal. Thoria et al. (2011), reportam que mais estudos, bioquímicos e intrínsecos por exemplo, devem ser realizados devido ao formato mesclado dos extratos de plantas. Dimech et al. (2013) encontraram alterações a nível de DNA em *S. aureus* desafiadas com *Hymenaea Stigonocarpa* Mart. Ex Hayne. Assim como o sinergismo entre antimicrobianos, conseguiu produzir em cepas MRSA alteração na síntese da parede celular, neste caso, a junção de produtos de modo controlado pode afetar a sobrevivência e patogenicidade do *Staphylococcus* spp. (Gonzales et al. 2015).

O cloro tem eficácia comprovada, tanto na rotina prática como em estudos laboratoriais (Magnusson et al. 2006, Gibson et al. 2008 e Jaenish et al. 2010). Porém este não foi tão efetivo, quando utilizado frente a leveduras, e na presença de 10% de matéria orgânica (Coutinho et al. 2012). Em relação ao *S. aureus*, o cloro foi eficaz em estudos *in vitro*, na concentração de 1%. O melhor efeito do cloro na limpeza da pele do teto pode não estar relacionado aos seus princípios ativos, e sim a forma como os procedimentos de aplicação são realizados (Magnusson et al. 2006 e Gibson et al. 2008). Porém sua utilização deve ser limitada, pois sua presença no leite pode indicar fraude de acordo com a IN 62, e de acordo com a WHO (2008), é um produto que gera nos micro-organismos o desenvolvimento da resistência.

O hipoclorito, assim como os produtos a base de iodo, a clorexidina, são comumente indicados como sanitizantes na prevenção da mastite, contudo estes produtos têm atividade diminuída na presença de material biológico e desencadeiam a seleção de micro-organismos resistentes, não sendo então uma alternativa nestes casos (Gibson et al. 2008, Jaenish et al. 2010 e Coutinho et al. 2012). Isto reforça o potencial alternativo a ser explorado dos produtos naturais, com a finalidade de profilaxia da mastite caprina.

A redução da log/UFC do AGRISEPT® foi de 3, resultados melhores do que os obtidos por Kamal e Bayoumi (2015), que obtiveram uma redução de 1 log, destacando mesmo assim a importância do pré-

dipping na diminuição de patógenos ambientais presentes no teto. A ação de limpar os animais promove uma diminuição dos mesófilos aeróbios no teto, diminuindo conseqüentemente as chances de contaminação do leite e dos tanques de armazenamento (Elmoslemany et al. 2010 e Bava et al. 2011). A higiene do úbere é importante porque influencia na qualidade do leite e é relacionada a ocorrência de patógenos, especialmente os ambientais (Manzi et al. 2012).

Um grande desafio para a indústria de laticínios é a necessidade de se reduzir o uso de compostos antimicrobianos em animais produtores de alimentos (Mukherjee et al. 2010). Assim, a utilização de fitoterápicos demonstra-se com capacidade de diminuir a população bacteriana no teto, como foi observado nesta pesquisa.

5. Conclusões

Ao utilizar o Extrato Etanólico Bruto da folha da *H. martiana* Hayne foi possível observar que há um potencial como desinfetante, mostrando que o fitoterápico pode ser uma alternativa na prevenção da mastite caprina, além disto, há na sua composição os flavonóides, quem fazem parte deste processo de ação antimicrobiana. Sendo assim, utilizar o extrato produzido da folha da *H. martiana* Hayne, é uma alternativa ao usar outras partes da planta como produto terapêutico e profilático.

Agradecimentos: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).

Referências

- Albuquerque U.P., Monteiro J.M., Ramos M.A. & Amorim E.L.C. 2007. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern. Brazil. *J. of Ethnopharmacology*, 110: 76-91
- Aleixo A. A., Camargos, V. N., Herrera, K. M. S., Andrade, A.C.S.P., dos Santos, M., Miranda, V. C., Carvalho, R. S., Magalhães, J. T., Magalhães, J. C., Lima, L. A. R.S., & Ferreira, J. M. S. 2015. Synergistic activity from *Hymenaea courbaril* L. and *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville against multidrug-resistant bacteria strains. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(26) : 741-748.
- Bava L., Zucali M., Sandrucci A., Brasca M., Vanoni L., Zanini L. & Tamburini A. 2011. Effect of cleaning procedure and hygienic condition of milking equipment on bacterial count of bulk tank milk. *Journal of Dairy Research*, 78: 211-219
- Bhasme P.C., Mahantesh M.K., Rajeshwari D.S., Rohit B.K. & Basappa B.K., 2013. In silico characterization of putative drug targets in *Staphylococcus saprophyticus*, causing bovine mastitis. *Bioinformation*, 9: 339-344.
- BRASIL. 2006. Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 18 de setembro de 2004. Diário oficial da união, Brasileira, 14 dez, seção 1, p. 8, 2006
- Bush K. & Jacoby G.A. 2010. Updated functional classification of b-lactamases. *Anti- microb Agents Chemother*, 54:969-76.
- Cazoto L.L., Martins D., Ribeiro M.G., Duran, N., Nakazato, G., 2011. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J. Antibiot.*, 64: 395-397.
- Chattopadhyay D.; Maiti K.; Kundu A. P.; Chakraborty M. S.; Bhadra R.; Maudal S. C.; Maudal A. B. 2001. Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: A folklore of bay islands. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, 77: 49-55.
- Chen, M.M.S., Boardman, W.S.J., Smith I., Goodman A.E. & Brown M.H. 2015. Characterisation of β -lactam resistance mediated by blaZ in staphylococci recovered from captive and free-ranging wallabies. *Journal of Global Ant. Resistance*. 3: 184-189.
- Cipriano J., Martins L., Deus M. S. M. & Peron, A. P. 2014. O Gênero *Hymenaea* E Suas Espécies Mais Importantes Do Ponto De Vista Econômico E Medicinal Para O Brasil. *Caderno De Pesquisa. Série Biologia*, 26 (2) : 41-51.

CLSI 2012. Institute Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard, M07-A8, 8th ed. CLSI, Wayne, PA, USA.

Coutinho, L. C.A., Medeiros, E.S., Silveira, N.S.S., Silva, L. B.G., & Mota, Rinaldo A. 2012. Eficácia in vitro de desinfetantes utilizados na anti-sepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(1) : 61-65.

Cushnie T.P.T. & Lamb A.J. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*, 38: 99-107.

Dimech G.S., Soares L.A.L., Ferreira M.A., Oliveira A.G.V., Carvalho M.C. & Ximenes, E.A. 2013. Phytochemical And Antibacterial Investigations Of The Extracts And Fractions From The Stem Bark Of *Hymenaea Stigonocarpa* Mart. Ex Hayne And Effect On Ultrastructure Of *Staphylococcus Aureus* Induced By Hydroalcoholic Extract. *The Scientific World Journal*, 2013: 1-8.

Elmoslemany A.M., Keefe G.P., Dohoo I.R., Wichtela J., Stryhna H. & Dingwell R.T. 2010. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Preventive Veterinary Medicine*, 95: 32-40.

Garcia C.S., Ueda S.M.Y., Mimica L.M.J. 2011. Avaliação da atividade antibacteriana in vitro de extratos hidroetanólicos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 70(4): 589-98.

Gleeson D., O'Brien B., Flynn J., O' Callaghan E. & Galli F. 2009. Effect of pre-milking teat preparation procedures on the microbial count on teats prior to cluster application. *Irish Veterinary Journal*, 62(7): 461-467.

Gibson H., Sinclair L.A., Brizuela C.M., Worton H.L. & Protheroe R.G. 2008. Effectiveness of selected pre-milking teat-cleaning regimes in reducing teat microbial load on commercial dairy farms. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 295-300.

Gonzales P. R., Pesesky M. W., Bouley R., Ballard A., Bidy B. A., Suckow M. A., Wolter W. R., Schroeder V. A., Burnham C. D., Mobashery S., Chang M. & Dantas G. 2015. Synergistic, collaterally sensitive β -lactam combinations suppress resistance in *Mrsa*. *Nature Chemical Biology*, 11: 855-861.

Gottardi C. P. T., Muricy R. F., Cardoso M. & Schmidt V. 2008. Qualidade Higiênica De Leite Caprino Por Contagem De Coliformes E Estafilococos. *Ciênc. Rural*, 38(3) : 743-748.

Hernandez, N. E., Tereschuk, M. L. & Abdala L. R. 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Taffí del Valle (Tucumán, Argentina). *J. Ethnopharmacol.*, 73: 317-322.

Jaenisch F. R. F., Kuchiishi, S. S., & Coldebella, A. 2010. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. *Ciência Rural*, 40(2) : 354-358.

Kamal, R.M. & Bayoumi, M.A. 2015. Efficacy of premilking and postmilking teat dipping as a control of subclinical mastitis in Egyptian Dairy cattle. *International Food Research Journal*, 22(3): 1037-1042.

Kannaiyan M., Manuel V.N., Raja V., Thambidurai P., Mickymaray S. & NooruddinT. 2012. Antimicrobial activity of the ethanolic and aqueous extracts of *Salacia chinensis* Linn. against human pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, p.S416-S420.

Klocke P., Ivemeyer S., Butler G., Maeschli A. & Heil F. 2010. A randomized controlled trial to compare the use of homeopathy and internal Teat Sealers for the prevention of mastitis in organically farmed dairy cows during the dry period and 100 days post-calving. *Homeopathy*. 99: 90-98

Koneman E.W., Allen S.D., Janda N.M., Schreckemberger P.C. & Winn Jr W.C. 2005. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*, 5th ed., Medis, Rio de Janeiro, 1465p.

- Kummee P., Borisutpeth M., Chanlun S., Kanbutra P. & Chanlun, A. 2015. Efficacy of guava leaf extract as alternative pre-milking teat dipping in reducing teat-end bacterial load of milking dairy cows. *Int J Pharm Pharm Sci*, 7(9): 434-438.
- Langoni, H. 2013. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, 33(5):620-626
- Magnusson M., Christiansson A., Svensson B. & Kolstrup C. 2006. Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk. *J Dairy Sci.*, 89: 3866–3875.
- Manzi M.P., Faccioli P.Y., Nobrega D.B., Troncarelli M.Z. & Langoni H. 2012. Relationship between teat-end condition, udder cleanliness and bovine subclinical mastitis. *Res. Vet. Sci.*, 93:430-434.
- Medeiros E.S., Santos M.V., Pinheiro Junior J.W., Faria E.B., Wanderley G.G., Teles J.A.A. & Mota, R.A. 2009. Avaliação in vitro da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.* 29(1): 71-75.
- Mishra B.B. & Tiwari, V.K. 2011 Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem.*, 46: 4769–4807.
- Mothana R.A.A. & Lindequist U. 2005. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 177–181.
- Mukherjee R., De U.K. & Ram G.C., 2010. Evaluation of mammary gland immunity and therapeutic potential of *Tinospora cordifolia* against bovine subclinical mastitis. *Tropical Animal Health Production*, 42: 645-651.
- Oliver S. P., Lewis M. J., Ingle T. L., Gillespie B.E. & Methews, K. R. 1993. Premilking teat disinfection for the preservation of environmental pathogen intramammary infections. *Journal of Food Protection*, 56: 852-5.
- Olsen J.E., Christensen H. & Aarestrup F.M. 2006. Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother*, 57: 450–60.
- Palaniappan K., Holley R.A. 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int. Journal of F. Microbiology*, 140: 164-168.
- Peixoto R.M., Araújo R.M.P., Peixoto L.J.S., Bomfim S.A.G., Silva T.M.G., Silva T.M.S., Almeida J.R.G.S., Mota R.A. & Costa M.M. 2015. Treatment Of Goat Mastitis Experimentally Induced By *Staphylococcus Aureus* A Formulation Containing *Hymenaea Martiana* Extract. *Small Ruminant Research*, 130: 29-235.
- Royster E. & Wagner S. 2015. Treatment of Mastitis in Cattle. *Vet Clin Food Anim.*, 31: 17–46.
- Sá M.C.A., Peixoto R.M., Krewer C.C., Almeida J.R.G., Vargas A.C. & Costa M.M. 2011. Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. *R. bras. Ci. Vet.*, 18(23): 62-66.
- Sartoratto A., Machado A. L. M., Delarmelina C., Figueira G. M., Duarte M. C. T., & Rehder V. L. G. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(4): 275–280.
- Schnitzler P., Nolkemper S., Stintzing F.C., Reichling J. 2008. Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. *Phytomedicine*, 15: 62–70.
- Silva M.E.G.S., Guimarães A.L., Oliveira A.P., Araújo C.S., Siqueira Filho J.A., Fontana A.P., Damasceno P.K.F., Branco C.R.C., Branco A. & Almeida J.R.G.S. 2012. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). *J. Chem. Pharm. Res.*, 4: 1160-1166.

Thoria O.O., Galal M.A., Ashour N.A. & Hussain A.M. 2011. Treatment of experimentally induced mastitis in Nubian goats by *Staphylococcus aureus* using methanolic extract of *Terminalia brownii* leaves. *J. Sci. Technol.*, 12: 32-37

Traesel C.K., Lopes S.T.A., Wolkmer P., Schmidt C., Santurio J.M. & Alves S.H. 2011. Óleos essenciais como substituintes de antibióticos promotores de crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. *Ciência Rural*, Santa Maria, 41(2): 278-284.

Viegi L., Pieroni A., Guarrera P.M. & Vangelisti R. 2003. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *Journal of Ethnopharmacology*, 8: 221-244.

Wendlandt S., Febler A.T., Monecke S., Ehricht R., Schwarz S. & Kadlec K. 2013. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *Inter. Journal of Med. Microbiology*, 303: 338-349.

WHO 2008. Benefits and risks of the use of chlorine-containing disinfectants in food production and food processing: report of a joint FAO/WHO expert meeting, Ann Arbor, MI, USA, 27-30 May 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/i1357e/i1357e.pdf>> Acesso em 12 nov. 2016

Lista de Tabela (Quadros)

Quadro 1. Médias obtidas para UFC/cm² nos diferentes tempos experimentais em cabras tratadas duas soluções diferentes, 2015.

Para cada momento, valores seguidos por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ($P > 0,05$);

Para cada grupo, valores seguidos por letras minúsculas iguais não diferem entre si ($P > 0,05$);

T0- tempo sem imersão (controle), T1- UFC/cm² após um minuto de ocorrida a imersão; T2- UFC/cm² após 30 minutos de ocorrida a imersão e T3- UFC/cm² após uma hora de ocorrida a imersão.

Lista de Figuras

Figura 1. Cromatograma (HPLC-DAD em 310nm) do extrato etanólico das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne.

Figura 2: Comparação da Concentração Bactericida Mínima entre isolados são *blaZ* positivo ou *blaZ* negativo e dois diluentes utilizados no EEB da *H. martiana*. Na figura **A** há a comparação entre os diluentes utilizados e os isolados que não possuem o gene *blaZ*. Na figura **B** há a comparação entre os diluentes utilizados e os isolados que possuem o gene *blaZ*.

Quadro 1.

	T0	T1	T2	T3
Jatobá	16 x 10 ³ Aa	2,3 x 10 ³ Ab	2,1x 10 ³ Ab	1,6x 10 ³ Ab
Cloro	9,7x10 ³ Aa	4,7x10 ² Aab	4,4x10 ² Aab	2,3x10 ³ Ab

Figura 1.

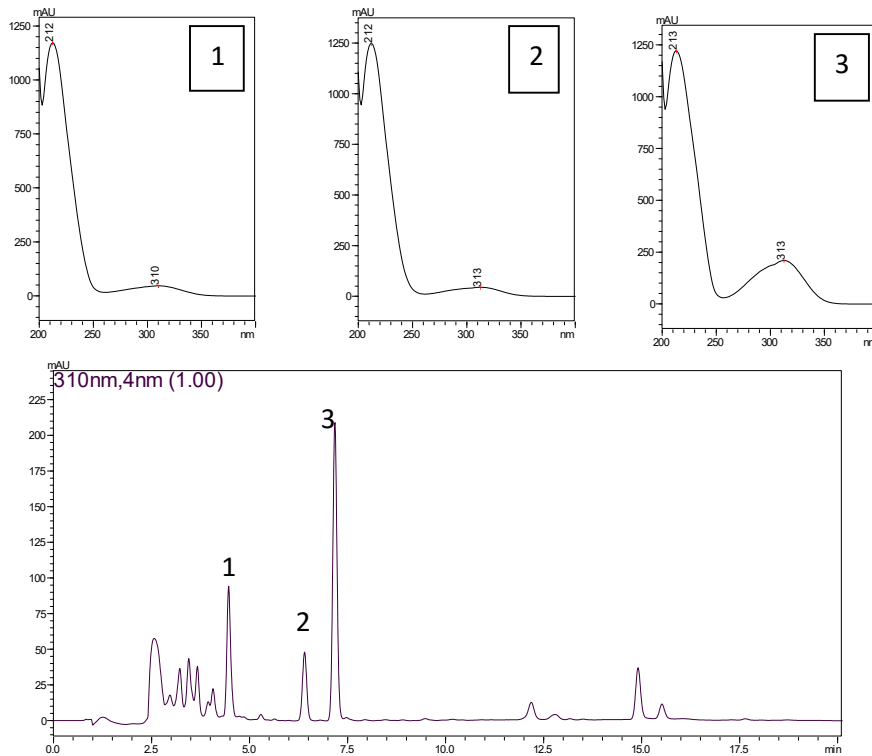
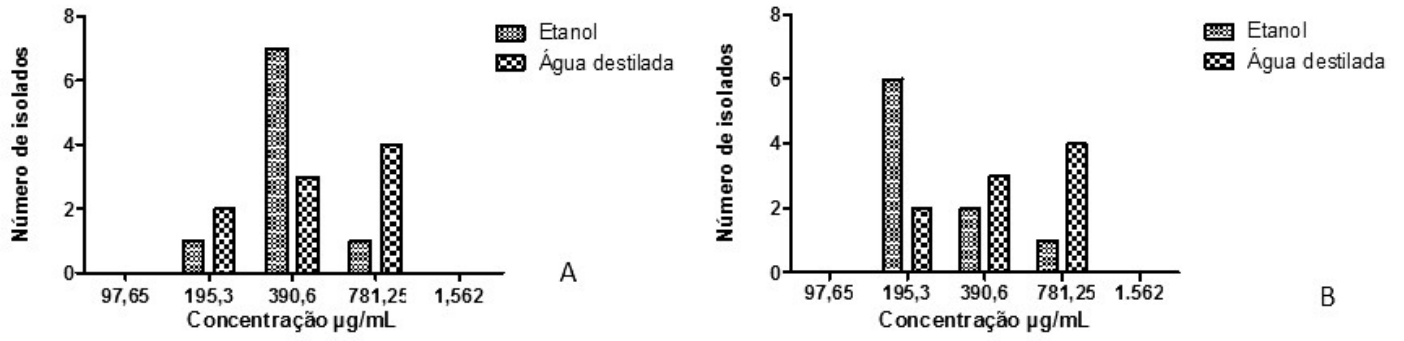


Figura 2.



4. CONCLUSÕES

Os flavonóides se mostraram como produtos dominantes no EEB da folha da *Hymenaea martiana* Hayne, porém são necessárias técnicas mais apuradas para melhor caracterização. O EEB seja diluído em água destilada autoclavada ou em álcool absoluto, demonstrou atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus* spp. Quanto aos isolados possuírem ou não o gene *blaZ* não se destacou como fator determinante na quantificação da CBM. Nas condições deste estudo, a solução elaborada a partir do extrato etanólico da planta *H. martiana* Hayne (jatobá) apresentou a capacidade de reduzir as contagens bacterianas na pele dos tetos, obtendo atividade pareada com o produto comercial à base de hipoclorito. Assim, a utilização de produtos naturais na medicina veterinária, é uma alternativa na prevenção das doenças infecciosas e ambientais causadas por micro-organismos.

Anexo 1 – Carta de aprovação no Comitê de Ética em Estudos Humanos e Animais da UNIVASF.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
Comitê de Ética em Estudos Humanos e Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Extrato etanólico de plantas na prevenção da mastite caprina ocasionada por *Staphylococcus spp*”, Protocolo nº 0001/101214, que utilizam 36 animais da espécie *Capra Hircus*, sob a responsabilidade de Dielson da Silva Vieira, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Certify that the project entitled “Ethanol extract of plants in the prevention of goat mastitis caused by *Staphylococcus spp*”, protocol number 0001/101214, utilizing 36 animals species *Capra Hircus*, under the responsibility Dielson da Silva Vieira, being in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by Committee of Ethics and Deontology Studies and Research at the Federal University of Vale do São Francisco.

Petrolina, 23 de janeiro de 2015.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alexandre H. Reis', written over a horizontal line.

Prof. Alexandre H. Reis
Coordenador do Comitê de Ética em Estudos Humanos e Animais
UNIVASF