



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO SEMIÁRIDO

Isamara Ferreira da Silva

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO
DE *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett.) FRENTE
A *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE CASOS DE MASTITE
EM RUMINANTES**

Petrolina - PE

2015

Isamara Ferreira da Silva

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO
DE *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett. FRENTE
A *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE CASOS DE MASTITE
EM RUMINANTES**

Trabalho apresentado a Universidade Federal
do Vale do São Francisco – UNIVASF, *Campus*
Ciências Agrárias, como requisito da obtenção
Do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matuizzi da Costa
Co-orientadora: Xirley Pereira Nunes

Petrolina - PE

2015

	Silva, Isamara Ferreira
S586a	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de <i>commiphora leptophloeos</i> (mart.)J.B. Gillett. frente a <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de casos de mastite em ruminantes / Isamara Ferreira Silva. - - Petrolina, 2015.
	66 f.:il.
	Dissertação (Mestrado Ciências Veterinárias no Semiárido) – Universidade Federal Do Vale do São Francisco, <i>Campus</i> Ciências Agrárias, Petrolina-PE, 2015.
	Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa.
	1.Fitoterapicos. 2. Alternativa antimicrobiana. 3. Isolados bacterianos. 4. Bioma caatinga – medicina alternativa. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.
	CDD 615.53

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca SIBI/UNIVASF
Bibliotecário (a) Maria Betânia de Santana da Silva – CRB4-1747.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO SEMIÁRIDO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Isamara Ferreira da Silva

Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da *Commiphora leptophloeos* (Mart.)
J.B.Gillett.) Frente a *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite em
ruminantes

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Veterinárias no Semiárido, pela Universidade
Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 28 de julho de 2015

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Professora Dra. Tânia M^a Sarmiento da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Professor Dr. Rodolfo de Moraes Peixoto
Instituto Federal do Sertão de Pernambuco

Aos meus pais Maria de Jesus e Cicero Filho

Aos meus irmãos: Maraisa, Jefferson e Isa da Cásia

Aos meus tios Ana Cássia e Sena Rodrigue

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por está em todos os momentos na minha vida me guardando e conduzindo meus passos “O Senhor é a minha força, razão do meu viver”.

Aos meus pais, Cícero Filho e Maria de Jesus, meus irmãos, Maraisa, Jefferson e Isa de Cássia, pelo amor e compreensão. Não posso deixar de agradecer a minha tia Ana Cássia e a sua família por toda ajuda paciência e carinho.

A Universidade Federal do Vale do São Francisco e ao programa de Pós-Graduação Ciências Veterinárias no Semiárido, pela oportunidade na realização de mais um sonho.

Anossa querida coordenadora, professora Maria Helena Matos pelo carinho, dedicação e total empenho em sempre nos ajudar.

Ao meu orientador, Prof. Mateus Matiuzzi da Costa, pelos conhecimentos transmitidos, apoio, paciência e orientação na finalização do meu mestrado. Obrigada pela confiança e por acreditar na minha capacidade. Que Deus te abençoe sempre.

A Professora Xirley Pereira Nunes, pelo apoio e disponibilidade de ter nos ajudado juntamente com a Amanda Guimarães na preparação dos extratos.

A professora Tânia Maria Sarmiento da Silva, por ter nos dedicado um pouquinho de seu tempo nos ajudandocom as análises fitoquímicas dos extratos.

Ao Professor Rodolfo de Moraes Peixoto, que nos ajudou nas estatísticas. Foi de grande valia a sua ajuda.

Aos meus colegas de Laboratório, pelas ajudas, experiências, alegrias e tristezas divididas. Em especial quero agradecer a Renata, pelo apoio e carinho, Naedja, Nara, Samily, Naiana, Naiane, Ceiça, Michelline, Evandro, Vinícius, Dielson, Rafael Libório, Jeniffer, Izabela e Jamile Cordeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pós-graduação.

A todos os funcionários do *Campus* de Ciências Agrárias da UNIVASF.

Enfim a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização de mais um sonho.

Muito Agradecida a todos

Isamara Ferreira da Silva

Deus não disse que seria fácil,
mas disse que a chegada valeria a pena!
(Max Lucado)

RESUMO

A mastite constitui-se como um dos problemas de maior relevância para a pecuária leiteira, acarretando sérios prejuízos, como diminuição da produção e alteração físico-química do leite. O grande problema para os produtores de leite é o fracasso no tratamento da mastite relacionado principalmente, a resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais. Visando o potencial terapêutico das plantas medicinais como alternativas a antibioticoterapia, a pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana da *Commiphora leptophloeos* frente a isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de leite de ruminantes com mastite. Para isso, foi preparado o extrato etanólico bruto das cascas e folhas da *Commiphora leptophloeos*. Na sequência, os extratos foram avaliados quanto aos seus efeitos antimicrobianos, frente a isolados de *Staphylococcus* spp. através da técnica de microdiluição em caldo para determinação da concentração bactericida mínima. Além disso, os extratos foram avaliados quanto a sua capacidade em interferir com a formação do biofilme e com o biofilme já consolidado. Embora todos os extratos testados tenham exibido ação antimicrobiana, melhor atividade foi registrada para o extrato da casca. O extrato da folha apresentou maior atividade na concentração 3,125 µg/ml (36 /60) e o EEB da casca na concentração 781,2 µg/ml (25/60). Os extratos da cascas e folhas foram capazes de interferir com as etapas iniciais da formação do biofilme, por outro lado não foi observada interferência do extrato no biofilme já consolidado. Observou-se uma alta sensibilidade dos *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de mastites em ruminantes, quando submetidos aos extratos da folha e casca da *Commiphora leptophloeos*, bem como a capacidade dos extratos em interferir na formação do biofilme, indicando seu potencial para uso na terapia das mastites em ruminantes.

Palavras-chave: Infecção intramamária, *Staphylococcus* spp., extrato de plantas, atividade antimicrobiana, biofilme.

ABSTRACT

Mastitis is constituted as one of the major problems for the dairy industry, causing serious damage, such as decreased production and physicochemical changes of milk. The major problem for dairy farmers is the failure to treat mainly related mastitis, bacterial resistance to conventional antibiotics. Seeking the therapeutic potential of medicinal plants as alternatives to antibiotic therapy, the research aims to evaluate the antimicrobial activity of *Commiphora leptophloeos* over *Staphylococcus* spp. from ruminant mastitis. For this, we prepared the ethanol extract of the bark and leaves of *Commiphora leptophloeos*. Then, the extracts were evaluated for its antimicrobial effects over *Staphylococcus* spp., through the microdilution technique in broth to determine the minimum bactericidal concentration (MBC). Moreover, the extracts were evaluated for their ability to interfere with biofilm formation and consolidated biofilm. Although all the extracts tested have exhibited antimicrobial action, MBC lower values were recorded for the bark extract. The leaf showed a higher active in 3.125 mg / ml (36/60) concentration and the bark's Gross Ethanolic Extract (GEE) in 781.2 g / ml concentration (25/60). The extracts of bark and leaves were able to interfere with the initial steps of biofilm formation. On the other hand the extract did not interfered in the consolidated biofilm. *Staphylococcus* spp. from ruminants with mastitis showed a high sensitivity, when subjected to *Commiphora leptophloeos* leaf and bark extract, as well the ability to interfere with biofilm formation, indicating its therapeutic potential in ruminant mastitis.

Key-words: Intramammary infection, *Staphylococcus* spp., plant extract, ant microbiological activity, biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Artigo

- Figura 1.** Comparação da resistência dos isolados *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos e a presença ou não do gene *blaZ*..... 62
- Figura 2.** Distribuição dos valores de CBM dos EEB das cascas e folhas da *Commiphora leptophoeos* sobre os isolados de *Staphylococcus* spp..... 62

LISTA DE QUADROS

Artigo

Quadro 1.	Origem e classificação dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp., utilizados no presente estudo.....	60
Quadro 2.	Perfil de resistência dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp., de acordo com a presença ou não do gene <i>blaZ</i>	61
Quadro 3.	Concentração bactericida mínima dos EEB da <i>Commiphora leptophloeos</i> frente a isolados de <i>Staphylococcus</i> oriundos de mastite em ruminantes.....	61

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion Broth
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCS	Contagem de Células Somáticas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Ótica
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EtOH	Etanol
MH	Muller-Hinton
MRSA	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
NaCl	Cloreto de Sódio
SCN	Staphylococcus Coagulase Negativa
SCP	Staphylococcus Coagulase Positiva
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TSA	Trypticase soy agar
TSB	Triptic Soy Broth

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
SUMÁRIO	14
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Características do leite.....	16
2.2 Aspectos gerais da mastite.....	18
2.3 Gênero <i>Staphylococcus</i>	21
2.3.1 <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa.....	22
2.3.2 <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva.....	23
2.4 Antimicrobiano terapia: visão geral.....	24
2.5 Antibióticos β -lactâmicos e Resistência bacteriana.....	25
2.6 Biofilmes.....	28
2.7 Novas alternativas na terapia da mastite.....	30
2.7.1 <i>Commiphora leptophloeos</i>	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivos geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
Artigo. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de <i>Commiphora leptophloeos</i> (Mart.) J. B. Gillett. frente a <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de casos de mastite em ruminantes.....	49
5 CONCLUSÕES	63

1 INTRODUÇÃO

A mastite é uma das doenças que tem causado grandes prejuízos as indústrias leiteiras (BAGCIGIL et al., 2012; HEIKKILA et al., 2012), ameaçando a renda dos agricultores, bem como a imagem do setor leiteiro. Isso deve-se aos problemas de bem-estar animal e as questões relacionadas com a qualidade do leite e de saúde pública, devido ao aumento do risco de resíduos no leite, através do uso dos antibióticos em critérios técnicos adequados e a seleção de bactérias resistentes (OSTERÅS; SOLVEROD, 2009; DE VLIEGHER et al., 2012). Dentre os prejuízos, a redução na produção leiteira é vista como fator crítico de maior importância, já que a maioria dos casos de mastite correspondem às infecções subclínicas, não sendo detectadas facilmente e comprometendo com isso a produção animal.

Nas inúmeras etiologias envolvidas nos casos de mastites, a infecção bacteriana é a mais comumente relatada pela literatura. Bactérias do gênero *Staphylococcus* são as mais isoladas nos casos de infecções intramamárias no Brasil e no mundo (TENHAGEN et al., 2006; OSTERÅS; SOLVEROD, 2009). A grande questão é o fato de que os *Staphylococcus* spp., apresentam complexos mecanismos de virulências que tornam sua erradicação difícil. Essas bactérias tem se tornado um grande problema nos rebanhos leiteiros pela facilidade de adquirirem resistências aos antimicrobianos utilizados no tratamento da doença, tornando difícil sua eliminação.

Os antimicrobianos demonstraram ser medicamentos potentes para o controle de doenças infecciosas e continuam a ser uma das mais significativas descobertas da medicina moderna (ABREU et al., 2012). A antimicrobianoterapia é a principal ferramenta no tratamento da mastite. No entanto, o uso é indiscriminado desses medicamentos em animais de produção, sendo muitas vezes realizado sem orientação adequada de médicos veterinários, e, ao contrário dos antimicrobianos da linha humana, sem qualquer tipo de controle oficial, levando a seleção de micro-organismos resistentes (HARBOTTLE et al., 2006).

O crescente número de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos utilizados na profilaxia de doenças infecciosas tem despertado os profissionais de saúde a recorrerem a tratamentos alternativos (GODREUIL et al., 2014).

As plantas medicinais, em particular os seus componentes ativos, têm sido uma fonte confiável de terapêuticas para o tratamento de várias doenças desde

antiguidade. A rápida propagação da resistência aos antibióticos levou a humanidade a usar plantas como uma fonte confiável para a descoberta de agentes antimicrobianos ativos e possivelmente, até mesmo novas classes desses medicamentos (HEMAISWARYA; DOBLE, 2009).

O Brasil possui a flora mais rica do mundo, abrigando uma variada biodiversidade de plantas nativas e exóticas distribuídas entre cinco principais biomas, entre eles a Caatinga, único bioma de exclusividade brasileira, encontrada apenas na região Nordeste (MAURY, 2002). Uma grande diversidade das plantas nativas da caatinga são utilizadas como medicamentos naturais por populações locais para cura de vários tipos de doenças. Contudo as propriedades curativas dessas plantas são baseadas apenas em conhecimentos empíricos, necessitando de estudos científicos que validem as características terapêuticas e eficácias dessas plantas.

Dentre as plantas utilizadas pela população nordestina como medicamentos naturais se encontra a *Commiphora leptophloeos* conhecida popularmente como Imburana-de-cambão, umburana, imburana-braba, imburana-de-espinho, imburana-fêmea, imburana-vermelha, jamburana e umburana (SAMPAIO et al., 2005). É uma espécie da flora brasileira, típica de caatinga, ocorrendo com elevada frequência no Vale médio do São Francisco sendo uma espécie característica do nordeste brasileiro (PEREIRA et al., 2004; PNE, 2012). Na medicina popular é utilizada como xarope (contra tosses e bronquites), tônico, e cicatrizante, no tratamento de feridas, gastrite e úlceras (SAMPAIO et al., 2005).

Como tantas outras espécies da caatinga, a *Commiphora leptophloeos* é uma espécie pouco estudada quanto a seu uso terapêutico. Desta forma busca-se realizar um trabalho que avalie a atividade antimicrobiana desta planta, trazendo contribuições sobre essa espécie nativa da Caatinga. É de extrema importância o estudo científico da potencialidade da *Commiphora leptophloeos* contra agentes causadores de mastites em ruminantes com finalidade de produzir elementos para sua aplicação no tratamento de animais portadores. Além disso, o conhecimento, análise, avaliação e efetivo uso dos recursos naturais disponíveis no semiárido, de forma racional, podem auxiliar significativamente na manutenção da biodiversidade e promoção do desenvolvimento científico e socioeconômico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do leite

Os alimentos de origem animal atualmente têm sido motivo de preocupação entre os consumidores. Negligenciar a qualidade e inocuidade dos produtos lácteos é um risco que pode gerar perda dos mercados internos e de exportação, restringindo o desenvolvimento do setor nacional leiteiro. A qualidade do leite pode ser avaliada de acordo com as condições higiênico-sanitárias adotadas em toda a cadeia produtiva, dietético, nutricionais, tecnológicos e sensoriais (MORAND-FEHR et al., 2007).

O leite é o produto normal, fresco, integral, oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (RIISPOA, art. 475, 1996). Visto como o alimento *in natura* mais completo, o leite oferece uma equilibrada composição de nutrientes (proteínas, gorduras, carboidratos e sais minerais) essenciais ao crescimento e a manutenção de uma vida saudável (SILANIKOVE et al., 2010; KAPILA et al., 2013). A composição do leite pode apresentar diferenças entre espécies animais. Uma vez que as necessidades nutricionais e fisiológicas são geralmente específicas a cada espécie (PARK, 2006).

O estado de saúde e a alimentação exercem grande influência sobre a produção e a qualidade do leite. Se o animal for acometido por alguma doença ou caso a dieta fornecida não atenda as exigências nutricionais necessárias, todo o metabolismo do animal será afetado, ocasionando redução na produção, principalmente, nos níveis de gordura e proteína do leite (RICCI; DOMINGUES, 2012). Uma das causas que exerce influência negativa sobre a composição e as características físico-químicas do leite é a mastite, acompanhada por um aumento na contagem de células somáticas (CCS) no leite (KITCHEN, 1981).

A disponibilidade de nutrientes no leite, sua alta atividade de água e seu pH próximo da neutralidade torna-o um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de micro-organismos (ARCURI et al., 2006). Sendo as bactérias as principais responsáveis por acarretar alterações físico-químicas na sua composição. Bactérias patogênicas, tais como *Staphylococcus* spp., são muito indesejáveis no leite, grupo bacteriano que provoca fermentação acidificante da

glicose e queda no pH. Contudo existe uma preocupação maior em torno dos *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxinas termorresistentes, que não são eliminadas no processo de pasteurização do leite, podendo levar ao surgimento de doenças graves no consumidor (SKEIE, 2014)

Assim a qualidade higiênica do leite é a ausência de agentes físicos, químicos ou biológicos resultantes da manipulação deficiente da matéria prima ou dos produtos derivados dela. Os riscos para a saúde incluem além dos microbiológicos, também os toxicológicos-farmacológicos. A persistência de resíduos de antimicrobianos no leite varia com o produto e depende de vários fatores como, por exemplo, dose e via de administração no tratamento de enfermidades de animais leiteiros com esses medicamentos (NASCIMENTO et al., 2001). O nível de inocuidade dos produtos lácteos representa a responsabilidade da cadeia do leite para com a sociedade e compromisso assumido com a saúde da população.

São muitas espécies pecuárias empregadas na produção leiteira no Brasil e no mundo, destacando-se principalmente as espécies bovinas, bubalinas e caprinas. O leite bovino é considerado um dos alimentos de maior importância na alimentação humana. É rico em proteína, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas A e D dentre outros. O leite oferece, também, elementos anticarcinogênicos, presentes na gordura, como o ácido linoléico conjugado, esfingomiéline, ácido butírico e betacaroteno. A produção e o consumo de leite de vaca e derivados têm crescido no Brasil e em muitos países em desenvolvimento.

Em comparação com o leite de vaca o leite de búfala é mais concentrado, apresentando características que permitem a sua fácil identificação físico-química e organoléptica. É um ingrediente altamente adequado para a produção de uma grande variedade de produtos derivados de leite, tais como o queijo, gordura de manteiga, sorvete, iogurte e (FUNDORA et al., 2001; MÉNARD et al., 2010). A gordura constitui a principal fração do leite de búfala e é responsável por seu alto valor energético e nutritivo. Assim, é importante do ponto de vista nutricional nos países que se produzem búfalos. No entanto, as informações sobre a composição química e as características físicas da gordura do leite de búfala é escassa, em comparação ao leite de vaca (MÉNARD et al., 2010).

A produção de leite dos bubalinos é uma atividade que tem crescido nos últimos anos no Brasil, particularmente nos Estados da região Sudeste, onde o leite é destinado, quase na sua totalidade, à produção de queijo tipo 'Muzzarella', que

tem mercado assegurado com preços compensatórios (MADELLA-OLIVEIRA et al., 2005). Entretanto, no Brasil a produção leiteira de búfalas ainda é pequena em comparação com outros países como a China, Índia e Paquistão, onde o leite de búfala se encontra no topo da produção de leite (MURTAZA et al., 2014).

O leite de cabra é uma excelente fonte de alimento de alto valor nutritivo e alta digestibilidade, sendo recomendado particularmente, para indivíduos que sofrem de problemas digestivos e intolerância ao leite bovino (LANGONI et al., 2006). O leite é rico em proteínas, gordura, lactose, vitaminas e sais minerais, exibindo algumas peculiaridades quando comparado ao leite bovino (MORAND-FEHR et al., 2007). Apresenta uma coloração branca pura. Sua composição varia de acordo com vários fatores, entre estes, a raça, estágio de lactação, ciclo estral, condições ambientais, estação do ano, alimentação, cuidados dispensados ao estado de saúde do mesmo (RIBEIRO & RIBEIRO, 2001). O leite de cabra tem, um odor e sabor atraente aceitável, e pode ser consumido como uma alternativa ao leite de vaca, porque é menos alergênicos (PARK et al., 2007).

A caprinocultura representa uma atividade pecuária importante para a maioria dos países, porém está mais concentrada nas regiões tropicais e/ou semiáridas. No Brasil, leite de cabra é produzido em pequena escala e, muitas vezes, processada, em condições artesanais, no próprio capril (ANDRADE et al., 2008).

2.2 Aspectos gerais da mastite

A mastite é uma doença contagiosa cuja disseminação vai depender mutuamente da resistência do hospedeiro, meio ambiente e dos agente infecciosos (ZHAO; LACASSE, 2008; DE VLIEGHER et al., 2012). Caracterizada por um processo inflamatório da glândula mamária é conhecida como uma das principais doenças que afetam a pecuária leiteira, promovendo alterações físico-químicas, bacteriológicas e sensoriais no leite, comprometendo seu consumo *in natura* e a industrialização do produto e derivados (LANGONI et al., 2001; RADOSTITS et al., 2002; HEIKKILA et al., 2012).

As alterações na composição do leite, ocorrem pela modificação da permeabilidade dos vasos sanguíneos da glândula e alterações na habilidade de síntese do tecido secretor e também pela ação direta dos patógenos ou enzimas

sobre os componentes já secretados no interior da glândula (MACHADO et al., 2000).

A infecção da glândula mamária pode ocorrer em seres humanos (MACDONALD et al., 2012; MEDIANO et al., 2014;) e mais frequentemente em ruminantes como: bovinos (EL-JAKEE et al., 2013; GODDEN et al., 2013; HUANG et al., 2014), caprinos (CHU et al., 2012; KUMAR et al., 2013; JACOMÉ et al., 2014), ovinos (MARÉCHAL et al., 2011; BONNEFONT et al., 2011) e bubalinos (NG et al., 2010; GUHA et al., 2012), além de outros mamíferos.

A mastite pode se apresentar na forma clínica e subclínica dependendo da intensidade da inflamação (BERGONIER; BERTHELOT, 2003; DE VLIEGHER et al., 2012). A forma clínica é de fácil diagnóstico, marcada por respostas inflamatórias visíveis no tecido mamário e no leite (LEITNER et al., 2004; LE MARÉCHAL et al., 2011). Seu diagnóstico é baseado na sintomatologia apresentada pelo animal, como inflamação do úbere e secreção patológicas no leite. Já forma subclínica apresenta prevalência maior que a anterior, sem alterações macroscópicas visíveis no animal e no leite. As perdas econômicas estão associadas com a diminuição da produção e qualidade do leite (PERSSON; OLOFSSON, 2011; DE VLIEGHER et al., 2012; PILLA et al., 2013). É necessário a utilização de exames complementares para seu diagnóstico, baseados no conteúdo celular do leite (contagem de célula somática – SCC), bem como sua análise bacteriológica, a fim de adotar métodos de tratamento e medidas de controle e profilaxia adequadas (O OSTERÅS; SOLVEROD, 2009; BALLOU, 2012; PILLA et al., 2013).

A mastite ainda caracteriza-se pela sua complexidade etiológica, podendo ser causada por agentes físicos, químicos ou biológicos, destacando-se as de naturezas infecciosas causadas por agentes patogênicos principalmente por bactérias. Geralmente relacionada ao manejo na ordenha, onde o animal está mais exposto a esses micro-organismos (ZHAO; LACASSE, 2008).

Os agentes patogênicos que causam mastite são divididos quanto a sua forma de transmissão em ambientais e contagiosos. Os reservatórios dos agentes ambientais podem ser veiculados do ambiente para a glândula mamária, e incluem o cocho, o pasto, solo, fezes, ar e água, sendo as bactérias isoladas a partir da pele, extremidades e canais das tetas, onde eles podem ter acesso à glândula causando infecção intramamária. Representados especialmente por *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis* (CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011; KATHLEEN et al., 2013).

Em contrapartida os agentes contagiosos tem como reservatório a glândula mamária e canal do teto e conseqüentemente, estas bactérias são transmitidas de uma fêmea infectada para outra sadia, geralmente no momento da ordenha, pelas mãos do ordenhador, do próprio equipamento de ordenha ou pelo bezerro ao mamar. Compreendem principalmente *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011). Vale ressaltar que a microbiota, hospedeiro e / ou fatores ambientais podem induzir os agentes ambientais a se comportarem como patógenos contagiosos ou vice-versa (CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011).

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* estão entre os principais micro-organismos causadores de mastites, destacando-se os *Staphylococcus aureus* reconhecidos como sendo os agentes etiológicos mais isolados em casos de mastite no mundo (GODDEN et al., 2002; TENHAGEN et al., 2006; PIEPERS et al., 2007). Os *Staphylococcus* spp., também destacam-se pela capacidade de se tornar resistente a um grande número de antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite (FREITAS et al., 2005; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

A alta prevalência da mastite no rebanho vem causando grande impacto econômico e social em todo o mundo, devido à redução na produção leiteira, gastos com tratamentos, perda na qualidade e descarte de leite contaminado (HOGEVEEN et al., 2011; EL BEHIRY et al., 2012). Ainda é vista como um risco em potencial a saúde pública uma vez que o leite pode servir como transmissor de micro-organismos patogênicos e enterotoxinas (BARKEMA et al., 2009; EL-JAKEE et al., 2013).

A mastite é a enfermidade de maior impacto nas propriedades leiteiras, sendo uma doença complexa e ampla (DAVIES et al., 2008). Pode ser causada por vários micro-organismos e condicionada por vários fatores, somando-se à especificidade de tratamento a cada um dos agentes, torna-se ainda mais difícil o seu tratamento (LOPES et al., 2013). O elevado impacto econômico evidencia a necessidade de monitoramento da doença, para diminuir os prejuízos causados pela mesma. A utilização indiscriminada de antibióticos no tratamento da mastite, pode levar a ocorrência de cepas resistentes de *Staphylococcus* spp., a esses medicamentos, comprometendo o controle e a profilaxia da doença (MOTA et al., 2012).

Segundo Thompson-Crispi et al (2014), a diversidade, bem como a variação na prevalência e abundância de organismos causadores de mastite, e ainda a variação na resposta do hospedeiro, podem fazer da mastite uma doença complexa, que continua a ser um problema para a indústria de laticínios.

O maior desafio atualmente é tentar reduzir o uso de antibióticos em tratamentos de mastites, aumentando a capacidade dos animais de resistir à infecção. Contudo, esta estratégia vai depender de uma melhor compreensão da resposta imune do hospedeiro nas fases iniciais da infecção. Uma vez que, o efeito, o estabelecimento, persistência, e a gravidade da infecção são dependentes da rapidez e eficácia da resposta do hospedeiro contra o agente patogénico invasor (BANNERMAN, 2009).

2.3 Gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* do grego *Staphyle* – cachos de uva – e *coccus* – grãos foi descrito pela primeira vez em 1880, em pus de abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston e em 1884 o físico e microbiologista Friedrich Julius Rosenbach, realizou os primeiros cultivos deste micro-organismo em meio sólido e em 1890, isolado de glândulas bovinas inflamadas (SANTOS et al., 2007). Estes micro-organismos são divididos em dois grupos: *Staphylococcus* spp. Coagulase Positiva (SCP) e *Staphylococcus* spp. Coagulase Negativa (SCN) baseado na capacidade ou não de coagular o plasma sanguíneo, pela produção de estafilocoagulase. A produção de coagulase está correlacionada à patogenicidade. Embora os *Staphylococcus* spp. coagulase negativos sejam pouco virulentos, alguns ocasionalmente causam doenças nos animais e no homem (ZECCONI; HAHN, 2000; TAPONEN; PYORALA, 2009; McADOW et al., 2012).

São caracterizados como cocos Gram-positivos que podem se dividir em mais de um plano, formando aglomerados de células que lembram cachos de uvas. São imóveis, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos em que seu metabolismo fermentativo produz ácido e não gás. Ainda são conhecidos como bactérias não-esporulada, apresentam catalase positiva, oxidase negativa e capacidade de se multiplicarem em meio contendo até 10% de NaCl, com temperatura ótima de crescimento a 37°C. As colônias de *Staphylococcus* spp. são geralmente brancas, opacas e com mais de 4 mm de diâmetro, no entanto as colônias de *S. aureus*

isolados de bovinos e seres humanos são amarelo-douradas, e de algumas coagulase negativa também são pigmentadas (PARDO; SERRALLACH, 2006;SUZUKI et al.,2012).

Os *Staphylococcus* spp. são transmitidos por contato direto e indireto (VAUTOR et al., 2005). Estão amplamente distribuídos no mundo todo, como comensais na pele de animais e na de humanos. São relativamente estáveis no meio ambiente. São responsáveis por causar várias doenças, que acometem tanto humanos quanto animais, que vão desde infecções cutâneas localizadas a infecções sistêmicas graves (FRANCIS et al., 2005; WEESE; DUIJKEREN, 2009; RASMUSSEN et al., 2011).

2.3.1 *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (SCN)

As espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (SCN), são grupos de bactérias antes consideradas não-patogênicas, mas, atualmente, vem ganhando cada vez mais atenção, principalmente pela multirresistência aos antimicrobianos de largo espectro (SINGHAL et al.,2006; SHITTU et al., 2006).

Micro-organismos oportunistas que podem se aproveitar de hospedeiros imunocomprometidos causando infecções graves (CHANG et al., 2003), encontradas geralmente compondo o microbioma cutâneo, embora colonizem o trato respiratório superior e mucosas dos seres humanos e animais (OLIVER et al., 2003; OLIVARES et al., 2012; HAN et al., 2013).

Essas bactérias são patógenos de menor interesse na mastite, porem podem causar mastite clínica e subclínica (GILLESPIE et al., 2009). Não são tão patogênicos como *S. aureus*, contudo, causam infecções persistentes, que podem resultar em aumento de CCS do leite, provocando danos ao úbere e diminuição da qualidade e produção do leite. Infecções causadas por essas bactérias tem maior ocorrência em propriedades onde não se praticam *pré e pos-dipping* (OLIVER et al., 2003).

Os *Staphylococcus* spp. coagulase negativo incluem várias espécies, mas apenas algumas são prevalentes em ruminantes (GILLESPIE et al., 2009; CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011; SZYMANSKA et al., 2011). Entre eles, estão o *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*

(BALOWS et al., 1991) e *S. caprae* isolado de mastite subclínica principalmente em pequenos ruminantes (BERGONIER et al., 2003).

Essas espécies podem ocasionar perdas econômicas resultantes da diminuição da produção de leite. Isso reflete o perigo para o ambiente e saúde do úbere. Novos estudos sobre a epidemiologia da SCN causadores de mastite e métodos de identificação mais confiáveis seriam benéficos para a indústria de laticínios (EL-JAKEE et al., 2013).

2.3.2 *Staphylococcus* spp. coagulase positivo (SCP)

Considerando o grupo dos *Staphylococcus* spp. coagulase positivo (SCP), *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* são mais observados. Encontrados habitando as vias nasais distais, a parte externa das narinas e a pele, especialmente nas extremidades de bordas mucocutâneas como períneo, genitália externa e úbere, podendo ocorrer também no trato gastrointestinal (BERGONIER; BERTHELOT, 2003; SANTOS et al., 2003).

Essas espécies podem produzir a enzima coagulase, conferindo maior importância clínica devido a seus fatores de patogenicidade. Contudo, o *S. aureus* é a espécie coagulase positivo de maior importância, relacionada a infecções ou intoxicações tanto no homem como em animais (MCCALLUM et al., 2010). São responsáveis por grandes prejuízos à pecuária leiteira, é de difícil tratamento devido a elevada resistência aos antibióticos, além de produzir exotoxinas capazes de alterar o aspecto do leite (VASUDEVAN et al., 2003). Pode estar também associados a infecções em hospedeiros de forma localizada ou sistêmica, comumente associados a infecções recorrentes, sendo assim considerado um patógeno importante, tanto para a medicina humana, quanto para a veterinária.

Em animais domésticos, o *S. aureus* está envolvido geralmente em infecções intramamárias de fêmeas de produção leiteira, principalmente na forma subclínica (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004; PARDO; SERRALLACH, 2006). Desta forma, é de grande importância o isolamento e identificação desse agente em laboratórios e a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana antes de realizar o tratamento, para que este seja eficaz, prático e econômico (CHAGAS et al., 2012).

As células de *Staphylococcus aureus* apresentam alguns componentes de superfícies e produzem várias substâncias extracelulares que contribuem para a sua

virulência. Dentre esses componentes estão: ácidos teicóicos, proteína A, adesinas, as hemolisinas α , β , γ , δ , a leucocidina e produção de biofilme, enzimas, exotoxinas, que são os responsáveis pela patogenicidade, garantindo assim, sucesso em sua instalação e manutenção nos tecidos do hospedeiro (BARBERÁN et al., 2010; XUE et al., 2014).

Do ponto de vista de saúde pública a bactéria está associada a intoxicações alimentares pelo consumo de leite pasteurizado, pois suas estirpes podem produzir enterotoxinas que não são inativadas pelo processo térmico (ZAFALON et al., 2009). Os *S. aureus* não são resistentes ao calor, sendo facilmente destruído pela pasteurização, por outro lado suas toxinas são altamente resistentes a tratamentos térmicos severos (SILVA et al., 2012).

2.4 Antimicrobianoterapia: visão geral

Os antimicrobianos pertencem ao grupo das substâncias residuais de maior influenciadora a qualidade do leite. Efeitos tóxicos diretos, indução de alergias e desenvolvimento de resistências são os principais danos causados por estes medicamentos a saúde humana (MOTA et al., 2005).

Os antimicrobianos são drogas importantes e amplamente utilizadas. No entanto, o surgimento da resistência tornou-se uma ameaça à saúde pública (PODOLL et al., 2013). Se dividem em dois grupos: antimicrobianos específicos (são os antibióticos que atuam em micro-organismos responsáveis pelas doenças infecciosas que acometem os animais e os inespecíficos (antissépticos e desinfetantes que atuam em micro-organismos patogênicos ou não patogênicos) (LAMBERT, 2005).

A atividade antimicrobiana foi descrita pela primeira vez em 1929, quando Alexandre Fleming observou o efeito de uma colônia do fungo *Penicillium* ao redor de colônias de *Staphylococcus spp.* em uma placa com meio de cultura. Foi a descoberta que levou ao desenvolvimento dos antibióticos. Em 1940, Chain, Florey e colaboradores obtiveram sucesso em produzir penicilina a partir do *Penicillium notatum*. Anos depois a penicilina G tornou-se amplamente disponível para uso clínico (HARBOTTLE et al., 2006; SUÁRZE; GUDIOL, 2009). A descoberta dos antimicrobianos parecia ter erradicado as infecções que assolavam populações humanas e animais. Contudo, o seu uso indiscriminado levou ao desenvolvimento de

agentes patogênicos resistentes a múltiplas drogas (FURUYA; LOWY, 2006; HEMAISWARYA et al., 2008). O descobrimento dos antimicrobianos foi um grande avanço para a aplicação terapêutica tanto na medicina humana quanto na veterinária (ASCHBACHER, 1978). A descoberta de novos e eficazes antimicrobianos no entanto continua a ser uma necessidade urgente, dada ao continuado aparecimento de resistência às novas gerações de drogas (BENKO-ISEPPON; CROVELLA, 2010; DIONISI et al., 2012).

Os antibióticos são metabólitos com baixo peso molecular que podem em pequenas doses matar (bactericida) ou inibir (bacteriostático) o crescimento de bactérias suscetíveis (CALVO; MARTINEZ-MARTINEZ, 2009). São substâncias químicas sintetizadas por várias espécies de micro-organismos, vegetais e animais. Podem ser de origem semissintética ou sintética e se diferenciam quanto as propriedades físicas, químicas, farmacológicas, aspectos de ação e mecanismos de ação e toxicidade (ANDRADE, 2002). Os mecanismos de ação das drogas antimicrobianas compreendem: inibição da síntese da parede celular dos micro-organismos, alteração da função normal da membrana celular, inibição da síntese ou da função do ácido nucleico e inibição da síntese proteica (SILVA et al., 2012).

Existem inúmeras opções de antibióticos disponíveis no mercado farmacêutico, mas as principais classes usadas pelos médicos veterinários são: os betalactâmicos, os macrolídeos e os aminoglicosídeos (CALVO; MARTINEZ-MARTINEZ, 2009). Os antibióticos de uso veterinário são utilizados para proteção da saúde animal e bem-estar dos animais e também na prevenção da transmissão de zoonoses. O uso incorreto pode implicar no aparecimento de resíduos nocivos nos alimentos de origem animal. A presença de antibióticos no leite, resulta em grande preocupação para a indústria de laticínios, além de representar um risco para a saúde do consumidor (PEZZA et al., 2006).

2.5 Antibióticos β -lactâmicos e Resistência bacteriana

O fenômeno biológico que possibilita a capacidade de multiplicação ou persistência do micro-organismo na presença de níveis terapêuticos do antimicrobiano, é conhecido como resistência bacteriana. A resistência bacteriana pode ser determinada pelo nível de exposição da bactéria ao antimicrobiano, assim como também pelas propriedades farmacocinéticas e farmacológicas do

medicamento (ABREU et al., 2011). Quantidades cada vez maiores de antibióticos são usados para evitar infecções em animais de criação, contribuindo para a pressão de seleção, que leva ao desenvolvimento de micro-organismos resistentes (LOWY, 2003; TENHAGEN et al., 2006).

As bactérias podem expressar resistência natural (mutações no genoma bacteriano ou através da aquisição de novas informações genéticas) ou adquirida (aquisição de genes de resistência antes não expressos) a certos antimicrobianos, podendo transmitir essas novas características para uma variedade de gêneros bacterianos (HARBOTTLE et al., 2006; FURUYA; LOWY, 2006; CAVALLO et al., 2008).

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser adquirida por três fatores: (a) a modificação do sítio alvo, resultando na redução da eficiência de ligação do fármaco, (b) destruição direta ou modificação do antibiótico por enzimas produzidas pelo organismo ou, (c) o efluxo do antibiótico da célula bacteriana (SHELDON, 2005).

A utilização de antimicrobianos, assim como a resistência bacteriana entre diversos patógenos causadores de inúmeras infecções é mundialmente reconhecida como um problema de grande relevância (LOWY, 2003; FURUYA; LOWY, 2006), tanto para a saúde pública como para a saúde animal, uma vez que elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos são registradas em estudos realizados na medicina veterinária e humana (GODREUIL et al., 2014; MOTA et al., 2005).

O surgimento da resistência de micro-organismos a estas drogas constituiu-se um dos aspectos indesejáveis da terapêutica e do desenvolvimento tecnológico possibilitando a recuperação de problemas que no passado levaram à morte. O controle da resistência bacteriana depende de um raciocínio complexo envolvendo indicações de uso, política de utilização, forma de administração e questões financeiras e interesses da indústria de medicamentos (HOEFEL; LAUTERT, 2006).

Entre os agentes antimicrobianos aprovados para a terapia de mastite os β -lactâmicos, tais como penicilinas e cefalosporinas, desempenham um papel fundamental. Os antibióticos β -lactâmicos que atuam inibindo a última fase da síntese da parede celular bacteriana constituem a maior família de agentes antimicrobianos e mais amplamente prescritos em prática clínica atual (GUDIOL, 2003; DEURENBERG et al., 2007). São os antibióticos mais utilizados, devido à sua

alta eficácia, baixo custo, facilidade de uso, e efeitos colaterais mínimos (GUDIOL, 2003; TURK et al., 2011).

As penicilinas e as cefalosporinas são conhecidas como polipeptídeos, apresentando um anel β -lactâmico. Esses antibióticos interferem na síntese da parede celular, inibindo a atividade da transpeptidase e de outras enzimas denominadas de proteínas de ligação da penicilina (PLP). As PLP catalisam as ligações cruzadas das unidades poliméricas de glicopeptídeos que formam a estrutura da parede celular. Esses antibióticos apresentam ação bactericida, no entanto, não são capazes de atuar sobre a parede já formada; a condição essencial para a sua ação bactericida, é que as bactérias estejam se multiplicando, quando então há necessidade de síntese de parede celular ou seja os β -lactâmicos são ativos somente contra células em crescimento ativo (FARHA et al., 2013).

Foram descritos três fatores determinantes da resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos: produção de β -lactamases (enzima que hidrolisa o anel β -lactama e provoca a inativação de β -lactâmicos), redução da penetração através da camada externa da parede celular e dificuldade do antibiótico β -lactâmico para atingir o sítio de ligação (PLP) (GUDIOL, 2003; CIFTCI et al., 2009; NIKAIDO, 2009).

A codificação de enzimas β -lactamase por plasmídeos ou cromossomos, representa o principal mecanismo de resistência a β -lactâmicos, especialmente em bactérias Gram-negativas. As β -lactamases constituem um grupo heterogêneo de enzimas capazes de inativar as penicilinas e as cefalosporinas pela hidrólise do anel β -lactâmicos por hidroxilação irreversível da ligação amida, com inativação do antibiótico antes de sua união com as PLP (SUÁREZ; GUDIOL, 2009; RIVERA et al., 2014). Essas enzimas são específicas para as penicilinas, algumas para as cefalosporinas e outras atuam em ambos os grupos de antimicrobianos (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

As penicilinas são os β -lactâmicos mais indicadas na prática clínica, principalmente no combate de infecções ocasionadas por *Staphylococcus* spp. (FERRAZ et al., 2002). A resistência dos *Staphylococcus* spp., para antimicrobianos β -lactâmicos é avaliada por dois mecanismos diferentes. Um mecanismo é a produção de β -lactamase codificada pelo gene *blaZ*, que são enzimas responsáveis pela degradação do antimicrobiano através de uma reação de hidrólise, localizada em plasmídeo, constituída ou regulada na presença do antimicrobiano, através de dois genes adjacentes, *blaI* repressor da transcrição de *blaZ* e o *blaR1* antirepressor.

(OLSEN et al., 2006; DURAN et al., 2012). Quando não existe penicilina no meio, *BlaI* se liga ao promotor de *blaZ*, inibindo a transcrição. Quando a penicilina está presente, a proteína se liga à enzima BlaR1, presente na membrana celular que por sua vez cliva a enzima *BlaI*, ativando o promotor de *blaZ* e conseqüentemente iniciando a produção de β -lactamase (LOWY, 2003). Um outro mecanismo é a produção de PLPs de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA* (WU et al., 2001; ENDER et al., 2008). As PLPs são enzimas que catalisam a etapa terminal da síntese da parede bacteriana e se localizam na membrana celular da bactéria. As PLPs 1, 2 e 3 são essenciais e têm alta afinidade (sítios-alvo) com os antibióticos β -lactâmicos, unindo-se a esses por ligações covalentes. (LOWY, 2003). A resistência à meticilina em *Staphylococcus* spp., é devida à produção de uma PLP adicional, anômala, denominada PLP2a, que apresenta baixa afinidade com os antimicrobianos β -lactâmicos (KATAYAMA et al., 2003; LOWY, 2003).

2.6 Biofilmes

As bactérias se encontram na maioria dos ambientes na forma livre ou aderidas a qualquer superfície sobre a forma de biofilmes, que pode ser formado por populações a partir de uma única ou de múltiplas espécies (DONLAN, 2002; ARNOLD et al., 2004).

Assim, o biofilme é definido como adesão de micro-organismos e outros materiais extracelulares a uma superfície (TAMASHIRO et al., 2009), envolvidos por uma matriz viscosa, denominada EPS (*Extracellular polymeric substance*), a qual é formada em parte pelas próprias células e em parte por componentes do ambiente. As EPS que permitem que as células bacterianas se aglomerem em multicamadas de biofilme, tornando-as menos acessíveis ao sistema de defesa do organismo e aos antimicrobianos (ANTUNES et al., 2007). Compreendem uma grande variedade de proteínas, glicoproteínas, glicolípidos e DNA extracelular (e-ADN) (COSTERTON et al., 1995; FLEMMING et al., 2007). A água é o principal constituinte dos biofilmes, sendo essa característica hidrofílica ideal para a troca de material genético e manutenção de um pool genético (HOIBY et al., 2001; FLEMMING et al., 2007).

As etapas para a sua formação compreendem: a adesão inicial, passando os micro-organismos de seu estilo de vida planctônico ao sésil; a formação de microcolônias; à maturação e ao destacamento de células, retornando estas a seu

estilo de vida planctônico (OTTO, 2008). Essas características e a capacidade da comunidade de biofilme para separar bactérias viáveis e colonizar nichos distantes, têm sido alvo de estudos na compreensão de doenças infecciosas persistentes e recorrentes, uma vez que o biofilme protege as bactérias da ação dos antimicrobianos e aumentam à capacidade de sobrevivência da bactéria as defesas do hospedeiro (FOX et al., 2005; TAMASHIRO et al., 2009; LEBEAUX et al., 2013).

Ao que parece a capacidade de formar biofilme não é limitada a nenhum grupo específico de micro-organismos considerando-se que, em condições ambientais adequadas sejam capazes de formar biofilmes (LASA et al., 2005). Alguns micro-organismos, pelas suas características fenotípicas e genotípicas, estão mais frequentemente associados à produção de biofilmes, entre eles estão *Staphylococcus* spp. coagulase negativa e os *Staphylococcus aureus*. Assim, como a maioria das bactérias, os *Staphylococcus* spp., formam biofilmes a partir de uma adesão inicial a uma superfície, podendo ser de origem biológica ou não (MACK, 1999). A adesão a uma matriz pode ser caracterizada como específica quando existem interações inter-protéicas que trazem a mediação entre a adesão inespecífica caso a adesão seja mediada entre uma superfície abiótica e as bactérias (O’GARA, 2007).

A formação de biofilme é regulada através da expressão de polissacárideo adesina intracelular (PIA), o qual promove a adesão celular, sendo o produto do gene de *icaADBC* (MAIRA-LITRAN et al., 2002). A PIA manifesta-se através das enzimas codificadas pelo operon *ica* (intercellular adhesion) que foram demonstrados fundamentais para a formação de biofilmes e virulência dos microrganismos, sendo regulados em resposta a fatores ambientais, como glicose, anaerobiose, alta osmolaridade e temperatura, limitação de etanol e ferro. Foram demonstrado sem vários estudos que os genes *icaA* e *icaD* têm importante papel na formação dos biofilmes por *S. aureus* e *S. epidermidis* (ARCIOLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003). Além disso, esses genes foram encontrados para a alta prevalência entre *S. aureus* isolados de mastite e esta descoberta confirma que *ica* local tem um papel potencial como um fator de virulência na patogênese da mastite em ruminantes (VASUDEVAN et al., 2003).

O papel da expressão do gene *ica*, e conseqüentemente a formação de biofilmes, parece ser variável entre os *Staphylococcus* spp. Assim, a formação de biofilme é influenciada pelos sinais ambientais e pode ser induzida em resposta a

concentrações sub-inibitórias de estresse externos provocados por certos antibióticos (TERKI et al., 2013). Sabe-se que *S. aureus* e *S. epidermidis*, oriundos de caso de mastite, possuem alta capacidade de adesão em superfícies abióticas, formando posteriormente, biofilmes altamente organizados (OLIVEIRA et al., 2006).

2.7 Novas alternativas na terapia de mastite

As plantas vêm sendo estudadas como alternativas ao uso de antimicrobianos por serem fontes de novos produtos químicos (ABREU et al., 2012). Entretanto de uma grande variedade de plantas superiores reconhecidas atualmente, poucas tem sido investigadas como alternativas para novos produtos terapêuticos que substituam ou melhorem a eficácia terapêutica dos antimicrobianos (GIBBONS et al., 2003; SHIBATA et al., 2005).

A fototerapia possui raízes profundas na consciência popular que reconhece sua eficácia e legitimidade. O uso de plantas medicinais com finalidade terapêutica acontece desde a antiguidade pelo homem. O objetivo era acelerar a cicatrização de feridas e aliviar ou tratar doenças infecciosas através da ingestão de ervas e folhas (ABREU et al., 2012). As plantas são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos podendo ser usadas como fitoterápicos e na descoberta de novos fármacos, sendo encontrados no reino vegetal a maior contribuição de medicamentos (MARTINI et al., 2009; BRASIL, 2012). O interesse pelo conhecimento, utilização e comercialização de plantas medicinais e produtos fitoterápicos no Brasil e no mundo tem sido crescido nos últimos anos o que tem proporcionado uma grande expansão desse mercado (FREITAS et al., 2012).

O uso de produtos naturais, tanto na forma pura, como na forma de extrato no combate a doenças está intimamente relacionada à medicina popular em várias partes do mundo (ARAUJO; LEON, 2001; MARTINI et al., 2009). As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais tem sido importante para a divulgação dos efeitos terapêuticos dos vegetais, indicados pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (MARCIEL et al., 2002).

Na medicina veterinária, a procura por plantas com eficácia terapêutica vem crescendo nos últimos anos, associada ao fato de que os produtos farmacêuticos convencionais, além de causarem muitas vezes efeitos indesejáveis, geralmente são

de custos elevados (MARINHO, 2007). Contudo, os profissionais ainda evitam adotar as plantas medicinais nos programas de criação de animais, devido ao número reduzido de informações científicas validadas relacionadas à segurança e eficácia dos medicamentos etnoveterinários, ou seja, a eficácia farmacológica da planta e a ausência de toxicidade (ALMEIDA; FREITAS,2006). De fato, os fitoterápicos como qualquer outro medicamento necessitam de estudos científicos e critérios para sua comercialização e consumo, transformando-o em medicamento seguro e eficaz (MARINHO, 2007), representando uma alternativa aos medicamentos alopáticos(ALVES et al.,2008).

Antibacterianos derivados de plantas são sempre uma fonte de novas terapias. Um rápido olhar para a forma como a natureza, especialmente as plantas, estão a abordar a questão da infecção irá fornecer uma compreensão mais profunda da metodologia, que precisa ser adotada para a concepção e desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos altamente eficazes, em particular os antimicrobianos (HEMAISWARYA et al., 2008). Além disso, o desenvolvimento da química moderna permitiu o isolamento de produtos químicos a partir de plantas medicinais,tendo servido como drogas ou materiais de partida para a síntese de muitos medicamentos importantes utilizados hoje em dia (MAHOMOODALL et al., 2005).

As ações farmacológicas das plantas são relacionadas a presença de substâncias químicas conhecidas como princípios ativos. Princípios ativos conhecidos como metabólitos secundários das plantas são componentes químicos produzidos pelas plantas, que lhes conferem a atividade terapêutica. São produzidos em pequenas quantidades e expressam a individualidade dos vegetais (BRANDÃO, 2011). A surpreendente variedade de metabólitos secundários vegetais com importantes propriedades biológicas vem despertando o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência que buscam uma promissora fonte de moléculas potencialmente úteis ao homem (CARTAXO et al., 2010; HASSANPOUR et al., 2011).

Os três grandes grupos de metabólitos secundários são os terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os terpenos são sintetizados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais

são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina)(PERES, 2004).

Os metabólitos secundários das plantas já demonstraram seu potencial como agentes antibacterianos, quando utilizados separadamente ou não. A utilização de produtos fitoquímicos e extratos de plantas como agentes modificadores de resistência representa uma investigação cada vez mais ativa. Compostos fitoquímicos atuam frequentemente através de mecanismos diferentes dos antimicrobianos convencionais e pode, portanto, serem, de uso no tratamento de bactérias resistentes (ABREU et al., 2012).

No Brasil, existe uma variedade de espécies da flora nativa. Estas vegetações possuem diferentes características e princípios ativos que ainda são desconhecidos e que podem ser aproveitadas em estudos científicos para o desenvolvimento de fármacos (VARANDA, 2006). A utilização de plantas medicinais no país é resultado da influência indígena e com tradições africanas. Desde 1995 muitas pesquisas de fitoterápicos foram realizadas com a finalidade de aproveitar plantas medicinais nativas promovendo seu uso adequado (ALMEIDA, 2003; BRANDÃO, 2011).

O principal ecossistema do nordeste do Brasil é o bioma caatinga, formado por extensas planícies semiáridas, que são encontradas desde o estado do Piauí até o Norte de Minas Gerais. Apesar de pouco conhecida botanicamente a flora da Caatinga, esta é bastante utilizada pelas populações locais para os mais variados fins. Possui várias espécies endêmicas de plantas de diferentes tipos como árvores, arbustos e ervas. São reconhecidas cientificamente na caatinga cerca de 400 espécies utilizadas como fitoterápicos (ALBUQUERQUE, 2010). As plantas na área circundante são parte integrante da cultura dos nordestinos e as informações sobre as plantas são passadas de geração em geração (AGRA et al., 2007). As plantas medicinais são muito conhecidas na Caatinga, desempenham importantes funções, e em muitos lugares são a única alternativa de medicamentos para reduzir sintomas ou curar alguma doença, visto que grande parte das populações do semiárido nordestino não tem acesso aos avanços tecnológicos da medicina (ALBUQUERQUE, 2010).

2.7.1 *Commiphora leptophloeos*

A *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett é uma espécie da flora brasileira na Divisão *Angiospermae*, família *Burseraceae*, gênero *Commiphora* e sinonímia botânica *Bursera leptophloeos* (Mart.) de acordo com o sistema de classificação baseado no The Angiosperm Phylogeny Group (APG) II (2003). Seu nome vulgar imburana-de-cambão vem da corrutela de y-mb-ú (árvore de água) e Ra-na (falso), formando assim a palavra imburana (falso imbu). É conhecida ainda por umburana-de-cambão, imburana-de-espinho, imburana-vermelha ou imburana-de-abelha entre outros dependendo das unidades de federação (MAIA, 2004, CARVALHO, 2008). Espécie muito utilizada para fins madeireiros e medicinais na região. O xarope feito da casca é usado como tônico e cicatrizante, a madeira é muito utilizada no artesanato do Vale do São Francisco para confecção de carrancas e outros objetos decorativos (FILHO et al., 2009).

É uma árvore arbórea de comportamento decíduo que pode atingir dimensões próximas de 12 m de altura e de 50 a 60 cm de diâmetro na altura do peito (DAP) chegando a atingir uma área média de copa de 52 m²/planta na idade adulta. O tronco é tortuoso e muito engalhado com copa ampla e irregular. A casca externa ou ritidoma é lisa, lustrosa, desprendendo-se em lâminas delgadas, revolutas, muito irregulares e características. As folhas são alternadas, de coloração verde-claras rosadas, quando bem jovens, compostas, com três a nove folíolos ovais, medindo de 1,5 cm a 3,5 cm de comprimento, inteiros da margem. A inflorescência apresenta-se em panículas auxiliares. Floresce entre os meses de outubro e Dezembro. As flores são pequenas, medindo de 3 mm a 4 mm de comprimento, de coloração verde bem clara, isoladas ou reunidas em pequenos grupos. (CARVALHO, 2008).

O fruto é um duplóide do tipo filotrimídio, de cor verde, medindo cerca de 1 cm de diâmetro. Sob insolação o fruto abre no meio liberando uma única semente. Como a maioria das espécies de regiões áridas e semiáridas, as semente da *C. leptophloeos* é rígida, rugosa, com diâmetro maior que 1 cm, negra, salvo a base, onde se torna branca revestida por um arilo vermelho, apresenta germinação intermitente e com baixa porcentagem (FAIAD, et al., 1997; CARVALHO, 2008).

Esta planta é típica de caatinga, ocorrendo com elevada frequência no vale médio São Francisco sendo uma espécie característica da caatinga do Nordeste brasileiro (PEREIRA et al., 2004; PNE, 2012). No Brasil, é encontrada

principalmente nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Mato Grosso. É uma espécie heliófila, pioneira, xerófila, de crescimento lento e que apresenta portes variáveis, conforme o ambiente onde se desenvolve. Prefere solos calcários, bem drenados e profundos. Floresce na época não chuvosa, com o surgimento da nova folhagem e a sua frutificação coincide com o início da queda das folhas. A reprodução sexuada se dá durante a estação chuvosa (CARVALHO, 2008; PNE, 2012).

Na medicina popular, a *C. leptophloeos* é utilizada como xarope (contra tosses e bronquites), tônico, e cicatrizante, no tratamento de feridas, gastrite e úlceras. Pode ser utilizada como planta ornamental na arborização de parques e ruas. Em sistemas agroflorestais é utilizada como quebra vento, além de servir de abrigo e alimento para as abelhas, que por sua vez aumentam o índice de polinização nas plantações, sendo ainda muito usada em cercas vivas. A resina produzida em seu tronco é utilizada na fabricação de vernizes. Na manutenção da biodiversidade representa um importante recurso para alimentação de animais silvestres como sagüins, abelhas, mariposas e outros insetos importantes na polinização das demais espécies da área. Seu tronco muitas vezes é utilizado como habitat de abelhas e vespas nativas. Apresenta também valor alimentício e forrageiro (MAIA, 2004; FILHO et al., 2009; PNE, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a atividade antimicrobiana “*in vitro*” do extrato etanólico de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B.Gillett.) frente a isolados de *Staphylococcus* spp.

3.2 Específicos

- Avaliar o perfil de resistência dos *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento de mastites em ruminantes;
- Determinar a concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos etanólicos (EEB);
- Correlacionar a sensibilidade ao EEB com a presença do gene *blaZ* nos isolados de *Staphylococcus* spp.;
- Verificar a capacidade produtora de biofilmes nos isolados de *Staphylococcus* spp.;
- Avaliar interferência *in vitro* dos EEB no biofilme em formação e no biofilme já consolidado dos isolados *Staphylococcus* spp.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. G. et al. Nosocomial infection and characterization of extended-spectrum β -lactamases-producing Enterobacteriaceae in Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 441-446, 2011.

ABREU, A.C.; McBAIN, A.J.; SIMÕES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 9, p.1007–102, 2012.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.114-140, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P. **Caatinga: biodiversidade e qualidade de vida**. Bauru, SP: Canal 6, 2010.

ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais**. 2 ed. Salvador: EDUFBA, 2003.

ALMEIDA, K.S.; FREITAS, F.L.C. Etnoveterinária: a fitoterapia na visão do futuro Profissional veterinário. **Revista Verde**, v.1, n.1, p.67-74, 2006.

ALVES, N. D. C. et al. Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do Estado do Rio de Janeiro. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.13, p. 745-753, 2008.

ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, p.289-291, 2002.

ANDRADE, P.V.D. et al. Características microbiológicas e físico-químicas do leite de cabra submetido à pasteurização lenta pós-envase e ao congelamento. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1424-1430, 2008.

ANTUNES, L. C. et al. Transcriptome analysis of the *Vibrio fischeri* LuxR–LuxI regulon. *Journal Bacteriology*, v.189, n.22, p. 8387–8391, 2007.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presença de *icaA* e *icaD* genes e produção de lodo em uma coleção de estirpes de estafilococos de infecções associadas ao uso de cateter. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2151, 2001.

ARCURI, E. F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

ARNOLD, T. et al. Impact of invA-PCR and culture detection methods on occurrence and survival of *Salmonella* in the flesh, internal organs and lymphoid tissues of

experimentally infected pigs. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.51, n.10, p. 459-463, 2004.

ARAÚJO, C.A.C; LEON, L.L. **Biological activities of Curcuma longa L.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v.96,n.5, p.723-728, 2001.

ASCHBACHER, P. W.; **Distribution and fate of growth-promoting drugs.** In: (Ed.). Nutrition and drugs interrelations. New York: Academic Press, 1978.

BAGCIGIL, A.F. et al. Genetic of penicillin resistance of *S. Aureus* isolated in bovine mastitis. **Acta Veterinária Scandinavica**, v. 54. n. 1, p. 69. 2012.

BALLOU, M.A. Growth and development symposium: Inflammation: Role in the etiology and pathophysiology of clinical mastitis in dairy cows. **Journal Animal Science**, v. 90, n.10, p. 1466-1478, 2012.

BALOWS, A. et al. **Manual of Clinical Microbiology.** 5 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. 1384p.

BANNERMAN, D.D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. **Journal Animal Science**, v. 87, n.13, p. 10-25, 2009.

BARBERAN, A. et al. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. **ISME Journal**, v. 6, n.2, p. 343–35, 2012.

BARKEMA, H.W. et al. Invited review: the role of contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.2, p. 4717–4729, 2009.

BERGONIER, D. et al. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v.34, n.5, p.689-716, 2003.

BENKO-ISEPPON, A.M.; CROVELLA, S. Ethnobotanical bioprospection of candidates for potential antimicrobial drugs from Brazilian plants: state of art and perspectives. **Current Protein Peptide Science**, v.11, n.3, p.189–194, 2010.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. **Livestock Production Science**, v. 79, n. 1, p. 1-16, 2003.

BONNEFONT, C.M.D. et al. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*, **BMC Genomics**, v. 12, p. 208, 2011.

BRANDÃO, M.G.L. **Ensinando sobre plantas medicinais na escola.** Belo Horizonte: Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG, Dataplant, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: **plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde.** Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012

CALVO, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, v. 27, n.1, p. 44-52, 2009.

CARVALHO, P.E.R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: **Embrapa Florestas**, v. 3, p. 1-20, 2008.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.131, n.2, p.326-342, 2010.

CAVALLO, J. D. et al. **Recommandations. Comite de l'antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie**. Paris. France, p.1-49, 2008.

CHAGAS, L. G. S. et al. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. E *Candida* sp. Em uma propriedade rural no município de Indianópolis- Minas Gerais, **Brasileira Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p. 1007 – 1014, 2012.

CHANG, M.R. et al. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in MatoGrosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Infections Diseases**, v. 7, n. 2, p. 149-160, 2003.

CHU, C. et al. Genetically divergent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and sec-dependent mastitis of dairy goats in Taiwan. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 39, p. 1746-6148, 2012

CIFTCI, A. et al. detection of methicillin resistance and slime factor production of *staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n. 2, p.254-261, 2009.

CONTRERAS, G.A.; RODRÍGUEZ, J.M. Mastitis: comparative etiology and **epidemiology**. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.16, n. 4, p.339-356, 2011.

COSTERTON, J. W. Overview of microbial biofilms. **Journal Industrial Microbiology**, v.15, p.137-140,1995.

DAVIES, G e et al. Uma avaliação de oportunidades para dissecar a variação genética de acolhimento na resistência a doenças infecciosas em animais. **Animal**, v. 3, n. 3, p. 415-436, 2008

DE VLIEGHER, S. et al. mastite em novilhas leiteiras: natureza da doença, o impacto potencial, prevenção e controle. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.3, p. 1025-1586, 2012.

DEURENBERG R. H. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **European Society Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.13, n.3, p. 222–235, 2007.

DIONISI, H.M.; LOZADA, M.; OLIVERA, N.L. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. **Revista Argentina Microbiologia**, v.44, n. 1, p. 49–60, 2012.

DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases** v. 8, n.9, p. 881-890, 2002

DURAN, N. et al. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. **Indian Journal Medical Research**, v. 135,n.3, p. 389-396, 2012.

EL BEHIRY, A. et al. In vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis to different antimicrobial agents. **Journal of Veterinary Science**, v.13, n.1, p.153-161, 2012.

EL-JAKEE J.J. et al. Emerging of coagulase negative staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v.1,n.2, p.74–78, 2013.

ENDER, M.; McCALLUM, N. ; BERGER-BÄCHI,B. Impact of *mecA* promoter mutations on *mecA* expression. and β -lactam resistance levels chi **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, n.7-8, p. 607–617,2008.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.

FAIAD, M.G.R. et al. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a qualidade fiiologica e sanitária de sementes de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B.Gillet. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 19, n. 1, p. 14-17, 1997.

FARHA, M.A. et al. Inhibition of WTA Synthesis Blocks the Cooperative Action of PBPs and Sensitizes MRSA to β -Lactams. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n.1, p. 226-233, 2013.

FERRAZ, A.V. et al. Antibióticos betalactámicos. **Medicine**, v.8, n.64, p.3413-3418, 2002.

FILHO, J.A.S. et al. **Guia de Campo de árvore da caatinga**. Editora e Gráfica Franciscana. Petrolina, p.24-25, 2009.

FLEMMING, H.C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. **Journal Bacteriology**, v.189, n.22, p.7945–7947, 2007.

FOX, L.K., ZADOKS, N.R. & GASKINS, T.C. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Veterinary Microbiology**, v.107, n. 3-4, p. 295-299, 2005.

FRANCIS, J.S. ET AL. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leucocidin genes. **Clinical Infectious Diseases**, v.40, n.1, p.100–107, 2005.

FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de Sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto Biologia**, v. 72, n. 2, p.171-177, 2005.

FREITAS, A. V. L. et al. Plantas medicinais: um estudo etnobotânico nos quintais do Sítio Cruz, São Miguel, Rio Grande do Norte, Brasil. Porto Alegre: Revista Brasileira de Biociências. v, 10, n.1, p. 48-59, 2012.

FUNDORA, O. et al. A comparative study of milk composition and stability of Murrah river buffaloes and Holstein cows grazing star grass Cuban. **Journal of Agricultural Science**, v.35, p.219-222, 2001.

FURUYA, E.Y.; LOWY, F.D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. **Nature Rev Microbiol** v.4, n.1, p.36–45, 2006.

GIBBONS, S. et al. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. **Phytochemistry**, v.62,n.1, p. 83–87, 2003.

GILLESPIE, B.E. et al. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. **Veterinary Microbiology**, v.134, n.1-2, p. 65–72, 2009.

GODDEN, S.M. et al. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. **Canadian Veterinary Journal**, v.43,n.1, p.38-42, 2002.

GODDEN, A.G.A. et al. Randomized noninferiority clinical trial evaluating 3 commercial dry cow mastitis preparations: I. Quarter-level outcomes. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n.7, p. 4419-35,2013.

GODREUIL, S. et al. Aedesin: Structure and Antimicrobial Activity against Multidrug Resistant Bacterial Strains. **PLoS ONE**, v.9, n.8,p. 1-9, 2014.

GUDIOL, M.M.F. Antibióticos betalacâmicos. **Enferm Infec Microbiol Clin**, v.21, n. 1, p. 42-55, 2003.

GUHA, A.; GERA,S.; SHARMA, A. Evaluation of milk elements, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activity of subclinical mastitis as and indicator of subclinical mastitis in revirene buffalo (*Bubalus bubalis*). **Asian-australasian Journal Animal Sciences**, v. 25, n.3, p. 353-360, 2012.

HAN, B.Z.. et al. A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. **Food Control**, v. 18, n.6, p. 742-746, 2007.

HARBOTTLE, H. et al. Genetics of antimicrobial resistance. **Animal Biotechnology**, v. 17,n.2, p. 111-124, 2006.

HASSANPOUR, S. et al. Plants and secondary metabolites (Tannins): a Review. **Int. J. For. Soil Erosion**, v.1, n.2, p.47-53,2011.

HEIKKILÄ, A.M.; NOUSIAINEN, J.I.; PYORALA, S. Os custos de mastite clínica, com especial referência para abate prematuro. **Journal of Dairy Science**, v.99, n.1, p.139-150, 2012.

HEMAISWARYA, S.; KUMAR, A.K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639-652, 2008.

HEMAISWARYA, S.; M. DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, v.16, p. 997-1005, 2009.

HOEFEL, H.H.K.; LAUTERT, L. Administração endovenosa de antibióticos e resistência bacteriana: responsabilidade da enfermagem. **Revista Eletronica de Enfermagem**, v. 8, n.3, p.441-449, 2006. Disponível em: http://www.fen.ufg.br/revista/revista8_3/v8n3a15.htm

HOIBY, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. **Microbes Infection.**, v.3, p. 23–35, 2001.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T.J.G.M. Economic aspects of mastitis: New developments. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 59, n. 1, p. 16-23, 2011.

HUANG, J. et al. iTRAQ – proteomics and bioinformatics analyses of mammary tissue from cows with clinical mastitis due to natural infection with *Staphylococcus aureus*. **BBC Genomics**, v.15, n.839, p. 1471-2164, 2014.

JÁCOME, I.S.C. et al. Pre-parturition staphylococcal mastitis in primiparous replacement goats: persistence over lactation and sources of infection. **Veterinary Research**, v.45, p.115, 2014.

KAPILA, R.; KAVIDE, P.K. KAPILA, S. Comparative evaluation of allergic sensitization to milk proteins of cow, buffalo and goat. **Small Ruminant Research**, v.112, p.191-198, 2013.

KATHLEEN, A. Taxas de incidência de mastite clínica entre Holsteins canadenses classificadas como de alto, médio ou baixo Imune respondedores. **Clinical Immunology Vacina**, v. 20 , n. 1, p. 106-112, 2013.

KATAYAMA, Y. et al. Jumping the Barrier to β -Lactam Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal Bacteriology**, v. 185, n.18, p. 5465-5472, 2003.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, v.48, n. p.167-188, 1981.

KUMAR, V. et al. Isolamento e Caracterização de *Mycoplasma mycoides* Sub *capri* a partir de leite de cabra naturais mastite Cases. **Vet ISRN Sciencies**, v.593, p. 029, 2013.

LAMBERT, P.A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1471-1485, 2005.

LANGONI, H. et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Arquivos de Veterinária**. v.17, n. 3, p.213-217, 2001.

LANGONI, H., DOMINGUES, P.F.; BALDINI S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **Revta Brasileira Ciência Veterinária**, v. 13,n.1, p. 51-54, 2006.

LASA, I. et al. Biofilms bacterianos e infección. **Anales Sistema Sanitário Navarra**, v. 28, n. 2, p. 163-175, 2005.

LEBEAUX, D. et al. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. **Pathogens**, v. 2, n. 2, p. 288-356, 2013.

LEITNER, G. et al. Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts, NAGase activity and gross composition of goats' milk. **Journal Dairy Research**, v. 771, n.3, p. 311-5, 2004.

LE MARÉCHAL, C. et al. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. **Dairy Science and Technology**, v.91, p.247–282, 2011.

LOPES, L.O. ; LACERDA, M.S.; RONDA, J.B. Uso de antibióticos na cura e controle de mastite clínica e subclínica causada por principais microorganismos contagiosos em bovinos leiteiros: revisão de literatura. **Rev Científica Medicina Veterinária**, n.21, p.1-15, 2013.

LOWY, F. Resistência aos antimicrobianos: A exemplo de *Staphylococcus aureus* . **Journal Clinical Investigation**, v. 111,n.9, p. 1265-1273, 2003.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRIES, G. A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Rev. Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.1883-1886, 2000.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR. F.V. plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**,v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MADELLA-OLIVEIRA, A.F. et al, Aspectos da comercialização de carne e leite de bubalinos na região Norte Fluminense. **Rev. Brasileira Reprodução Animal**, v.29, n.1, p.53-54, 2005.

- MAHOMOODALLY, M. F. et al. Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius. **Pharmaceutical Biology**, v. 43,n.3, p. 237-242, 2005.
- MAIA, G. N. **Caatinga**: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: Leitura & Arte, 2004. 413 p.
- MAIRA-LITRAN, T. et al. Immunochemical properties of the staphylococcal poly- N-acetylglucosamine surface polysaccharide. **Infection Immunity**, v. 70, n.8, p. 4433–4440, 2002.
- MARÉCHAL, C. L.E. et al., *Staphylococcus aureus* seroproteomes discriminate ruminant isolates causing mild or severe mastitis. **Veterinary Research**, v.42, n. 1, p.135, 2011.
- MARINHO, M.L. et al. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Rev. Brasileira Plantas Medicinai**s, v.9, n.3, p.64-69, 2007.
- MARTINI, S. et al. Antimicrobial activity against Helicobacter pylori strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 1, p. 50-59, 2009.
- MAURY, C.M. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília: MMA/SBF, 2002.404 p.
- McADOW, M; MISSIAKAS, D. M; SCHNEEWIND, O. Staphylococcus aureus Secretes Coagulase and von Willebrand Factor Binding Protein to Modify the Coagulation Cascade and Establish Host Infections. **Journal Innate Immunity**, v. 4, n.1, p.141-148, 2012.
- MCCALLUM,N.; BERGER-BÄCHI, B.; SENN, M.M. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Int Journal Mededical Microbiology**,v.300, n.2, p. 118-29, 2010.
- MEDIANO, P. et al. Case-control study of risk factors for infectious mastitis in spanish breastfeeding women. **BBC pregnancy and Childbrth**, v.14, n.195, p. 1471-2393, 2014.
- MÉNARD, O. et al. Buffalo vs cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipidis from the milk fat globule membrane. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 544–551, 2010.
- MORAND-FEHR, P. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 20–34, 2007.
- MOTA, R.A. et al. The abuse of antimicrobials drugs and the appearance of resistance. **Braz J vet Res anim Sci.**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MACK, D. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. **Journal Hospital Infection**, v. 43, p.113-25, 1999.

MOTA, R.A. et al. Participação dos *Staphylococcus* spp NA etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). **Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.1, p. 124-130, 2012.

MURTAZA, M.A. et al. Texture, flavor and sensory quality of buffalo milk Cheddar cheese as influenced by reducing sodium salt content. **Journal Dairy Science**, v.97, n.11, p.6700-7, 2014.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista Nutrição**, v.14, n.1, p. 119-124, 2001.

NG, L. et al. Impact of livestock hygiene education programs on mastitis in smallholder water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Chitwan, Nepal. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 96, n. 3-4, p. 179-185, 2010.

NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, v.78, p. 8-28, 2009.

O'GARA, J.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **J Med Microbiology**, v. 50, n.7, p. 582–587, 2001.

O'GARA J.P. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **Fems Microbiol. Letters**, v. 270, n. 21, p. 179-188, 2007.

OLIVARES, M.F. et al. Actividad de vancomicina, teicoplanina y linezolid en *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes a metilina en aislados de hemocultivos pediátricos. **Revista Espanola Quimioterapia**, v.25, n.1, p. 25-30, 2012.

OLIVER, S.P. et al. Efficacy of extended pirlimycin therapy for treatment of experimentally induced *Streptococcus uberis* intramammary infections in lactating dairy cattle. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, n. 3, p. 299–308, 2003.

OLIVEIRA, M. Et al. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n 1-2, p.133-140, 2006.

OLSEN, J.E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F. M. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci. **Journal Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 3, p. 450–460, 2006.

OSTERÅS, O.; SOLVEROD, L. Norueguês programa de controle de mastite. **Irish Veterinary Journal**, v. 62 , p.26-33, 2009.

OTTO, M. *Staphylococcus* biofilms. **Current Topics Microbiology Immunology**, v.322: p. 207-228, 2008.

PARK, Y.W. et al. Haenlein Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v.68, p. 88–113, 2007.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, 2004

PEREIRA, F.M. et al. **Flora apícola no Nordeste**. (Embrapa Meio-Norte. Documentos, 104) Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2004, 40 p.

PERSSON, Y.; OLOFSSON, I. Direct and indirect easurement of somatc cell count as indicator of intramammáry infection in dairy goats. **Acta Veterinária Scandinavica**, v.53, n.15, p.1751-0147, 2011.

PEZZA, I. et al. Determinação simultânea de resíduos de cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol em leite bovino por cromatografia eletrocínética micelar. **Química Nova**, v.29, n. 5, p. 926-931, 2006.

PNE. **Versão preliminar do guia de boas práticas de extrativismo sustentável da umburana-de-cambão (commiphora leptophloeos)**. Recife, 2012.
DOCUMENTO BASE

PIEPERS S. et al. Prevalência e distribuição dos patógenos causadores de mastite em vacas leiteiras subclínica infectados em Flandres, Bélgica . **Journal of Dairy Science**, v. 74 p.478-483, 2007.

PILLA, R. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* as causative agent of dairy cow mastitis. **Veterinary Record**, v.173, n. 1, p.19, 2013.

PODOLL, J.D. et al. Bio-inspired synthesis yields a tricyclic indoline that selectively resensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to β -lactam antibiotics. **PNAS**, v.110, n.39, p. 15573–15578, 2013.

Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, 11 mar. 1996.

RADOSTITS, O.M.; MAYHEW, I.G.J.; HOUSTON, D.M. **Exame clínico e diagnóstico em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002. 604p.

RASMUSSEN, R.V. et al. Future challenges and treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia with emphasis on MRSA. **Future Microbiol.**, v. 6, n.1, p. 43–56, 2011.

RIBEIRO, E.L.A.; RIBEIRO, H.J.L.L. Uso terapêutico e nutritivo do leite de cabra. **Sem. Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.229-235, 2001.

RICCI, G. D.; DOMINGUES P. F. O leite de búfala / Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP. **Conselho Regional de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 1, p. 14–19, 2012.

RIVERAA, A. et al. Importancia de los controles de calidad para la detección de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en enterobacterias. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, v. 32, n. 1, p. 30-36, 2014.

SAMPAIO, E.V.S.B. et al. **Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2005, 331p.

SANTOS, F.G.B. et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revta Nappama**, v.6, n. 1, p. 19-23, 2003.

SANTOS, A. L. et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal brasileiro de patologia medica laboratorial**. v, 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SHEDON, A.T. Antibiotic resistance: a survival strategy. **Clinical Laboratory Science**, v.18, n.3, p.170-180,2005.

SHIBATA H. et al. Alkyl Gallates, Intensifiers of β -Lactam Susceptibility in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.49, n. 9, p. 549-555, 2005.

SHITTU, A. et al. Identification and molecular characterization of mannitol salt positive, coagulase-negative staphylococci from nasal samples of medical personnel and students. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n.3, 317–324, 2006.

SINGHAL, R. et al. Species distribution & antimicrobial susceptibility of coagulase negative *Staphylococci* in a tertiary care hospital. **Indian Journal Medical Research**, v. 123,n.4, p. 569-570, 2006.

SILANIKOVE, N. et al.. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**, v. 89, n 2-3, p. 110-124, 2010.

SILVA, R.M.; SILVA, R.C.; RIBEIRO, A.B. Resíduos de antibiótico em leite. SaBios: **Revista Saúde e Biologia.**, v.7, n.1, p.30-44,2012.

SKEIE, S.B. Quality aspects of goat milk for cheese production in Norway: A review. **Small Ruminant Research**, v.122, n. 1-3, p. 10-17, 2014.

SUAREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, v.27, n. 1, p.116–129, 2009.

SUZUKI, H. et al. Comparative genomic of the genus *Staphylococcus* including *Staphylococcus aureus* and its newly described sister species *Staphylococcus simiae*. **BMC Genomics**, v. 13, n.38,p. 1471-2164, 2012.

SZYMANSKA, G. et al., Species-Specific Sensitivity of Coagulase-Negative Staphylococci to Single Antibiotics and their Combinations. Polish. **Journal of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 155– 161. 2011.

TAMASHIRO, E. et al. Implications of bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. **Brazilian Infectious Diseases**, v.13, n.3, p. 232-35, 2009.

TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis: Not so different from *Staphylococcus aureus*? **Veterinary Microbiology**, v.134, n.1-3, p. 29-36, 2009.

TENHAGEN, B.A. et al. A prevalência de patógenos causadores de mastite ea sua resistência contra agentes antimicrobianos em vacas leiteiras em Brandenburg, Alemanha. **Journal of Dairy Science**, v.89, n. 7, p. 2542-2551, 2006.

TERKI, I.K. et al. Detection of *icaA* and *icaD* genes and biofilmformation in *Staphylococcus* spp. isolated from urinary catheters at the University Hospital of Tlemcen (Algeria). **African Journal of Microbiology Research**, v. 74, n.47, p. 5350-5357, 2013.

THOMPSON, K. et al. Mastite bovina: Fronteiras em Immunogenetics. **Frontiers in Immunology**, v.5, p. 493, 2014.

TURK, S. et al. Novos inibidores não covalentes de proteínas de ligação à penicilina de bactérias resistentes à penicilina. **PLoS One**, v. 6, p.19-18, 2011.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v.92, n. 1-2, p.179-185, 2003.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciências Farmaceuticas Básicas Aplicada**, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

VAUTOR, E. et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. **Vet. Microbiol.**, v. 106, n.3-4, p. 235–239, 2005.

VELÁZQUEZ-MEZA ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. **Salud Publica de Mexico**, v.47, n.5, p. 381-7, 2005.

WEESE, J.S.; DUIJKEREN, V.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p.418–429, 2009.

XUE, T.; CHEN, X.; SHANG, F. *Short communication*: effects of lactose and milk on the expression. of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastites. **Journal of Dairy Science**, v. 97 n. 10, p. 6129-34, 2014.

ZAFALON, L.F. et al. *Staphylococcus aureus* portadores de genes de toxinas isolados em amostras de diferentes fontes de transmissão durante a ordenha. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 2, p. 269-277, 2009.

ZECCONI, A.; HAHN, G. ***Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk**. Bulletin of the International Dairy Federation, Bruxelas, v. 345, p.15-18, 2000.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 86, n.1, p.57–65, 2008.

Artigo Submetido para Pesquisa Veterinária Brasileira

Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett.
frente a *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite em ruminantes¹

Isamara F. Silva², Xirley P. Nunes³ e Mateus M. Costa²

ABSTRACT. - Silva I.S., Nunes X.P & Costa M.M. 2015. (Antimicrobial activity of the ethanol extract of *Commiphora leptophloeos* (Mart.) JB Gillett. over *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis in ruminants) Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett, frente a *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite em ruminantes. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal do Vale do São Francisco- UNIVASF, BR 407, Km 12, Lote 543, Distrito de Irrigação Senador Nilo Coelho - Rural, CEP: 56.300-990, Petrolina, Pernambuco, Brasil. E-mail: mateus.costa@univasf.edu.br

INDEX TERMS: Mastitis, *Staphylococcus* spp., Umburana de cambão, phytotherapy, antimicrobial activity, biofilm.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, Universidade Federal do Vale do São Francisco, *Campus* Ciências Agrárias, BR 407 Km 12, Lote 543, Petrolina, PE 56300-990. *Autor para correspondência: mateus.costa@univasf.edu.br

³ Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, *Campus* Centro (UNIVAF), Av. José de Sá Maniçoba s/n, Centro – Petrolina-PE. Cep. 56304-917.

RESUMO. - Visando o potencial terapêutico das plantas medicinais como alternativas a antibióticoterapia, a pesquisa tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana da *Commiphora leptophloeos* frente a isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de leite de ruminantes com mastite. Para isso, foi preparado o extrato etanólico bruto das cascas e folhas de *Commiphora leptophloeos*, sendo o mesmo caracterizado fitoquimicamente. Na sequência, os extratos foram avaliados quanto aos seus efeitos antimicrobianos, frente a isolados de *Staphylococcus* spp., através da técnica de microdiluição em caldo para determinação da concentração bactericida mínima. Além disso, os extratos foram avaliados quanto a sua capacidade em interferir com a formação do biofilme e com o biofilme já consolidado. Embora todos os extratos testados tenham exibido ação antimicrobiana, melhores valores de CBM foram registrados para o extrato da casca. O extrato da folha apresentou melhor atividade na concentração 3,125 µg/ml (36 /60) e o EEB da casca na concentração 781,2 µg/ml (25/60). Os extratos da cascas e folhas foram capazes de interferir com as etapas iniciais da formação do biofilme, por outro lado não foi observada interferência do extrato no biofilme já consolidado. Observou-se uma alta sensibilidade dos *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de mastites em ruminantes, quando submetidos aos extratos da folha e casca da *Commiphora leptophloeos*, bem como a capacidade dos extratos em interferir na formação do biofilme, indicando seu potencial uso na terapia das mastites em ruminantes.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Mastite, *Staphylococcus* spp., umburana de cambão, fitoterápicos, atividade antimicrobiana, biofilme.

INTRODUÇÃO

A mastite é uma das doenças infecciosas que mais tem causado prejuízos a indústria de laticínios em todo o mundo, ocasionando perdas profundas em todas as fases de produção (Getahum et al. 2008, Pyörälä e Taponen 2009). Os prejuízos compreendem especialmente o custo elevado com tratamento e aplicação de antibióticos, redução na produção leiteira e descarte de leite contaminado (Dhakal et al. 2007, Gernand et al. 2012).

Nas inúmeras etiologias envolvidas nos casos de mastites, a infecção bacteriana é a mais comumente relatada na literatura, sendo as bactérias do gênero *Staphylococcus* as mais isoladas nos casos de infecções intramamárias em ruminantes (Godden et al. 2002, Tenhagen et al. 2006). A resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. é atribuída à combinação de efeitos de diversos fatores celulares e extracelulares (Costerton et al. 1999). Os mais importantes são relacionados a produção de β -lactamase, que em alguns casos pode ser mediada pelo gene *blaZ*, conferindo resistência de amplo espectro aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos e a formação de biofilme um dos principais fatores responsáveis pela infecção bacteriana persistente ou crônica (Costerton et al. 1999, Olsen et al. 2006, Xue et al. 2014).

O tratamento da mastite é complexo e requer a intervenção por meio de antimicrobianos de amplo espectro sistêmicos e com ação local. No entanto um dos grandes impasses no emprego desses antibióticos tratamento da doença é a ocorrência de cepas resistentes a esses medicamentos (Goni et al. 2004, Harbottle et al. 2006). A tolerância aos antimicrobianos deve-se aos genes de resistências a essas drogas presentes nos cromossomos ou plasmídeos bacterianos. Estes genes permitem que as bactérias expressem enzimas capazes de destruir os antimicrobianos ou modificar os sítios alvo das drogas ou produzirem uma rota metabólica alternativa que contornam a ação desses medicamentos (Sheldon 2005, Tenover & McGowan JR. 2008). Vários genes de resistência estão associados à resistência do *Staphylococcus* spp., aos antimicrobianos dentre eles encontra-se os genes *blaZ* (Wright 2005). Gene responsável pela expressão da enzima β -lactamase, que utiliza o anel β -lactâmico das penicilinas como substrato, degradando-o por hidrólise (Wuet al. 2001, Li et al. 2007, Ender et al. 2008).

Levando-se em conta as preocupações atuais sobre a emergência de bactérias resistentes aos antibióticos comerciais comumente utilizados no tratamentos da mastite em ruminantes, a busca por novos potenciais antibiofilme e antibacteriano como alternativas terapêuticas é uma questão de extrema importância. Assim o mercado farmacêutico tem procurado encontrar novas fontes de substâncias com atividades antimicrobianas, como as plantas utilizadas na medicina tradicional, que cumpram os mesmos critérios de eficácia, segurança e controle de qualidade dos produtos sintéticos (Novais et al. 2003, Shibata et al. 2005, Stapleton et al. 2005).

A *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett é uma espécie da flora brasileira da família *Burseraceae* do gênero *Commiphora*, conhecida popularmente como imburana de cambão ou

imburana de espinho (Maia 2004, Sampaio 2005). Usada no tratamento da gripe, a tosse, bronquite, doenças urinárias e fígado. (Agra et al. 2007a).

Se tratando de uma espécie muito comum na região do semiárido e considerando os estudos realizados com outras plantas nativas da caatinga como a Jurema-preta e *Amburana cearencis* ambas empregadas na medicina caseira em várias regiões do país, sobretudo no Nordeste, onde são utilizadas na forma de lambedor ou chá, com propriedade analgésica, antiinflamatória, antiespasmódica e broncodilatadora. Diante disso o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a atividade antimicrobiana “*in vitro*” do extrato etanólico bruto das cascas e folhas da *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett, contra isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de casos de mastites em ruminantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 60 isolados de *Staphylococcus* spp., obtidos de casos de mastite bovina (39), bubalina (14) e caprina (07) provenientes de propriedades leiteiras da região Nordeste do Brasil e armazenadas na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Dentre os isolados de *Staphylococcus* spp., 16 *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (SCN) e 44 *Staphylococcus* spp. Coagulase positiva (SCP). Os isolados foram divididos quanto a presença ou não do genes *bla_Z*, formadores fortes e moderados de biofilme (Quadro 1).

Os extratos etanólicos brutos (EEB) foram obtidos a partir da coleta da cascas e folhas da *Commiphora leptophloeos*, localizada no município de Petrolina-PE no *Campus* Universitário Ciências Agrárias da UNIVASF no Projeto de irrigação C1, próximo ao Hospital Veterinário, estando posicionada geograficamente entre as coordenadas - 09° 19' 47, 22" S, 40° 33' 22,39" W, 392 m de Altitude, Caatinga. Após coleta das cascas e folhas foram secas em estufa com ar circulante à temperatura média de 40°C durante 5 dias, em seguida, as cascas e folhas separadamente foram pulverizadas em moinho mecânico (446 g-casca, 215 g-folha). Na sequência os materiais foram filtrados, concentrados em rotaevaporador, a uma temperatura média de 50°C, obtendo-se os extratos etanólico bruto (EEB) das cascas e folhas. Dessa forma, foram obtidos 105,5g do EEB das cascas e 45,9 g das folhas. Foram feitas quatro extrações com intervalos de 72 h entre eles para máxima extração dos constituintes químicos. O extrato obtido foi utilizado nos testes de detecção da atividade antimicrobiana *in vitro* diluído em etanol 95%.

Os testes de sensibilidade *in vitro* foram realizados pelo método de Kirby-Bauer conforme recomendações (CLSI 2006). Os fármacos testados foram Ampicilina (10 µg), Penicilina G (10 µg) e Oxacilina (10 µg), afim de se verificar o perfil de resistência dos isolados aos principais β-lactâmicos empregados rotineiramente no tratamento da mastite. Culturas de 24 h dos isolados crescidas em TSA no tratamento da mastite, foram transferidas para tubos de ensaio individuais contendo 5mL de caldo Mueller-Hinton (MH), ajustado para a escala 0,5 de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/mL) e incubados a 37°C por 24 h. No dia seguinte, com um auxílio de *swab* estéril os inóculos foram semeados em placas individuais contendo 20 ml de ágar MH, sendo adicionados na sequência, os discos impregnados com as substâncias antimicrobianas. Por fim, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Com o auxílio de uma régua os halos de inibição foram medidos e os diâmetros comparados com o tabelado segundo CLSI (2006), para determinação de resistência ou sensibilidade da amostra frente ao antimicrobiano. Os resultados foram expressos como: resistente (R) ou sensível (S) aos antibióticos, de acordo com a recomendação do fabricante dos discos.

A microdiluição, foi determinada pela técnica de diluição em microplacas de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M07-A9 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012). Inicialmente foi realizada a pesagem de 0,25 g dos extratos das cascas e folhas separadamente, sendo estes diluídos em 10 ml de etanol 95%, obtendo-se uma solução estoque na concentração de 25.000 µg/ml. A microdiluição consistiu na distribuição de 200 µL de MH de microtitulação de 96 poços; a seguir, 200 µL da solução estoque do extrato foram acrescidos ao primeiro poço e, após homogeneização, transferidos para o segundo e assim sucessivamente, sendo obtidas as seguintes concentrações finais: 12.500; 6.250; 3.125; 1.562,5; 781,2; 390,6; 195,3 e 97,6 µg/ml. As suspensões bacterianas foram preparadas, a partir da cultura recente de cada isolado. Primariamente uma alçada da colônia bacteriana foi ajustada para a escala de 0,5 MacFarland (aproximadamente 10⁸ UFC/ml.), em tubos de ensaio com 5 ml de solução salina. Em seguida foram transferidos 100 µL dessa suspensão para outro tubo de ensaio contendo 9,9 ml de caldo MH. Este inóculo (10 µL) foi aplicado nos poços de microplacas, contendo as diluições dos EEB de cascas e folhas. O material foi incubado a 37°C por 24 h, em condições de aerobiose. Após 24 h de incubação

foi retirada uma alíquota de 10 µl com auxílio de uma replicador e semeada em placa com 40 ml de ágar MH e novamente incubando por 24 h a 37°C, para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), que corresponde à menor quantidade do extrato capaz de matar os isolados de *Staphylococcus* spp.

A Capacidade dos extratos em interferir na formação do biofilme, foi determinada baseada na metodologia apresentada por Nostro et al. (2007). Os isolados bacterianos foram cultivados em 3 ml de caldo TSB com glicose (1%) e incubado por 24 h a 37°C. Dos quais, 100 µl foram acrescidos nos poços da microplaca, que previamente haviam sido acrescidos de 100 µl do extrato vegetal ou 100 µl de meio de cultura nos controles negativos. A concentração do extrato utilizada foi equivalente à metade do valor de CBM observado na microdiluição em placa (0,5 CBM). Após 24 h de incubação a 37° C, as amostras foram lavadas com 200 µl de água destilada três vezes. Em seguida, os poços foram corados com 100 µl de Violeta de Giemsa a 0,25% por 3 minutos e em seguida todos os poços foram novamente lavados com 200 µl de água destilada. Por fim, adicionou-se 200 µL de álcool-cetona para diluição dos cristais. A absorbância foi medida em leitor de microplacas de Elisa Easys® e mensurada em filtro de 620 nm. Como controle negativo foi utilizada a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 e como controle positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Será determinada a produção de biofilme através da seguinte classificação: sem produção de biofilme (DO amostra ≤ DO controle negativo), fraca produção de biofilme (DO amostra > DO controle negativo < DO amostra ≤ 2. DO controle negativo), moderada produção de biofilme (DO amostra > 2. DO controle negativo < DO amostra ≤ 4. DO controle negativo) e forte produção de biofilme (DO amostra > 4. DO controle negativo).

A Capacidade do extrato de interferir no biofilme já consolidado, baseado na metodologia apresentada por Nostro et al. (2007). A formação de biofilme foi obtida a partir da incubação de 100 µL do inoculo bacteriano em microplacas por 24 h a 37°C. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com água destilada, para a remoção de células não aderidas, e então acrescidos de 200 µL do extrato (0,5 CBM). A DO foi determinada imediatamente após a adição do extrato (0 h) e 24 h depois. A absorbância foi medida em leitor de microplacas de Elisa Easys® e mensurada em filtro de 620 nm. A interferência do extrato no biofilme consolidado foi definida pela equação: DO média dos poços tratados/DO média dos poços controle x 100.

Para análise dos resultados referentes a CBM frente aos dois tipos de extrato, realizou-se o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, sendo observada ausência de normalidade dos dados. Em seguida, procedeu-se a transformação logarítmica de base 10 (\log_{10}) que também não foi suficiente para remoção da heterogeneidade de variâncias. Assim, utilizou-se um teste não-paramétrico para duas amostras pareadas (Teste de Wilcoxon) com objetivo de comparar as médias obtidas da CBM frente aos dois extratos. Na comparação dos resultados da CBM entre os isolados (coagulase negativa x positiva) e (*blaZ* positivo x *blaZ* negativo), utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Para análise dos dados, foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0 para Windows.

RESULTADOS

Os resultados *in vitro* dos ensaios de difusão em disco dos antimicrobianos β-lactâmicos mais indicados para tratamento de mastite foram realizados em todos os isolados de *Staphylococcus* spp. Trinta e quatro isolados se apresentaram resistentes a penicilina G (7 SCN, 27 SCP), 30 a ampicilina (3 SCN, 27 SCP) e 14 a oxacilina (7 SCN, 7 SCP). Vinte e três apresentaram resistência a pelo menos dois antimicrobianos e quatro apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados (Quadro 2). Os resultados do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos β-lactâmicos pelo método de difusão em disco, foram comparados com a presença do gene *blaZ*. Dos 60 isolados de *Staphylococcus* spp., 14 são negativos para presença do genes *blaZ* e 46 positivos para o mesmo gene. Dos 46 isolados positivos apenas 10 foram sensíveis a todos os antimicrobianos β-lactâmicos testados (Fig. 1.).

Os valores de CBM, referentes à atividade antimicrobiana do EEB das cascas e folhas da *Commiphora leptophloeos*, encontra-se representados na Fig. 2. Tanto o extrato etanólico bruto das cascas, como das folhas apresentaram ação antimicrobiana em todos os isolados de *Staphylococcus* spp. Desta forma, ficou evidente o potencial do uso da *Commiphora leptophloeos* como agente antimicrobiano. Contudo os menores valores de CBM foram registrados para o extrato da casca, isso se deve ao fato da casca *Commiphora leptophloeos* ser uma importante fonte de compostos bioativos. O EEB das folhas apresentou maior atividade na concentração 3.125 µg/mL (36/60) e o EEB das cascas na concentração 781.2 µg/mL (24/60). Observou-se diferença significativa ($p < 0,001$)

entre os resultados da CBM obtidos frente ao extrato elaborado a partir da casca e folha, obtendo-se médias menores frente ao extrato da casca (Quadro 3).

Quando se comparou as medianas da CBM obtidas para os SCP e SCN, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para o extrato da casca, sendo as medianas iguais a 781,20 e 3.125,00 $\mu\text{g/mL}$ para os SCP e SCN, respectivamente. Com relação à comparação realizada entre os isolados *blaZ* positivos e negativos, observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) também para o extrato da casca, com valores de mediana iguais a 1.562,50 e 3.125,00 $\mu\text{g/mL}$ para os *Staphylococcus* spp. *blaZ* positivo e negativo, respectivamente.

De acordo com a produção de biofilme os isolados de *Staphylococcus* spp., foram previamente (Medeiros et al. 2011, Guimarães et al. 2012) divididos quanto a produção forte e moderada (Quadro 1). O EEB das folhas e da *Commiphora leptophloeos* foi capaz de diminuir a formação de biofilme em 43 isolados. Sendo que desses isolados 20 eram fortes produtores de biofilme e 23 moderados. Quanto ao EEB das cascas da *Commiphora leptophloeos* também foi capaz de interferir na formação do biofilme de 47 isolados, sendo que 22 eram previamente classificados como fortes produtores de biofilme e 25 como moderados (Quadro 2). Nenhum dos EEB foram capazes de interferir no biofilme bacteriano consolidado.

DISCUSSÃO

A pesquisa de novos compostos com ação antimicrobiana tem levado a comunidade científica a investigar a corrida medicamento x microrganismos, pois desde o início dos anos 80 o número de antimicrobianos em fase de desenvolvimento diminuiu consideravelmente (Cooper & Shlaes 2011). Por outro lado, a resistência dos microrganismos aos mesmos tem crescido de forma imensurável, porque eles estão cada vez mais desenvolvendo uma série de novos mecanismos de resistência (File Jr 2000).

Os resultados do antibiograma mostraram alto nível de resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. a todos os antimicrobianos testados. Muitos fatores podem estar envolvidos com a resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. (Lowy 2003). A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos está associada à inativação do anel β -lactâmico e produção de PBP2a que tem pouca afinidade aos β -lactâmicos (Bignardi et al. 1996, Lowy 2003). Contudo a alta resistência aos antimicrobianos pode estar relacionada com a frequência e o longo prazo de uso destes no tratamento de infecções intramamárias (Pitkala et al. 2004, Kumar et al. 2009).

Nossos dados demonstraram que 42 isolados de *Staphylococcus* spp. incluindo SCP e SCN são positivos para o gene *blaZ*, sendo presumida a presença de enzimas cujo papel é a inativação de β -lactâmicos pela hidrólise do anel β -lactâmico (Kernodle 2000, Li et al. 2007). Os dados se assemelham com o estudo realizado por Duran et al. (2012) que demonstrou que a maioria das cepas de *Staphylococcus* spp., em sua pesquisa eram genotipicamente positivas para o gene *blaZ*. Moser et al. (2013), em pesquisa baseada na análise de microarranjo de DNA de 78 isolados de *Staphylococcus aureus* oriundos de leite de mastite bovina eram positivos para a presença do gene *blaZ*. No presente estudo, os isolados *blaZ* positivos foram resistentes simultaneamente a vários β -lactâmicos testados, o que é esperado dada a resistência de amplo espectro codificada por este gene (Lowy 2003). De acordo com o estudo realizado por Olsen et al. (2006), o gene *blaZ* pode ser considerado um mecanismo importante para a resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos. Este gene produz uma penicilinase, sendo um dos principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, drogas utilizadas frequentemente em casos de infecções intramamárias em ruminantes que se ligam as PBPs bacterianas exercendo efeito antimicrobiano (Livermore et al. 2000, Fuda et al. 2005).

Nessa pesquisa, observou-se melhor atividade antimicrobiana para o extrato etanólico bruto das cascas da *Commiphora leptophloeos*. Na pesquisa realizada por Trentin et al. (2011), o extrato aquoso das cascas da *Commiphora leptophloeos*, apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* numa concentração de 1,0 mg / mL. As diferenças dos valores de CBM entre os EEB observadas podem ser atribuídas a composição química das substâncias antimicrobianas presentes nos diferentes extratos vegetais. Uma análise dos compostos fenólicos realizado por Araujo et al. (2008), revelaram alto teor de flavonóides e taninos nas cascas de *Commiphora leptophloeos*. Os compostos fenólicos presentes nas plantas estão relacionados, principalmente, com a proteção, conferindo alta resistência a microrganismos e pragas (Everette et al. 2010).

Outro ponto importante que justifique a diferença dos valores de CBM entre os EEB testados, são as partes (casca e folha) utilizadas da planta, uma vez que as substâncias ativas de uma planta

se distribuem pelos diferentes órgãos das plantas de forma desigual, em função das especializações das células. Podem ser encontrados em maior quantidade em determinadas partes (raízes, folhas, caules, sementes ou flores), por isso a necessidade de conhecer qual órgão da planta é usado como medicamento (Trindade et al. 1998). Segundo Vasconcelos et al. (2004), geralmente as folhas apresentam menor concentração de agentes antimicrobianos que as cascas das plantas. Contudo recomenda-se o uso das folhas pela vantagem de ser uma prática sustentável garantindo a sobrevivência da planta.

Além da *Commiphora leptophloeos* outras plantas nativas da caatinga já foram testadas quanto ao seu efeito antimicrobiano todas com resultados promissores. Sá et al. (2011) e Silva et al. (2014) em ambas pesquisas avaliaram a atividade antimicrobiana de seis espécies da caatinga incluindo a *Amburana cearensis* e a *Neoglaziovia variegata*, *Encholirium spectabile*, *Bromélia laciniosa*, *Hymenaea martiana* e *Selaginella convoluta* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Silva et al. (2007), avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato hidroalcoólico da casca do caule da *Anacardium occidentale* frente a amostras de *Staphylococcus aureus* oriundas de pacientes humanos na Paraíba. Chanh et al. (2006) obtiveram ótimos resultados sobre a ação antimicrobiana de extratos de folha e da raiz de *Psidium guajava* contra micro-organismos causadores de infecções intestinais. Schuhly et al. (2000) avaliaram o extrato bruto com diclorometano e observaram ação antimicrobiana desde frente a bactérias Gram-positivas. Silva et al. (2011), determinaram as atividades antioxidantes e antimicrobianas de extratos de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro*.

Em relação a diferença de sensibilidade dos EEB de casca e folha sobre o perfil dos isolados testados, verificou-se uma maior atividade dos *Staphylococcus* spp. coagulase positivas e isolados *blaZ* positivos ao extrato da casca de *C. leptophloeos*. Estes resultados são importantes considerando-se a importância de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, em especial o *S. aureus*, produtores de beta lactamases na etiologia das mastites em ruminantes (Coelho et al. 2009, Taponen & Pyörälä 2009) A emergência de cepas resistentes a terapia antimicrobiana convencional, indica a importância da busca de outras alternativas, como os produtos naturais (Godreuil et al. 2014) algo observado no presente estudo.

De acordo com Costerton, Stewart e Greenberg (1999), a matriz bacteriana que envolve as células aderidas, é constituída principalmente por polímeros orgânicos, contendo também proteínas, lipídeos, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas. Os extratos vegetais, por serem constituídos de diversas substâncias químicas de origem natural, podem apresentar uma ação significativa sobre a estrutura da biomassa bacteriana.

Os resultados do presente estudo mostraram interferência dos EEB das folhas e cascas na formação do biofilme, resultados semelhantes são citados na literatura. No estudo realizado por Trentin et al. (2011), foi possível observar interferência do extrato aquoso das cascas de *C. leptophloeos* na formação de biofilme de isolados de *Staphylococcus epidermidis*. Em um outro estudo Trentin et al. (2013) também observaram atividade antibiofilme de extrato aquoso das cascas de *C. leptophloeos* frente a isolados de *Pseudomonas aeruginosa*. As plantas tem sido cada vez mais pesquisadas com o objetivo de inibir a formação do biofilme, por se mostrarem potencialmente eficazes no que se refere à sua atividade antimicrobiana sobre várias espécies de microrganismos (Pereira et al. 2006). Podendo revelar potentes fontes valiosas de moléculas bioativas para lutar contra fatores de virulência de patógenos, como exemplo a capacidade de extratos vegetais para inibir ou eliminar biofilmes (Nazzaro et al. 2013). Na pesquisa realizada por Issac Abraham et al. (2011), testando 2 mg/ml do extrato da *Capparis spinosa* observou significativa inibição na formação do biofilme a 79,75,73 e 70% em *Serratia Marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, o extrato se mostrou eficaz em interromper a formação do biofilme sem afetar o crescimento bacteriano. Issac Abraham e colaboradores ainda concluíram que o extrato da *Capparis spinosa* poderia ser combinado com um antimicrobiano convencional para controlar eficientemente a formação do biofilme permitindo que o antimicrobiano atinja as células bacterianas que vivem no interior do biofilme. Com isso, os compostos naturais capazes de prevenir a formação de biofilme podem ser uma alternativa viável para reduzir resistência antimicrobiana (González-Ortiz et al. 2014).

Os biofilmes foram observados como sendo mais resistentes aos agentes antimicrobianos quando comparados a células planctônicas (Jadhav et al. 2013), necessitando urgentemente de novos agentes anti-biofilme (Schilaci et al. 2008). Contudo a forte adesão gerada pelas bactérias à superfície, dificultando a remoção de biofilmes já constituídos, pode explicar porque os extratos testados não interferiram no biofilme já consolidado. Uma vez que quando ocorre a consolidação do biofilme, é muito difícil tratar clinicamente, porque as bactérias no interior deste estão bem protegidas contra a resposta imune do hospedeiro, bem como agentes antimicrobianos (Hoyle & Costerton 1991, Drenkard 2003). Outro ponto que deve ser ressaltado é o de que as bactérias dentro do biofilme

também podem diferenciar-se em estados fenotipicamente protegidos, permitindo que bactérias sésseis sejam resistentes a ação de antimicrobiana (Costerton et al. 1995).

Um dos principais mecanismos de resistência dos biofilmes bacterianos até então investigado, é a barreira física exercida pela matriz de polissacarídeo que bloqueia a difusão da compostos ou inativa a atividade biocida de alguns agentes antimicrobianos (Stewart & Costerton 2001, Lasa et al. 2005). Por outro lado existem outras estratégias a serem consideradas, como a presença de microambientes que antagonizem com a ação antimicrobiana (Stewart & Costerton 2001, Mah & O'Toole 2001).

Segundo Gonzalez-Ortiz et al. (2013), a inibição do biofilme em formação pode depender de fenômenos ligados a inibição enzimática de proteases e mecanismos de *quorum sensing*. Sua estabilidade deve-se a proteínas e carboidratos, que quando depositados, dificultam a ação de compostos sanificantes e antimicrobianos (Wang et al. 2013, Peixoto et al. 2015).

Diante dos dados apresentados concluímos que o EEB das cascas e folhas da *Commiphora leptophloeos* possuem relevante ação antimicrobiana as cepas de *Staphylococcus* spp. bem como capacidade para interagir com a formação do biofilme. Desta forma é imprescindível o estudo da potencialidade desta planta contra os agentes causadores da mastite em ruminantes com objetivo de produzir elementos para sua aplicação no tratamento de animais enfermos.

Agradecimentos. A professora Xirley Pereira Nunes e sua equipe de laboratório, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). A professora Tânia Maria Sarmiento da Silva e equipe de laboratório, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelas análises fitoquímicas dos EEB. A Universidade Federal do Vale do São Francisco. A todos os professores e colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF por toda a ajuda. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Agra M.F., Baracho G.S., Silva N.K., Basílio I.J.L.D. & Coelho V.P.M. 2007. Medicinal e venenosas diversidade da flora de "Cariri Paraibano", *BrasilJournal of Ethnopharmacology*, 111:383-395.
- Araujo T.A.S., Alencar N.L., Amorim E.L.C. & Albuquerque U.P. 2008. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology* 120:72-80.
- Bignardi G.E., Woodford N., Chapman A., Johnson A.P. & Speller D.C.E. 1996. Detection of the *mec-a* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. *J. Antim Chemother.* 37:53-63.
- Chah K. F. Eze C. A., Emuelosi C. E. & Esimone C. O. 2006. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 104:164-167.
- CLSI. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standards. CLSI Document M7-A7. Wayne, PA Pennsylvania, 88p.
- CLSI. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 88p.
- Coelho S.M.O., Reinoso E., Pereira I.A., Soares L.C., Demo M., Bogni C. & Souza M.M.S. 2009. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.* 29:369-374.

- Cooper M. A. & Shlaes D. 2011. Fix the antibiotic pipeline. *Nature* 472: 32.
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R. & Lappin-Scott H.M. 1995. Biofilms microbianos. *Annu Rev Microbiol* 49: 711-745.
- Costerton J.W., Stewart P.S. & Greenberg E.P. 1999. Bacterial biofilms common cause of persistent infections. *Science*. 284:1318-22.
- Dhakal I. P., Dhakal P., Koshihara T. & Nagahata H. 2007. Epidemiological and bacteriological survey of buffalo mastitis in Nepal. *J. Vet. Med. Sci.* 69:1241–1245.
- Drenkard E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 5:1213–1219.
- Duran N., Ozer B., Duran G.G., Onlen Y. & Demir C. 2012. Antibiotic resistance genes and susceptibility patterns in staphylococci. *Indian J. Med. Res.* 135:389-396.
- Ender M., McCallum N. & Berger-Ba B. 2008. Impact of *mecA* promoter mutations on *mecA* expression. and β -lactam resistance levels. *International Journal of Medical Microbiology* 298:607–617.
- Everette J. D., Bryant Q. M., Green A. M., Abbey Y. A., Wangila G. W. & WALKER R. B. 2010. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 58:8.139-8.144.
- File Jr TM 2000. Visão geral sobre resistência bacteriana nos anos 90. *Ple Chest* 2: 3-8.
- Fuda C. C. S., Fisher J. F., Mobashery S. 2005. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:2617–2633.
- Gernand E., Rehbein P., von Borstel U.U. & König S. 2012. Incidences of and genetic parameters for mastitis, claw disorders, and common health traits recorded in dairy cattle contract herds. *J. Dairy Sci.* 95:2144–56.
- Getahun K., Kelay B., Bekana M. & Lobago F. 2008. Bovine mastitis and antibiotic resistance patterns in Selalle smallholder dairy farms, central Ethiopia. *Trop. Anim. Health. Prod.* 40:261–268.
- Godden S.M., Jansen J.T., Leslie K.E., Smart N.L. & Kelton D.F. 2002. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. *Canadian Veterinary Journal* 43:38-42.
- Godreuil S., Leban N., Padilla A., Hamel R., Luplertlop N., Chauffour A., Vittecoq M., Hoh F., Thomas F., Sougakoff W., Lionne C., Yssel H. & Missé D. 2014. Aedesin: Structure and Antimicrobial Activity against Multidrug Resistant Bacterial Strains. *PLoS ONE* 9:1371.
- Goni P., Vergara Y., Ruiz J., Albizu I., Vila J. & Gomez-Lus R. 2004. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23:268-272.
- Gonzalez-Ortiz G., Perez J.F., Hermes R.G., Molist F., Jimenez-Diaz R. & Martin-Orue S.M. 2014. O rastreio da capacidade de ingredientes de alimentos naturais para interferir com a aderência de enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 ao muco intestinal suína. *Br J Nutr*, 111:633-642.

- Guimarães G., França C.A., Krug S.F., Peixoto R.M., Krewer C.C., Lazzari A.M. & Costa M.M. 2012. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32: 1219-1224.
- Harbottle H., Thakura S., Zhao S. & White D.G. 2006. Genetics of antimicrobial resistance. *Anim. Biotechnol* 17:111-124.
- Hoyle B. D. & Costerton J. W. 1991. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog. Drug Res.* 37:91–105.
- Issac Abraham S.V.P., Palani A., Ramaswamy B.R., Shunmugiah K.P. & Arumugam v.r. 2011. Antiquorum Sensing and Antibiofilm Potential of *Capparis spinosa*. 42:658-668.
- Jadhav S., Shah R., Bhave M. & Palombo E.A. 2013. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control.* 29:125-130.
- Kernodle D.S. 2000. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. In *Gram-positive pathogens*. V.A. Fischetti, R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy, and J.I. Rood, editors. American Society for Microbiology. Washington, DC, USA. 609–620
- Kumar R, Yadav B. R. & Singh R.S. 2009. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. *Curr Microbiol.* 60:379–386.
- Lasa, I., Pozo J.L. Penades J.R. & Leiva J. 2005. Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navar.* 28:163-175.
- Li X.Z., Mehrotra M., Ghimire S. & Adewoye L. 2007. β -lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Vet. Microbiol.* 121:197-214.
- Livermore, D. M. 2000. Antibiotic resistance in *staphylococci*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16:3-10.
- Lowy F. 2003. Resistência aos antimicrobianos: A exemplo de *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 111:1265-1273.
- Maia G. N. 2004. Caatinga: arvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: Leitura & Arte, p. 413.
- Mah T.F. & O'Toole G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9: 34-39.
- Medeiros E.S., França C.A., Krewer C.C., Peixoto R.M., Júnior A.F.S., Cavalcante M.B., Costa M.M. & Mota R.A. 2011. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolates from cases of mastitis in buffalo in Brazil. *J VET Diagn Invest* 23:793.
- Moser A., Stephan R., Corti S. & Johler S. 2013. Comparison of genomic and antimicrobial resistance features of latex agglutination test-positive and latex agglutination test-negative *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 96:329–334.
- Nazzaro F., Fratianni F. & Coppola R. 2013. Quorum sensing and phytochemicals. *Int J Mol Sci* 14: 12607– 12619.
- Nostro A., Roccaro A. S., Bisignano G., Marino A., Cannatelli M.A., Pizzimenti F. C., Cioni P. L.; Procopio F. & Blanco A. R. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on

- Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J. Med. Microbiology 56:519–523.
- Novais T. S., Costa J. F. O., David J. P. L., David J. M., Queiroz L. P., França F., Giulietti A. M., Soares M. B. P. & SANTOS R. R. 2003. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. Rev. Bras. Farmacogn. 13:05-08.
- Olsen J.E., Christensen H. & Aarestrup F. M. 2006, Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J. Antimicrob Chemother 57:450–460.
- Peixoto M.M.R., Gressler L.T., Sutili F.J., Costa M.M. & Vargas A.C. 2015. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. Pesq. Vet. Bras. 35:105-109.
- Pereira JV, Pereira MSV, Sampaio FC, Sampaio MCC, Alves PM, Araújo CRF, Higino JS 2006. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. Rev Bras Farmacogn 16: 88-93.
- Pitkälä A., Haveri M., Pyörälä S. & Myllys V. 2004. Honkanen-Buzalski, T. Bovine mastitis in Finland 2001 —Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J. Dairy Sci. 87:2433–2441.
- Pyorala S. & Taponen S. 2009. Coagulase-negative staphylococci – Emerging mastitis pathogens. Vet. Microbiol. 134: 3-8.
- 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. 18:62-66.
- Sampaio E. V. S. B., Pareyn F. G. C., Figueirôa J. M. & Santos Junior A. G. 2005. Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 331p
- Schilaci D., Arizza V., Dayton T., Camarda L. & Di Stefano V. 2008. In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. Lett. Appl. Microbiology. 47:433-8.
- Shibata H., Kondo K., Katsuyama R., Kawazoe K., Sato Y., Murakami K., Takaishi Y., Arakaki N. & Higuti T. 2005. Alkyl Gallates, Intensifiers of β -Lactam Susceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents Chemotherapy 49:549-555.
- Schühly W., Heilmann J., Çalis I. & Stiche O. 2000. Novel Triterpene Saponins from *Zizyphus joazeiro*. Helvetica Chimica Acta 83:1509.
- Silva J. G., Souza I. A., Higino J. S., Siqueira-Júnior J. P., Pereira J. V., Pereira M. S. V. 2007. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. Brazilian Journal of Pharmacognosy 17:572-577.
- Silva T.C.L., Almeida C.C.B.R., Veras Filho J., Peixoto Sobrinho T.J.S., Amorim E.L.C., Costa E.P. & Araújo J.M. 2011. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Zizyphus joazeiro* mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 32:193-199.
- Silva V.F., Franco I., Damasceno T.E.F., Almeida J.R.G. & Costa M.M. 2014. Potencial antimicrobiano de extratos etanólicos de plantas frente a bacilos gram negativos isolados da

- mucosa cérvico-vaginal de ovelhas criadas na região de Petrolina-PE. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina 35:883-890.
- Stewart P. S. & Costerton J. W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 358:135-138.
- Stapleton P.D., Shah S. & Taylor P.W. 2005. Altered cell surface properties and decreased autolytic activity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by epicatechin gallate; International Union of Microbiological Societies; San Francisco, USA.
- Taponen S. & Pyörälä S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology* 134:29-36.
- Tenhagen B. A., Köster G., Wallmann J. & Heuwiese R.W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.* 89:2542-2551.
- Tenover F. C. & McGowan JR. J. E. 2008. Antimicrobial resistance. *International Encyclopedia of Public Health*, p.211-219.
- Trentin D.S., Giordani R.B., Zimmer K.R., Silva A.G., Silva M.V., Correia M.T., Baumvol I.J. R. & Macedo A.J. 2011. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology* 137:327-335.
- Trentin D.S., Silva D.B., Amaral M.W., Zimmer K.R., Silva M.V., Lopes N.P., Giordani R.B. & Macedo A.J. 2013. Taninos Possuindo Bacteriostatic Efeito Impair *Pseudomonas aeruginosa* adesão e formação de biofilme. *PLoS ONE* 8:66257.
- Trindade D.R., Poltronieri, L.S. & Albuquerque F.C. 1998. Ocorrência de mancha foliar em coqueiro causada por *Cylindrocladium pteridis* no Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* 23:412.
- Vasconcelos S.M., Macedo D.S., De Melo C.T., Monteiro A.P., Rodrigues A.C., Silveira E.R., Cunha G.M., Sousa F.C. & Viana G.S. 2004. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. *J Pharm Pharmacol* 56: 389-393.
- Wang H., Ding S., Wang G., Xu X. & Zhou G. 2013. In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 167:293-302.
- Wright G. D. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57:1451-1470.
- Wu T.L., Siu L. K., Su L.H., Lauderdale T. L., Lin F. M., Leu H.S., Lin T.Y. & Ho, M. 2001. Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 β -lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 47, 755–761.
- Xue T., Chen M. & Shang F. 2014. *Short communication*: effects of lactose and milk on the expression. of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastites. *J. Dairy Sci.* 97:6129-6134.

Legendas das Figuras

Fig. 1. Comparação da resistência dos isolados *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos e a presença ou não do gene *blaZ*.

Fig. 2. Distribuição dos valores de CBM dos EEB das cascas e folhas da *Commiphora leptophloeos* sobre os isolados de *Saphylococcus* spp.

Quadro 1. Origem e classificação dos isolados de *Staphylococcus* spp., utilizados no presente estudo

Espécies	Sítio de coleta	Isolados	Quantidade	<i>BlaZ</i>			
				PO	NE	MO	FO
Bovina	Leite	SCP	37	36	01	23	14
		SCN	02	01	01	01	01
Bubalina	Leite	SCN	14	06	08	04	10
Caprina	Leite	SCP	07	03	04	07	-*
Total			60	46	14	35	25

*(-) ausência

SCN = *Staphylococcus* coagulase negativa, SCP = *Staphylococcus* coagulase positiva, PO = positivo, NE = negativo, MO = moderado, FO = forte

Quadro 2. Perfil de resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp., de acordo com a presença ou não do gene *blaZ*

Resistencia Fenotípica	SCP <i>blaZ</i> +	SCP <i>blaZ</i> -	SCN <i>blaZ</i> +	SCN <i>blaZ</i> -
PEN G	2	-*	1	-
AMP	2	1	-	-
OXA	3	-	1	2
PEN G, AMP	20	2	-	1
PEN G, OXA	1	-	3	-
PEN, AMP, OXA	4	-	1	-
Total	32	3	6	3

* (-) Sensibilidade aos testes antimicrobianos

SCP = *Staphylococcus* spp. coagulase positivo, SCN = *Staphylococcus* spp. Coagulase negativa
PEN G= penicilina G, AMP= ampicilina, OXA= Oxacilina

Quadro 3. Concentração bactericida mínima dos EEB da *Commiphora leptophloeos* frente a isolados de *Staphylococcus* oriundos de mastite em ruminantes.

	EEB Folha	EEB Casca
N	60	60
Mediana	3125,00 ^a	781,20 ^b
Média	3214,64	1261,49
Desvio padrão	1441,25	941,82
Concentração Mínima	781,20	390,60
Concentração Máxima	6250,00	6250,00

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,001$).

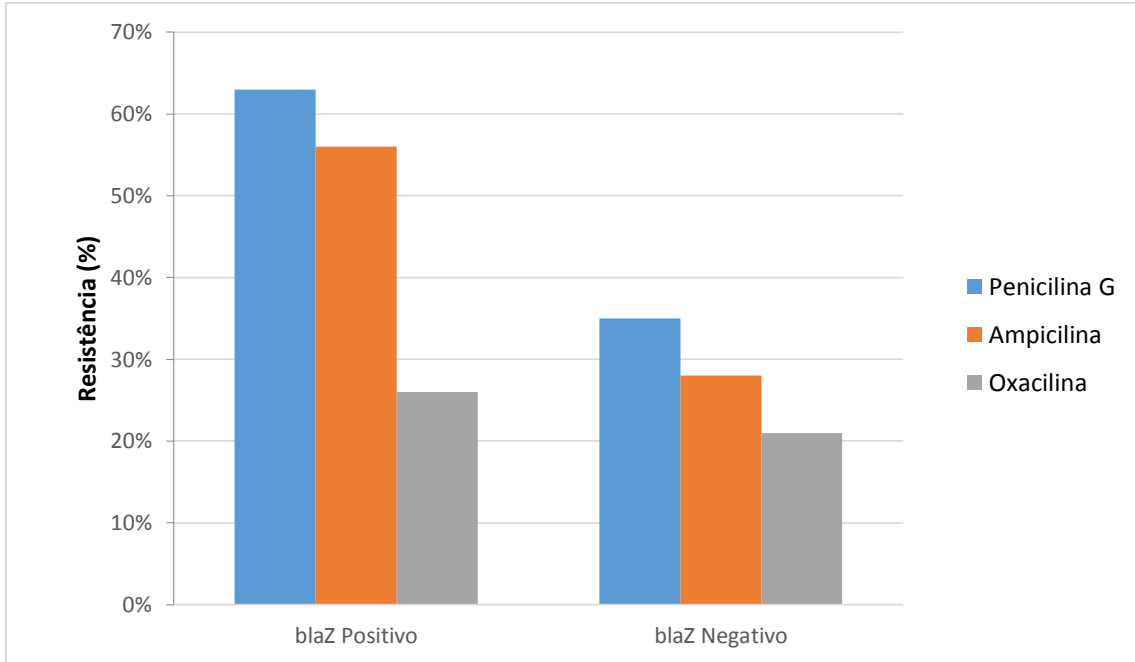


Figura 1

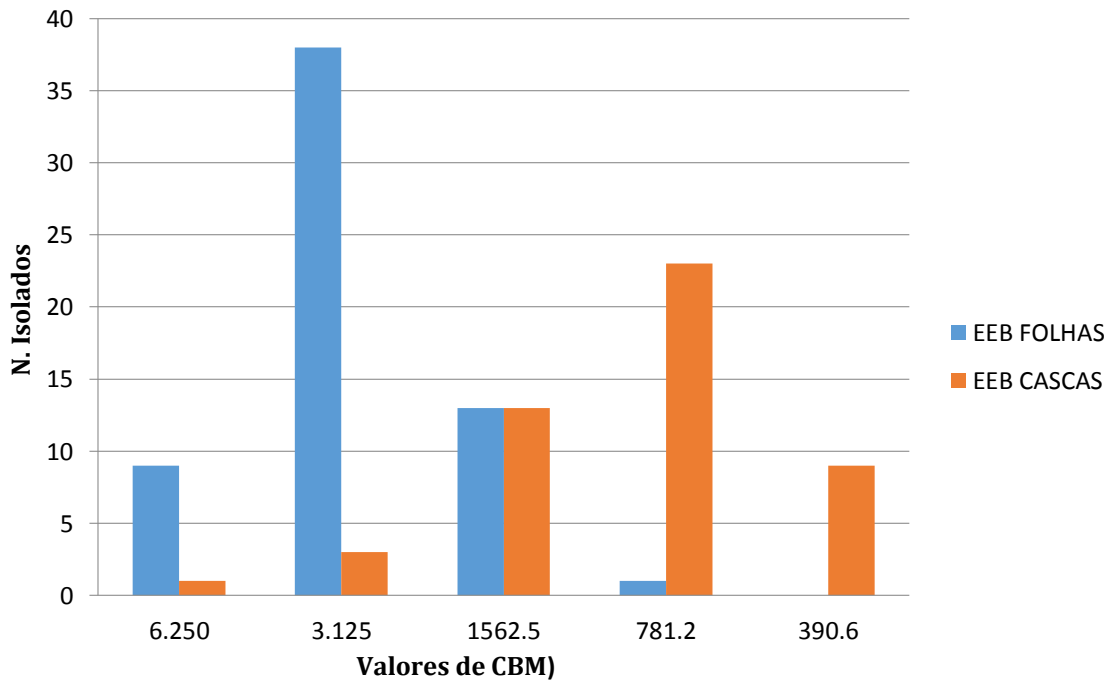


Figura 2

5 CONCLUSÃO

O extrato etanólico bruto (EEB) das cascas e folhas da *Commiphora leptophloeos* apresentaram atividade antimicrobiana sobre os isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de leite de ruminantes com mastite. Contudo melhor atividade foi observada para o extrato das cascas.

Os EEB das cascas e folhas da *Commiphora leptophloeos* mostraram-se capazes de interferir na formação do biofilme.

Não foi observada a capacidade dos extratos em interferir com o biofilme previamente estabelecido.

Desta forma é imprescindível o estudo da potencialidade desta planta contra os agentes causadores da mastite em ruminantes com objetivo de produzir elementos para sua aplicação no tratamento de animais enfermos, podendo ser uma alternativa ao uso de antimicrobiano convencional. Para isso são necessários estudos mais aprofundados do isolamento e identificação de substâncias bioativas que são responsáveis pela atividade antimicrobiana da *Commiphora leptophloeos*.

INTERFERENCIA DOS EEBS NA FORMAÇÃO DO BIOFILME POR ISOLADO										
	Bactéria	Biofilme	1/5 CBM	EEB Folhas	Controle NE	Formação	1/5 CBM	EEB casca	Controle NE	Formação
1	12AL	Forte	1.562,5	1,61	0,236	Forte	390,6	0,209	0,064	MO
2	13 AL	Forte	1.562,5	1,386	0,236	Forte	390,6	0,248	0,064	MO
3	20AL	Forte	1.562,5	1,434	0,236	Forte	390,6	0,207	0,064	MO
4	32AL	Forte	1.562,5	1,599	0,236	Forte	390,6	0,154	0,064	MO
5	34AL	Forte	1.562,5	0,567	0,236	MO	390,6	0,238	0,064	MO
6	1PE	Moderado	1.562,5	0,558	0,236	MO	390,6	0,238	0,064	MO
7	47AL	Forte	1.562,5	1,826	0,236	Forte	781,2	1,334	0,157	FO
8	91PE	Moderada	1.562,5	0,925	0,236	MO	390,6	0,112	0,064	FRACO
9	13C2	Moderada	1.562,5	0,276	0,236	Fraco	390,6	0,245	0,064	MO
10	74ME	Moderada	1.562,5	0,676	0,236	MO	390,6	0,128	0,064	Fraco
11	77MD	Moderada	1.562,5	0,535	0,236	MO	781,2	0,416	0,157	MO
12	15MD	Moderada	1.562,5	0,872	0,236	MO	781,2	0,151	0,157	NÃO
13	09	Moderado	1.562,5	0,493	0,236	MO	390,6	0,131	0,064	NÃO
14	104	Moderado	1.562,5	0,135	0,236	NÃO	781,2	0,071	0,157	NAO
15	96MD	Moderado	1.562,5	0,085	0,236	NÃO	1.562,5	0,081	0,143	NÃO
16	70AD	Forte	1.562,5	0,445	0,236	Fraco	781,2	0,464	0,157	MO
17	51PE	Moderado	1.562,5	0,878	0,236	MO	390,6	0,138	0,064	NAO
18	125PD	Moderado	1.562,5	0,458	0,236	Fraco	390,6	0,138	0,064	MO
19	24AD	Moderado	1.562,5	0,486	0,236	MO	781,2	0,957	0,157	FO
20	94AE	Forte	1.562,5	0,500	0,236	MO	390,6	0,114	0,064	Fraca
21	50PE	Moderado	1.562,5	0,867	0,236	MO	781,2	0,295	0,157	Fraca
22	264PD	Moderado	1.562,5	0,482	0,236	MO	781,2	0,457	0,157	MO
23	23AD	Forte	1.562,5	0,482	0,236	MO	390,6	0,112	0,064	Fraca
24	3PD	Forte	1.562,5	0,580	0,236	MO	781,2	0,33	0,157	NAO
25	4AD	Moderada	1.562,5	0,517	0,236	MO	390,6	0,179	0,064	MO
26	83PD	Moderado	1.562,5	0,358	0,236	Fraco	781,2	0,45	0,157	NAO
27	77AD	Moderado	1.562,5	0,485	0,236	MO	781,2	0,311	0,157	Fraca
28	1PD	Moderado	1.562,5	0,409	0,236	Fraco	781,2	0,176	0,157	Fraco
29	41AE	Moderado	1.562,5	0,408	0,236	Fraco	195,3	0,176	0,097	Fraca

30	92PE	Moderado	1.562,5	0,230	0,236	Não	781,2	0,506	0,157	MO
31	94AD	Forte	1.562,5	0,247	0,236	Fraco	390,6	0,082	0,064	Fraca
32	7AE	Forte	1.562,5	0,272	0,236	Fraco	390,6	0,139	0,064	MO
33	18AE	Moderado	1.562,5	0,256	0,236	Fraco	390,6	0,148	0,064	MO
34	18AD	Moderado	1.562,5	0,207	0,236	NÃO	390,6	0,110	0,064	Fraca
35	35AD	Forte	1.562,5	0,258	0,236	Fraco	195,3	0,138	0,097	Fraca
36	4PDB	Moderado	1.562,5	0,255	0,236	Fraco	781,2	0,238	0,157	Fraca
37	1AEB	Moderado	1.562,5	0,19	0,236	NÃO	781,2	0,153	0,157	NAO
38	48AL	Moderado	1.562,5	0,109	0,236	NÃO	781,2	0,123	0,157	NAO
39	81PE	Forte	781,2	0,210	0,117	Fraco	781,2	0,258	0,157	Fraco
40	97BA	Forte	781,2	0,217	0,117	Fraco	390,6	0,154	0,064	MO
41	20AD2	Forte	781,2	0,171	0,117	Fraco	390,6	0,188	0,064	MO
42	36AD	Moderado	781,2	0,152	0,117	Fraco	195,3	0,135	0,097	Fraco
43	53AD	Moderado	781,2	0,195	0,117	Fraco	195,3	0,119	0,097	Fraca
44	3AE	Moderado	781,2	0,177	0,117	Fraco	195,3	0,167	0,097	Fraca
45	7PD	Forte	781,2	0,162	0,117	Fraco	781,2	0,132	0,157	NAO
46	2PD	Moderado	781,2	0,193	0,117	Fraco	390,6	0,131	0,064	MO
47	81AE	Forte	781,2	0,165	0,117	Fraco	390,6	0,143	0,064	MO
48	29PE	Forte	781,2	0,13	0,117	Não	390,6	0,115	0,064	Fraco
49	55AD	Moderado	781,2	0,155	0,117	Fraco	195,3	0,175	0,097	Fraco
50	49PD	Moderado	781,2	0,138	0,117	Fraco	195,3	0,124	0,097	Fraco
51	4AL	Forte	3,125	0,386	0,233	Fraco	781,2	0,31	0,157	NÃO
52	14AL	Moderado	3,125	0,300	0,233	Fraco	1.562,5	0,286	0,143	Fraco
53	29AL	Forte	3,125	0,357	0,233	Fraco	1.562,5	0,328	0,143	MO
54	37AL	Forte	3,125	0,279	0,233	Fraco	871,2	0,269	0,157	Fraca
55	39AL	Moderado	3,125	0,368	0,233	Fraco	781,2	0,251	0,157	Fraca
56	101ME	Moderado	3,125	0,113	0,233	NÃO	781,2	0,251	0,157	MO
57	37AE	Forte	3,125	0,265	0,233	Fraco	781,2	0,165	0,157	Fraca
58	27AE	Forte	3,125	0,348	0,233	Fraco	781,2	0,434	0,157	MO
59	24AL	Moderado	3,125	0,403	0,233	Fraco	1.562,5	0,319	0,143	MO
60	86AD	Forte	390,6	0,700	0,485	Fraco	390,6	0,100	0,064	Fraco

MO- moderado / FO- Forte/ Não – Não produtor



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
 CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
 COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO SEMIÁRIDO
 Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543. Projeto de Irrigação Nilo Coelho, S/N, C1. CEP: 56300-990, Petrolina-PE
 Telefone: (87) 2101-4861. www.univasf.edu.br/~cpgcvs. E-mail: cienciasveterinarias@univasf.edu.br

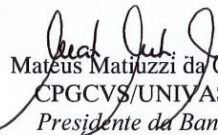
ATA SESSÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO


Defesa Nº 03

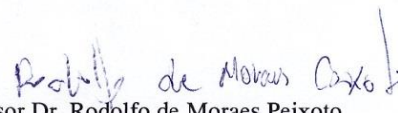
Ata da Sessão Pública, de exame de dissertação como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido, Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Aos vinte e oito dias do mês de julho de dois mil e quinze, às 14:00 horas, na sala de defesa do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias no Semiárido, *Campus* de Ciências Agrárias, desta Universidade, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias no Semiárido, composta pelos membros: Professor Dr. Mateus MatiuZZi da Costa (CPGCVS/UNIVASF) – Orientador e Presidente da Banca, Professora Dra. Tânia Maria Sarmiento da Silva (UFRPE) Examinadora Externa, Professor Dr. Rodolfo de Moraes Peixoto (IF Sertão Pernambuco) – Examinador Externo, com a finalidade de julgar a Dissertação da discente Isamara Ferreira da Silva, intitulada “**Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Commiphora leptophloeos* (Mat.) J. B. Gillett, frente a *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite em ruminantes**” para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de Defesa estabelecido pelo Presidente da Banca, Professor Dr. Mateus MatiuZZi da Costa a qual realizou a abertura e a posterior condução e encerramento da sessão solene de Defesa. Após analisarem o trabalho e arguirm o discente, os membros da Banca Examinadora deliberaram pela **APROVAÇÃO** do acadêmico, habilitando-o ao grau de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias, devendo o mesmo encaminhar, no prazo de 30 dias, a contar da Defesa, os exemplares da Dissertação definitiva para a obtenção do diploma do grau de Mestre e ainda assinar o Termo de Compromisso anexo. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente Ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Petrolina, 28 de julho de 2015


 Mateus MatiuZZi da Costa
 CPGCVS/UNIVASF
 Presidente da Banca


 Professora Dra. Tânia Maria Sarmiento da Silva
 UFRPE
 Examinadora Externa


 Professor Dr. Rodolfo de Moraes Peixoto
 IF Sertão Pernambuco
 Examinador Externo