

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Valdenice Félix da Silva

**MICROBIOTA CÉRVICO VAGINAL DE OVELHAS E SUA
SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E EXTRATOS DE
PLANTAS PERTENCENTES AO BIOMA CAATINGA**

Petrolina – PE

2010

VALDENICE FÉLIX DA SILVA

**MICROBIOTA CÉRVICO VAGINAL DE OVELHAS E SUA
SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E EXTRATOS DE
PLANTAS PERTENCENTES AO BIOMA CAATINGA**

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

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Petrolina – PE

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Valdenice Félix da Silva

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Orientador (UNIVASF)



Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

Prof^o Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida
Colegiado de Farmácia/UNIVASF

Petrolina, 27 de agosto de 2010.

Dedicatória

À minha família, especialmente minha mãe.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, em primeiro lugar por me dar saúde e disposição para realização de todos os meus objetivos.

À minha família, principalmente minha mãe que mesmo longe me apóia em tudo e reza por mim todos os dias.

Ao meu marido Charles e sua família , obrigada pelo apoio.

Ao meu orientador Mateus Matiuzzi da Costa, que mesmo sob críticas, me aceitou como sua orientada, me fez parte do grupo e apostou em minha capacidade, muito obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação ao meu trabalho.

A professora Adriana Mayumi Yano de Melo, que sempre esteve disposta a me ajudar durante todo o experimento.

A todos os meus amigos, que mesmo longe, estiveram torcendo por mim: Luiz Gustavo, Gabrielle, Patricia, Evandra, Cláudia e Adriana.

Aos amigos que adquiri ao entrar no laboratório, que sempre estiveram dispostos a me ajudar em que fosse preciso: Chirles, Rodolfo, Jarbas, Isabelle, Tácito, Samira, Luciana, Milka, Grace, Márcia, Renata, Welligton, Carina, Flávia e Ceíça. Em especial a Isabelle, Tácito, Chirles, Jarbas e Rodolfo que me ajudaram no desenvolvimento do experimento.

A todos os meus companheiros, servidores da UNIVASF, em especial a Fredson, Jarbas, Eugênio, Ana Paula, Alane, Neldson e Hideo. Assim como todos os funcionários do Campus de Ciências Agrárias.

A todos os colegas do mestrado em Ciência Animal, assim como todos os professores do curso.

Ao laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Univasf pela concessão dos materiais necessários para o desenvolvimento do trabalho.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas e Siglas	viii
Lista de Símbolos	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
Introdução	01
Capítulo 1 – Enfermidades do trato reprodutivo de ovinos: Etiologia, Diagnóstico e Terapêutica	03
Resumo.....	04
Abstract.....	05
1. Introdução.....	05
2. Doenças causadas por bactérias.....	06
2.1. Infecções específicas.....	06
2.2. Infecções inespecíficas.....	09
3. Enfermidades causadas por vírus.....	10
4. Enfermidades causadas por fungos.....	12
5. Enfermidades causadas por protozoários.....	13
6. Diagnóstico das enfermidades reprodutivas.....	15
7. Terapia convencional.....	16
8. Potencial da fitoterapia para tratamento de enfermidades do trato reprodutivo.....	17
9. Considerações finais.....	21
10. Referências bibliográficas.....	22
Capítulo 2 –Microbiota cérvico-vaginal de ovelhas mestiças de Petrolina – PE e sua susceptibilidade aos antibióticos....	32
Abstract.....	33
Resumo.....	34
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	37
Resultados.....	38
Discussão.....	40
Conclusões.....	43
Referências bibliográficas.....	43
Capítulo 3 – Potencial antibacteriano do extrato etanólico de plantas pertencentes à flora nordestina frente à Staphylococcus spp. isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas	51
Resumo.....	52
Abstract.....	53
1. Introdução.....	54

2. Material e Métodos.....	56
2.1 Coleta do material vegetal.....	56
2.2 Processamento do material vegetal.....	56
2.3 Obtenção do extrato etanólico bruto.....	57
2.4 Teste de susceptibilidade aos extratos.....	57
2.5 Análise estatística.....	58
3. Resultados.....	59
4. Discussão.....	64
5. Conclusões.....	67
6. Referências bibliográficas.....	68

Capítulo 4 – Potencial antibacteriano de plantas nativas do bioma caatinga frente a isolados bacterianos de mastite caprina e ovina.....

Resumo.....	73
Abstract.....	74
1. Introdução.....	74
2. Material e Métodos.....	75
2.1 Coleta do material botânico.....	77
2.2 Processamento do material vegetal.....	77
2.3 Obtenção do extrato etanólico bruto.....	77
2.4 Teste de sensibilidade aos extratos etanólicos.....	78
2.5 Análise estatística.....	78
3. Resultados.....	79
4. Discussão.....	82
5. Conclusão.....	84
6. Referências bibliográficas.....	84
Considerações finais.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BVD	Bovine Viral Diarrhoea (Diarreia Viral Bovina)
BVDV	Bovine Viral Diarrhoea vírus (Vírus da Diarreia Viral Bovina)
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
IRMA	Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos
h	Hora
IC	Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória)
L	Litro
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente)
mg	Miligrama
mL	Mililitro
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da Polimerase)
PGF _{2α}	Prostaglandina
PGFE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Eletroforese em gel em campo pulsado)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μL	Microlitro
x	Multiplicação
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Capítulo 2	
Tabela 1. Percentual de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas.....	67
Capítulo 3	
Tabela 1. Susceptibilidade de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados da mucosa cérvico vaginal de ovelhas frente aos extratos etanólicos de plantas, da flora nordestina, diluídos em água.....	68
Tabela 2. Susceptibilidade de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados da mucosaosa cérv vaginal de ovelhas frente aos extratos etanólicos de plantas, da fl nordestina, diluídos em alcóol.....	70
Capítulo 4	
Tabela 1. Concentração Bactericida Mínima dos extratos etanólicos de plantas do bioma caatinga diluídos em água frente a bactérias gram negativas obtidas da microbiota cérvico-vaginal de ovelhas.....	91
Tabela 2. Concentração Bactericida Mínima dos extratos etanólicos de plantas do bioma caatinga diluídos em alcóol frente a bactérias gram negativas obtidas da microbiota cérvico-vaginal de ovelhas.....	

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Capítulo 2	
Figura 1. Microrganismos isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas criadas em Petrolina e região.....	45
Capítulo 3	
Figura 1. Distribuição das concentrações bactericidas mínimas dos extratos de plantas do bioma caatinga, diluídos em água, sobre isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidos da mucosa genital de ovelhas.....	92
Figura 2. Distribuição das concentrações bactericidas mínimas dos extratos de plantas do bioma caatinga, diluídos em álcool sobre isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidos da mucosa genital de ovelhas.....	92

Resumo

Microrganismos que são comumente isolados do trato genital de ovelhas são patógenos facultativos, sendo sua patogenicidade expressa quando as fêmeas apresentam o sistema imunológico comprometido. O conhecimento da microbiota normal é importante para que possa ser comparada com resultados de cultivos oriundos de animais doentes. Dessa forma objetivou-se identificar os principais microrganismos constituintes da microbiota cérvico-vaginal de ovelhas e sua susceptibilidade aos antimicrobianos e extratos de plantas. Foram visitados rebanhos ovinos, coletando-se 60 amostras da mucosa cérvico-vaginal por meio de swabs. Foi realizado o isolamento e identificação bacteriana e teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos foram utilizadas as espécies: *Encholirium spectabile* Mart., *Bromelia laciniosa* Mart., *Neoglaziovia variegata* Mez., *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) A.C. Smith, *Hymenaea courbaril* L. e *Selaginella convoluta* Spring, sendo os extratos diluídos em água destilada e álcool. Foram obtidos 94 isolados, sendo *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* os principais microrganismos isolados. De modo geral os isolados foram sensíveis a maioria das drogas antimicrobianas testadas, principalmente a classe das tetraciclina e quinolonas. *Staphylococcus* spp. foram testados frente aos extratos de *Encholirium spectabile* Mart., *Bromelia laciniosa* Mart., *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) A.C. Smith e *Hymenaea courbaril* L. Quando diluídos em água, o maior percentual de inibição foi observado com *E. spectabile* e *H. courbaril*, respectivamente, 63,3 e 76,6% dos isolados. Enquanto que na diluição alcoólica a maior atividade inibitória foi propiciada pelos extratos de *H. courbaril* e *B. laciniosa*, que inibiram 50% dos isolados, à medida que os extratos de *E. spectabile* e *A. cearensis* inibiram 43,3 e 36,6% respectivamente. Os extratos etanólicos na diluição em álcool, frente às bactérias gram negativas, apresentaram melhor atividade bacteriana do que quando diluídos em água. Na diluição aquosa, as espécies *H. courbaril* e *A. cearensis* apresentaram maior atividade antibacteriana. Considerando os resultados encontrados neste estudo e ainda a disponibilidade das plantas testadas na região, o potencial de utilização *in vivo* desses extratos deve ser verificado em pesquisas posteriores, criando dessa forma subsídios para o desenvolvimento de produtos que possam ser utilizados no tratamento de enfermidades reprodutivas de ovelhas.

Palavras-chave: ovino, enfermidades reprodutivas, sensibilidade

Abstract

Microorganisms that are commonly isolated from the genital tract of sheep are facultative pathogens, and its pathogenicity expressed when females have compromised immune systems. Knowledge of the normal microbiota is important for it to be compared with results from cultures derived from diseased animals. Thus it was aimed to identify the main constituents of microorganisms cervical-vaginal flora of sheep and their susceptibility to antimicrobial drugs and plant extracts. Sheep flocks were visited, collecting 60 samples of cervical-vaginal mucosa by means of swabs. Was isolated and bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. To determine the antimicrobial activity of ethanol extracts were used species: *Encholirium spectabile* Mart., *Bromelia laciniosa* Mart., *Neoglaziovia variegata* Mez., *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) AC Smith, *Hymenaea courbaril* L. *Selaginella convoluta* Spring, and the extracts diluted in water and alcohol. We obtained 94 isolates, *Staphylococcus* spp. *Escherichia coli* and the main microorganisms isolated. In general the isolates were susceptible to most antimicrobial agents tested, especially the class of tetracyclines and quinolones. *Staphylococcus* spp. were tested against extracts *Encholirium spectabile* Mart., *Bromelia laciniosa* Mart., *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) *Acsmithia* and *Hymenaea courbaril* L. When diluted in water, the highest percentage of inhibition was observed with *E. spectabile* and *H. courbaril*, respectively, 63.3 and 76.6% of isolates. While the dilution alcoholic highest inhibitory activity was generated by the extracts of *H. courbaril* and *B. laciniosa*, which inhibited 50% of isolates, as the extracts of *E. spectabile* and *A. cearensis* inhibited 43.3 and 36.6% respectively. The ethanol extracts diluted in alcohol, compared to gram negative bacteria showed better activity than when diluted in water. In the dilution water, the species *H. courbaril* and *A. cearensis* showed higher antibacterial activity. Considering the results found in this study and also the availability of the tested plants in the region, the potential for in vivo use of such statements should be verified in future research, thus creating subsidies for the development of products that can be used in the treatment of reproductive diseases sheep.

Key words: ovine, reproductive disorders, sensitivity

Introdução

O interesse pela ovinocultura vem crescendo nos últimos anos no Brasil. O rebanho nacional é estimado em cerca de 16 milhões de cabeças, sendo grande parte desse quantitativo (58,55%) pertencente à região nordeste. O estado de Pernambuco possui aproximadamente 1,3 milhões de cabeças, sendo distribuídas principalmente na região do semiárido na cidade de Petrolina e região circunvizinha (IBGE, 2009).

Nesta região a ovinocultura tem sido intensificada em propriedades rurais a fim de diversificar culturas e gerar lucros, principalmente para pequenos criadores, sendo constituída principalmente de animais deslanados destinados a produção de carne e pele. Trata-se de uma atividade de grande importância econômico-social, particularmente na maioria das regiões de climas áridos e semiáridos, devido à elevada adaptabilidade dessa espécie às condições edafoclimáticas.

Na região nordeste, alguns fatores são limitantes para o desenvolvimento da criação de ovinos como a desorganização dos criadores, assistência técnica insuficiente e medidas de manejo inadequadas, principalmente o manejo nutricional e sanitário. Dentre as doenças que maiores prejuízos trazem à produtividade da ovinocultura estão as enfermidades que acometem o trato reprodutivo, com índices de perda econômica variando de 0,4 a 10,6% (Forar et al. 1995), tanto no descarte de matrizes como na redução do número de crias que seriam encaminhadas para o abate. Enfermidades do trato reprodutivo podem ser causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitos de patogenicidade conhecida, mas também por microrganismos constituintes da microbiota normal da região vaginal, que em condições de equilíbrio geralmente não são capazes de produzir doença.

Microrganismos que são comumente isolados de amostras oriundas do trato genital feminino são patógenos facultativos, tais como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., corinebactérias e coliformes (Paisley et al. 1986). A patogenicidade desses agentes é expressa quando os animais apresentam o sistema imunológico comprometido, em decorrência do estresse causado por fatores como nutrição deficiente, mudanças súbitas de temperatura, estágio reprodutivo da fêmea como final de gestação, pós-parto e transporte, demonstrando o caráter oportunista no desencadeamento de infecções.

Os tratamentos comumente utilizados nas infecções do trato genital constituem muitas vezes do uso indiscriminado de antibióticos com dosagens e aplicações inadequadas, que além de eliminarem a microbiota normal residente, favorece o desenvolvimento de cepas patogênicas resistentes. Isso tem sido preocupação constante da comunidade científica, devido aos pequenos avanços nas pesquisas referentes ao desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas e ainda pelas conseqüências que essa resistência pode causar à saúde humana e animal. Falhas na utilização de antibióticos, e

ainda preocupação com os resíduos teciduais deixados pelas drogas nos animais de produção alimentar incitam a necessidade do desenvolvimento de alternativas de tratamento, como a fitoterapia.

O Brasil possui uma diversificada flora, sendo grande o número de pesquisas a fim de se identificar compostos de plantas que possam ser utilizadas para tratamento de enfermidades que acometem variados sistemas orgânicos. A região do semiárido nordestino possui plantas nativas com potencial antibacteriano, sendo vantagens para utilização: a ausência de resíduos nos produtos, resistência inexistente, baixo custo e disponibilidade ao alcance dos criadores.

Dessa forma, é de fundamental importância o conhecimento de alguns microrganismos componentes da microbiota cérvico-vaginal de ovelhas que podem estar associados a enfermidades do trato reprodutivo de ovelhas que são criadas na região semiárida, especificamente na região de Petrolina-PE, bem como a determinação da sensibilidade desses agentes a drogas antimicrobianas. Além disso, é de grande valia estudos acerca de alternativas terapêuticas, sendo destacado o potencial antimicrobiano de extratos etanólicos de plantas pertencentes à flora do semiárido nordestino a fim de criar subsídios para sua utilização como tratamento.

CAPÍTULO 1

Enfermidades do trato reprodutivo de ovinos: Etiologia, Diagnóstico e Terapêutica

(A ser submetido, como artigo de revisão, à Arquivos do Instituto Biológico)

Enfermidades do Trato Reprodutivo de Fêmeas Ovinas: Etiologia, Epidemiologia, Diagnóstico e Terapêutica

Valdenice Félix da Silva¹, Mateus Matiuzzi da Costa¹

¹Universidade Federal do Vale do São Francisco, Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, Rodovia BR 407, 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Nilo Coelho, C1, Cep: 56300-000, Petrolina/PE. Email: valdenice.felix@univasf.edu.br

Resumo

A criação de pequenos ruminantes vem crescendo nos últimos anos no Brasil. O Nordeste possui grande parte dos rebanhos de ovinos e caprinos, e sua exploração tem sido intensificada nas propriedades rurais, para diversificar culturas e gerar lucros. Falhas no manejo sanitário são as principais causas de insucesso no setor. Dentre as diversas doenças que acometem caprinos e ovinos, as enfermidades do trato reprodutivo causam severos prejuízos à rentabilidade da criação por promover redução na fertilidade, descarte de matrizes, e diminuição do número de crias. Dessa forma, nesta revisão serão abordados aspectos relacionados à etiologia, epidemiologia, diagnóstico e terapêutica das principais doenças reprodutivas de ovinos.

Palavras chave: pequenos ruminantes, enfermidades reprodutivas.

Abstract

The creation of small ruminants has increased in recent years in Brazil. The Northeast has a large proportion of herds of sheep and goats, and their operations have been stepped up on farms in order to diversify crops and profits. Failures in sanitary management are the main causes of failure in the sector. Among the various diseases affecting goats and sheep, the reproductive tract diseases cause severe damage to the profitability of farming by promoting a reduction in fertility, dispose of arrays, and decreased number of offspring. Thus this review will address aspects related to etiology, epidemiology, diagnosis and therapy of major diseases of sheep breeding.

Key words: small ruminants, reproductive diseases

1. Introdução

A criação de pequenos ruminantes é uma atividade de grande importância econômico-social, particularmente na maioria dos países que possuem regiões de climas áridos e semiáridos. Nestas regiões, o segmento da sociedade que tradicionalmente está envolvido na produção de pequenos ruminantes é diverso, com distintos graus de escolaridade, idade, e multiplicidade de objetivos, como o tipo de exploração tradicional para subsistência e/ou complemento de renda, e a minoria que é compreendida por criações tecnificadas voltadas para o mercado de carne, leite, pele e genética (SIMPLICIO et al. 2004). O Nordeste possui aproximadamente 58,55% do rebanho ovino brasileiro, sendo este constituído principalmente por animais deslanados, destinados à produção de carne e pele (IBGE, 2009, RODRIGUES et al. 2009).

Um importante fator relacionado ao insucesso da produção de ovinos, que se reflete no rendimento econômico da propriedade está relacionado às perdas decorrentes de falhas no manejo sanitário do rebanho. A alta frequência de doenças nessas espécies é devida basicamente à falta de acesso a orientação técnica adequada e pela dificuldade de acesso a laboratórios que realizam o diagnóstico (OLIVEIRA et al. 2008).

Dentre as doenças que causam maiores prejuízos à produtividade em rebanhos estão as doenças do sistema reprodutor, com índices de perda econômica variando de 0,4 a 10,6% (FORAR et al. 1995). Na maioria das vezes, os problemas de ordem reprodutiva como abortamentos, natimortalidade e infertilidade são os únicos e expressivos sinais de doença no rebanho. A suspeita diagnóstica para qualquer doença reprodutiva recai na observação do desempenho de produtividade do rebanho, juntamente com as informações clínicas (AIELLO, 2001).

2. Enfermidades causadas por bactérias

2.1. Infecções específicas

Alguns fatores são predisponentes aos processos infecciosos bacterianos do sistema reprodutivo, como manejo pré-parto inadequado, distúrbios endócrinos e nutricionais, condições sanitárias precárias, fatores ambientais de estresse, infecções pós-parição, entre outros (BRUUN et al. 2002, MEJÍA; LACAU-MENGIDO, 2005).

Algumas doenças infecciosas se destacam por acometer o sistema reprodutivo dos ovinos. A brucelose é uma doença infecto-contagiosa considerada de grande importância devido ao seu potencial zoonótico. Em

caprinos e ovinos a enfermidade é causada pela *Brucella mellitensis*, exótica no Brasil, e *Brucella ovis* (FERREIRA et al. 2003), sendo transmitida para o ser humano por meio do contato direto ou consumo de produtos de origem animal. *Brucella* spp. causa aborto geralmente no terço final da gestação provocando placentite necrótica e morte fetal (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). RIZZO et al. (2009) observaram uma incidência de 1,96% de ovinos com histórico de distúrbios reprodutivos sororeativos a *B. ovis*, sendo que os quatro ovinos positivos pela prova de IDGA para pesquisa de anticorpos anti- *Brucella ovis* eram fêmeas e três delas com histórico de abortos e repetição de cio nos seis meses antecedentes ao estudo. PINHEIRO JÚNIOR et al. (2009a), pela técnica de imunodifusão em gel de ágar, confirmaram a presença de ovinos reatores para *B. ovis* em rebanhos do Estado de Alagoas, obtendo 3,1% (18/579) de amostras positivas distribuídas em dez propriedades e dez municípios. A ocorrência de soro-reagentes para *B. abortus* em caprinos e ovinos foi descrita pela primeira vez no Estado de Pernambuco por PINHEIRO JÚNIOR et al. (2008), sendo 2,5% (9/360) dos ovinos reagentes. O autor ainda destaca a importância dos achados para o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose, visto que na região do estudo é comum o consórcio de bovinos e pequenos ruminantes.

Os micoplasmas e ureaplasmas pertencentes à classe Mollicutes são causas de transtornos reprodutivos em ovinos, sendo relatados em diversos estudos (JONES et al. 1983). *Mycoplasma ovine/caprino* sorotipo 11 ainda não classificado como espécie, foi relacionado a casos de vulvovaginite e problemas reprodutivos em ovinos na Austrália, Estados Unidos, Inglaterra, Índia, França e Nigéria (NICHOLAS et al. 1999). OLIVEIRA (2008) por meio da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PGFE) isolou *Mycoplasma* spp. do trato reprodutivo de ovino, sendo que este apresentou 98% de similaridade para *Mycoplasma bovigenitalium* e *Mycoplasma* sorogrupo 11. *M. fermentans* foi isolado pela primeira vez em lesões vaginais de uma ovelha, entretanto, isolamentos posteriores ocorreram em swabs vaginais de fêmeas sadias (NICHOLAS et al. 1998). Ureaplasmas isolados de ovinos foram estudados por BALL et al. (1985), que associaram o sorotipo IX à infertilidade e aborto em fêmeas ovinas. OLIVEIRA (2008) verificando a prevalência de *Ureaplasma* spp. no sistema reprodutivo de ovinos verificou prevalência de 68% (17/25) nas amostras oriundas da mucosa vulvovaginal das fêmeas e 27% (3/11) em amostras de sêmen.

Aborto esporádico em ovelhas pode ser causado por *Campylobacter fetus* subespécie *fetus* ou por *C. jejuni* (QUINN et al., 2005), podendo *C. fetus fetus* ser encontrado também no trato intestinal. VARGAS et al. (2005) relataram pela primeira vez no Brasil o isolamento de *C. jejuni* em um feto de ovino abortado, sendo a identificação realizada por meio da análise bacteriológica e caracterização molecular pela PCR. Os autores evidenciaram ainda a importância desse microrganismo como causa de abortos em ovelhas, sendo necessária implantação de medidas de controle. SAHIN et al. (2008) estudando a distribuição de espécies de

Campylobacter spp. associados ao aborto ovino verificaram predominância de *C. jejuni* sendo a maioria dos isolados associados a este transtorno reprodutivo pertencentes a um mesmo clone genético.

Os ovinos são considerados menos susceptíveis à leptospirose, entretanto podem ocorrer surtos da doença causando abortamentos e morte de cordeiros (CICERONI et al., 2000). O sorovar *hardjo* é considerado o principal agente envolvido nestes transtornos, porém os sorovares *pomona*, *ballum*, *bratislava* e *grippotyphosa* também são descritos, porém em menor frequência (ELLIS, 1983). HERRMANN et al. (2004) verificaram a presença de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em 34,24% (466/1.360) dos soros ovinos testados em mesorregiões do Estado do Rio Grande do Sul, sendo o sorovar *hardjo* o mais prevalente. LILENBAUM et al. (2008) verificaram a presença dos sorovares *hardjo*, *shermani* e *grippotyphosa* em amostras de fluidos vaginais e de sêmen de ovinos, destacando o potencial de transmissão venérea da enfermidade nessa espécie.

Salmonella abortusovis é uma enterobactéria considerada como um microrganismo específico de ovinos, entretanto tem sido ocasionalmente isolado em outras espécies. Infecções causadas por esse agente desencadeia quadros de aborto, principalmente em fêmeas recém introduzidas no rebanho (PARDON et al. 1990). HABRUN et al. (2006) identificaram, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) *S. abortusovis* como principal microrganismo envolvido em surtos de abortos em ovinos no sul da Croácia.

Abortos no final da prenhez na espécie ovina podem estar associados a bactérias da família *Chlamydiaceae*. A nova espécie *Chlamydophila abortus*, anteriormente classificada como *C. psittaci*, é frequentemente associada a distúrbios reprodutivos em ovinos, caprinos, bovinos e esporadicamente em suínos e equinos (EVERETT, 2000). PEREIRA et al. (2009) estudando os fatores de risco para *C. abortus* em ovinos e caprinos no estado de Pernambuco verificaram que a frequência de animais soro-reagentes para *Chlamydophila sp.* foi de 10,3% (30/290 animais), sendo 12,0% (20/167) para caprinos e 8,1% (10/123) para ovinos.

2.2. Infecções inespecíficas

Entre os agentes infecciosos relacionados às infecções uterinas, incluem-se microrganismos considerados oportunistas como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Bacillus* spp e *Proteus* spp. que produzem infecções isoladas ou mistas (DOHMEN et al. 1995, SILVA; LOBATO,

1999). Estes microrganismos são responsáveis por endometrites puerperais agudas, septicemia, e geralmente causam aborto esporádico sendo a via hematogena a principal rota de infecção (CORBELLINI et al. 2006). A vaginite é considerada uma infecção comum do sistema genital da fêmea e pode ser ocasionada por microrganismos que atuam como invasores oportunistas (SUÁREZ et al. 2006). Segundo MAVROGIANNI et al. (2007) *Staphylococcus* spp. é o agente comumente isolado de vaginite em ovelhas, estando associado à secreção purulenta e grande quantidade de leucócitos na vagina. MARTINS et al. (2009) verificaram prevalência de 9,25% (2/22) de *S. aureus* em ovelhas com vaginite, entretanto 90,8% dos isolados foram constituídos de coliformes. Em uma avaliação microbiológica de um dispositivo vaginal para sincronização de cio em ovelhas, MARTINS et al. (2010) identificaram *Staphylococcus* spp., coliformes como *Klebsiella* spp., *E. coli*, e *Shigella* spp. como causa de vaginites decorrentes do uso do instrumento. A importância dos coliformes, principalmente *E. coli*, na etiologia das vaginites foram verificadas em diversas pesquisas, demonstrando o potencial oportunista desse agente (VASCONCELOS, 2009; SARGISON et al. 2007). SOKKAR et al. (1980) em um estudo sobre endometrite natural e experimental em ovelhas verificaram que *E. coli*, *Corynebacterium pyogenes* e *S. aureus* foram os principais microrganismos isolados, entretanto, quando inoculados em úteros de fêmeas sadias, estes agentes não foram capazes de causar lesões. TZORA et al. (2002) em uma pesquisa bacteriológica em conteúdo uterino, verificaram que as principais bactérias isoladas de ovelhas com retenção de placenta foram *Arcanobacterium pyogenes* e *E. coli*.

3. Enfermidades ocasionadas por vírus

Enfermidades virais que acometem o aparelho reprodutivo, quando disseminadas no rebanho resultam em perdas e transtornos econômicos (PINHEIRO et al. 2003).

A língua azul é uma doença infecciosa, causada por um orbivírus e transmitida por mosquitos Culicoides (PUGH, 2004). Ruminantes são susceptíveis ao vírus causador da língua azul e em geral a infecção ocorre de forma inaparente, com exceção dos ovinos que manifestam sinais evidentes, com diminuição na produção, mortalidade elevada (LOBATO, 1999) e abortamento de ocorrência sazonal (PUGH, 2004). Um estudo realizado na região de Araçatuba- SP avaliou um total de 1.002 amostras de soro ovino. Por meio da técnica de imunoenensaio enzimático de competição de fase sólida (ELISA CFS), 74,1% dos ovinos testados apresentaram

anticorpos para língua azul, enquanto que pela técnica de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDGA) foram observados 65% de amostras positivas. Isto indica que a alta frequência obtida nos estudos sorológicos, sem sinais clínicos da doença no campo, significa que a infecção dissemina-se pelos animais no país de forma silenciosa, sendo as condições climáticas facilitadoras da multiplicação e manutenção dos vetores, mantendo a endemicidade da enfermidade (NOGUEIRA, et al. 2009).

Pestivírus são capazes de infectar uma grande variedade de espécies animais e inclui enfermidades como Diarréia Viral Bovina e vírus da doença das fronteiras. Os ovinos são susceptíveis à infecção natural e experimental com o BVD (LOKEN, 1995). Inoculação experimental de ovelhas prenhes resulta em transmissão do vírus ao feto, podendo resultar em mortalidade embrionária ou fetal, abortos, mumificações, malformações e natimortalidade (SCHERER et al. 2001). JULIÁ et al. (2009) verificaram uma prevalência de 46,6% (25/54) de amostras soropositivas para BVDV-1 e 13%(7/54) para BVDV-2 em ovelhas saudáveis criadas na Argentina, sendo ainda algumas amostras confirmadas por meio de PCR. OGUZOGU et al. (2009) relataram pela primeira vez a ocorrência e parcial caracterização da infecção do vírus da doença das fronteiras em ovinos na Turquia. Por meio da análise filogenética verificou-se que o vírus formou um grupo separado dos conhecidos BDV-1 e BDV-6, sugerindo a representação de um novo subgrupo.

Os herpesvírus são caracterizados por permanecerem em estado de latência, podendo ser reativados quando os animais são expostos a fatores estressantes que diminuem sua imunidade, sendo excretado e transmitido a outros animais susceptíveis (JONES et al. 2003). ALMEIDA et al. (2008), demonstraram que ovelhas são susceptíveis à infecção experimental pelo herpesvírus bovino tipo 2 e desenvolvem lesões semelhantes às observadas em casos naturais. O herpesvirus caprino, conhecido como herpesvirus bovino tipo 6 pode causar surtos de abortos em cabras, onde os fetos abortados apresentam microscopicamente focos de necrose no fígado, pulmão e no baço (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

4. Enfermidades causadas por fungos

O papel dos fungos no desenvolvimento de doenças reprodutivas não está totalmente elucidado. Em consequência, antifúngicos são usados de forma errônea eliminando microrganismos que são naturalmente encontrados no ambiente vaginal, desencadeando a proliferação de fungos patogênicos (PUGH, 2004) Abortos

causados por *Aspergillus* spp. e *Candida* spp. já foram descritos em bovinos e bubalinos (PUGH, 2004) sendo dados referentes a ovinos limitados.

A. fumigatus é o fungo isolado com maior frequência em rebanhos com distúrbios reprodutivos, além de *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, e *Absidia corymbifera* (LACAZ et al. 1991). CORBELLINI et al. (2003), verificaram a prevalência de infecção micótica em fetos bovinos abortados de 3,4% , sendo o *A.fumigatus* o fungo isolado de quatro casos. Infecções micóticas foram diagnosticadas em 6,8% de 6.858 casos de abortos bovinos ocorridos durante um período de 9 anos, sendo o *Aspergillus* sp associado com aproximadamente 5%, tendo *A. fumigatus* uma frequência de 62% (KNUDTSON; KIRKBRIDE, 1992).

Aflatoxinas são metabólitos produzidos por *Aspergillus flavus* var. *parasiticus* associados a diferentes manifestações clínicas e variada toxicidade. Estas são encontradas comumente em alimentos fornecidos para animais de produção, se destacando grãos como milho, sorgo e amendoim (MILLER et al. 1981; MALLMANN et al. 1994). A espécie fúngica *Claviceps purpurea* produz alcalóides ergopeptídeos, sendo os principais a ergotamina e ergometrina, que se ingerido a níveis tóxicos provocam transtornos reprodutivos, como desenvolvimento deficiente das glândulas mamárias, partos prematuros, mortalidade neonatal e ainda exerce efeito semelhante à ocitocina em úteros prenhes (QUINN, 2005).

O gênero *Candida* é composto por leveduras que vivem como comensais na microbiota de seres humanos e animais. Geralmente não causam danos aos seus hospedeiros, todavia quando no desequilíbrio das proteções física, química e imunológica, podem se tornar patogênicos desencadeando enfermidades (GARCIA et al. 2007). Infecções por *Candida* spp. em medicina veterinária são pouco frequentes, entretanto, nos últimos anos tem sido observado um aumento no número de relatos, acometendo várias espécies animais (DUARTE et al. 2001; PRESSLER et al. 2003; LINEK, 2004; MORETTI et al. 2004; FULLERINGER et al. 2006). [YENISEHIRLI](#) et al. (2010) demonstraram que a atividade de proteinase, fosfolipase e atividade hemolítica de *C. albicans* podem desempenhar um papel importante para as infecções, no entanto o papel genético destes fatores devem ser avaliados em outros estudos.

5. Enfermidades causadas por protozoários

Enfermidades causadas por protozoários têm distribuição mundial e podem estar associadas a manifestações como aborto, nascimentos prematuros e morte fetal nas espécies domésticas (PESCADOR et al. 2007).

Neospora caninum é um parasita intracelular obrigatório, sendo frequentemente diagnosticado como causa de aborto em diversas espécies animais (DUBEY et al. 2003). A soroprevalência de *N. caninum* em ovelhas foi observada por HOWE et al. (2008), que verificaram 26% (10/38) amostras positivas, sendo demonstrado o potencial de infecção do parasito por via genital e ingestão de oocistos (DUBEY; LINDSAY,1990). Com o objetivo de se avaliar a frequência de soropositivos para *Neospora caninum* em rebanhos caprinos leiteiros no estado de São Paulo, e ainda verificar possíveis associações com idade, sexo, distúrbios reprodutivos e presença de cães nos capris, MODOLO et al. (2008) encontraram uma frequência de 19,77% de animais positivos para *N. caninum* não sendo verificadas diferenças significativas quanto às variáveis avaliadas, exceto pela presença dos cães ser associada a um maior percentual de animais soropositivos. Anticorpos contra o agente foram detectados por meio da técnica de ELISA em rebanhos do Rio Grande do Sul, obtendo percentual de 3,2%(2/62) nos ovinos (VOGEL et al. 2006). FARIA et al. (2010) estudando os fatores de risco associados à neosporose ovina, verificaram uma alta frequência de rebanhos soropositivos no Estado de Alagoas, indicando que a infecção é generalizada. Os autores ainda ressaltam a importância de medidas sanitárias preventivas para o controle da doença.

A toxoplasmose, zoonose cosmopolita causada pelo *Toxoplasma gondii*, acomete diversas espécies domésticas. Infecções durante a prenhez podem ocasionar transtornos reprodutivos em ruminantes. Estudos sorológicos vêm demonstrando a prevalência da enfermidade em rebanhos brasileiros (MOTTA et al. 2008; LIMA et al. 2008; COSTA et al. 2001). Soros de caprinos e ovinos de propriedades localizadas em Pernambuco foram testados para detecção de anticorpos anti- *T. gondii*. De 173 soros ovinos, 35,3% foram positivos, enquanto 40,4% dos 213 soros caprinos apresentaram anticorpos. Em ambas as espécies houve associações significativas entre sexo e raça (SILVA et al. 2003). Em uma infecção experimental, quarenta e uma ovelhas foram inseminadas com sêmen contaminado com *T. gondii*. Por meio da técnica de PCR, foi demonstrado que 93,3% das fêmeas do estudo apresentaram resultados positivos para o agente, além disso, a ultrassonografia revelou que as ovelhas infectadas apresentaram reabsorção embrionária. O estudo evidencia ainda a

importância da inseminação artificial como forma de disseminação da doença, quando realizada com sêmen fresco contaminado (MORAES et al. 2010). PINHEIRO- JÚNIOR et al. (2009b) avaliando a prevalência e fatores de risco associados à infecção por *T.gondii* em ovinos no Estado de Alagoas, verificaram uma taxa de prevalência de 32,9% e uma associação significativa entre idade dos animais, tamanho da propriedade, sistema de criação, fonte de água e presença de gatos, concluindo que os ovinos do estado estão expostos à infecção e medidas profiláticas devem ser tomadas.

6. Diagnóstico das enfermidades reprodutivas

A anamnese é componente essencial na avaliação diagnóstica de enfermidades reprodutivas, principalmente em cabras e ovelhas, em decorrência da inacessibilidade da maior parte do trato reprodutor à palpação ou à inspeção (PUGH, 2004).

Os métodos de diagnósticos laboratoriais incluem exame microbiológico, citológico e histopatológico, cultivo em células e utilização de técnicas moleculares. As amostras a serem colhidas para o diagnóstico de enfermidades reprodutivas podem ser obtidas por meio de coleta de amostras de muco cérvico-vaginal, lesões de fetos abortados, líquidos fetais, placenta, conteúdo de vesículas, mucosas, conteúdo abomasal (AIELLO, 2001) Diagnósticos referentes à etiologia bacteriana podem ser realizados por meio de características culturais e bioquímicas, exames de esfregaços corados, detecção por métodos imunológicos (coloração com anticorpos fluorescentes, ELISA), fagotipagem e técnicas moleculares (QUINN, 2005). Os vírus podem ser identificados por meio de imunofluorescência e imuno-histoquímica, teste de fixação do complemento e hemaglutinação. Amostras de sangue podem ser submetidas a testes sorológicos como soroneutralização viral, imunodifusão em gel de ágar e ELISA (QUINN, 2005). Atualmente, a técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR) está sendo universalmente adotada no diagnóstico de diversas viroses, apresentando como principais vantagens a não exigência da viabilidade da partícula viral, alta sensibilidade e especificidade, além da rapidez na obtenção dos resultados (TAKIUCHI et al. 2001). Infecções por protozoários podem ser evidenciadas pela presença do parasito principalmente em amostras de cérebro e medula, por técnicas de imuno-histoquímica ou PCR. Pode ser realizado o isolamento por cultivo celular e exames sorológicos por testes de imunofluorescência indireta, teste de aglutinação e ELISA.

A suspeita clínica é importante para determinar o tipo de material clínico a ser coletado, sendo o sucesso do diagnóstico laboratorial dependente da escolha correta, forma de acondicionamento e conservação da amostra clínica, instruções que geralmente são disponibilizadas em manuais de procedimentos (DEL FAVA, 2007).

7. Terapia convencional

Doenças infecto-contagiosas específicas de ovinos não possuem uma conduta terapêutica instituída, tendo principalmente estabelecidas medidas voltadas para o controle e prevenção. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Plano Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO), que prevê ações para prevenir, controlar ou erradicar doenças que comprometam o rebanho caprino e ovino nacional (MAPA, 2010). O controle e profilaxia de algumas enfermidades constituem do uso de vacinas e mudanças no sistema de manejo (QUINN et al. 2005).

Nos animais de produção, a conduta terapêutica de enfermidades como infecções decorrentes de retenção de placenta, metrites e endometrites compreende geralmente a utilização de agentes farmacológicos e correção de problemas de manejo (SILVA et al. 1999). Nas últimas décadas, apesar das pesquisas referentes à descoberta de novos antibióticos serem crescentes, a resistência dos microrganismos também aumentou. Em geral, os microrganismos possuem a capacidade genética de obter e transmitir a outros indivíduos resistência às drogas que são utilizadas em tratamentos (NASCIMENTO et al. 2000). Coliformes constituem um grupo de bactérias que apresentam um padrão altamente variável de susceptibilidade aos antimicrobianos, o que pode comprometer a eficácia da terapia antimicrobiana inicialmente instituída (SUÁREZ et al. 2006). Testes *in vitro* de susceptibilidade a antibióticos realizados regularmente são importantes para o estudo e monitoramento da resistência da droga ao longo do tempo. Vários artigos descrevem a prevalência e desenvolvimento da resistência aos antibióticos em bovinos de agentes associados a enfermidades reprodutivas ao longo do tempo (ERSKINE et al. 2002; MAKOVEC; RUEGG, 2003), enquanto informações semelhantes de ovinos são limitadas. As freqüências de agentes etiológicos que afetam o aparelho reprodutivo são variáveis, assim como sua interação com os antimicrobianos, sendo de grande importância a correlação periódica de dados clínicos e microbiológicos a fim de direcionar o tratamento adequado (MARTINEZ et al. 1996).

Alternativas não-antibióticas, como utilização de agentes hormonais tais como ocitocina, $PGF_{2\alpha}$ podem ser úteis no tratamento de enfermidades do trato reprodutivo. Estes hormônios permitem a contratilidade do aparelho genital, assim como o efeito positivo nas defesas locais celulares e humorais. Desinfetantes à base de agentes como lugol, clorexidine e peróxido de hidrogênio também são comumente utilizados em infecções uterinas (AIELLO, 2001). Segundo LEWIS et al. (2004) a progesterona pode ser um fator predisponente para infecções uterinas, por produzir substâncias que inibem os mecanismos de defesa do útero. O autor ainda relata que a utilização de análogos da prostaglandina estimula diretamente a produção de $PGF_{2\alpha}$, assim como Leucotrieno B₄, responsável por funções leucocitárias. Em um estudo com animais em fase puerperal, FERNANDES et al. (2002) verificaram uma diminuição na prevalência de infecções uterinas em vacas que receberam aplicação de duas doses de cloprostenol na primeira semana pós-parto, demonstrando o efeito dessa substância no mecanismo de defesa uterino.

8. Possíveis aplicações da fitoterapia no tratamento de enfermidades do trato reprodutivo

Resultados insatisfatórios frente à antibioticoterapia, o aumento na preocupação com a resistência bacteriana e os resíduos teciduais deixados pelas drogas nos animais de produção indicam a necessidade de alternativas para o tratamento das enfermidades do trato reprodutivo (AIELLO, 2001).

A busca por tratamentos à base de fitoterápicos intensificou-se nas últimas décadas. O Brasil apresenta uma extensa e diversificada flora, sendo grande o número de pesquisadores que têm contribuído para a caracterização da química de produtos naturais de plantas. No entanto, nosso país não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (YUNES et al. 2001).

Atualmente, as vantagens que justificam a utilização dos fitoterápicos, são: o efeito sinérgico, ou seja, as plantas apresentam vários compostos com efeitos similares; associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes; menores riscos de efeitos colaterais, uma vez que os compostos ativos se apresentam em concentrações reduzidas nas plantas; e, menores custos de pesquisa (YUNES et al. 2001). Os compostos isolados de plantas são substâncias cuja estrutura química, com raras exceções, apresentam grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos derivados de microrganismos. Estes agentes

antimicrobianos isolados de plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese enzimática seja em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (SINGH; SHUKLA, 1984).

A Organização Mundial da Saúde considera fundamental que se realizem investigações experimentais acerca das plantas utilizadas para fins medicinais e de seus princípios ativos, para garantir sua eficácia e segurança terapêutica (SANTOS, 2004). A legislação brasileira para medicamentos fitoterápicos tem sofrido modificações. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elabora normas para a regulamentação destes medicamentos, tendo a Portaria nº 6 de 1995 estabelecido prazos para apresentação de dados de eficácia e segurança dos produtos pelas indústrias farmacêuticas, e a Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010, em vigor atualmente, dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Essa preocupação por parte das autoridades reguladoras para normatização dos fitoterápicos incita pesquisas visando à avaliação de fatores relacionados à segurança e eficácia do uso desses produtos. TUROLLA et al. (2006) avaliaram alguns fitoterápicos utilizados no Brasil (*Passiflora incarnata* L., *Ginkgo biloba* L., *Aesculus hippocastanum* L., *Plantago ovata* Forsk., *Panax ginseng* C. A Meyer, *Piper methysticum* G. Forst., *Valeriana officinalis* L., *Hypericum perforatum* L., *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. e *Rhamnus purshiana* D.C.) e relataram informações toxicológicas. Os autores concluíram que de maneira geral as dez plantas avaliadas apresentaram baixa toxicidade e não demonstraram atividade mutagênica ou teratogênica.

Em um levantamento de espécies de plantas medicinais que são utilizadas no Nordeste brasileiro realizado por AGRA et al. (2008), revelou-se um total de 650 espécies, sendo 407 gêneros pertencentes a 111 famílias. Os autores ainda descrevem que destes, 126 espécies são exóticas e cultivadas na região. Estudo semelhante foi realizado no norte do país, onde foram identificadas 63 espécies de plantas medicinais, distribuídas em 38 famílias, que são utilizadas pela população do estado de Rondônia (SANTOS et al. 2008).

O uso de plantas medicinais em medicina veterinária já foi descrito numa revisão realizada por VIEGI et al. (2003), em que foram identificadas 256 espécies que são utilizadas na terapêutica de enfermidades do sistema respiratório, diarreias, inflamações e feridas, sendo incluídas as espécies bovina, eqüina, ovina, suína, aves, cães e coelhos. O tratamento constitui principalmente da decocção de folhas, raízes, cascas e frutos para aplicação tópica ou como complementos alimentares (VIEGI et al. 2003).

A atividade antimicrobiana exercida por extratos de plantas é verificada por meio da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM), que se refere à menor quantidade da substância que inibe o crescimento do microrganismo testado, sendo um aspecto relevante a preocupação em relação a propriedades toxicológicas e legais pertinentes aos compostos naturais (PINTO et al. 2003). Variações inerentes à definição da CIM (Concentração Mínima Inibitória) de extratos de plantas podem ser causadas por fatores como: a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada, a origem e época de coleta da matéria prima e preparação do extrato (FENNEL et al. 2004).

Alguns trabalhos demonstram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de plantas encontradas na flora nordestina. Pode-se citar a *Amburana cearensis* (BRAVO et al. 1999), *Hymenaea courbaril*, (NOGUEIRA et al. 2001), *Borreria verticillata* (PEIXOTO-NETO et al. 2002; MAYNART et al. 1980), *Croton sonderianus* (MCCHESNEY, 1991), *Hyptis suaveolens* (IWU et al. 1990), *Maytenus rigida* (KLOUCEK et al. 2005), *Pithecellobium cochliacarpum* (ARAÚJO et al. 2002), *Plumbago scandens* (PAIVA et al. 2003), *Ximenia americana* (KONÉ et al. 2004; MAIGA et al, 2005; OMER; ELNINA, 2003), *Guazuma ulmifolia* (CACERES et al. 1993).

Amostras de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* foram testadas frente ao extrato de *Azadirachta indica* A. Juss (*meliaceae*), em diferentes diluições e intervalo de tempo de incubação. Verificou-se que todos os isolados de *S. aureus* foram sensíveis em concentrações de 1mg/ml em 8 horas, em contrapartida o extrato não inibiu o crescimento das bactérias gram negativas em nenhuma concentração mesmo após 24 horas de incubação (OKEMO, et al. 2001). VALENTIM, (2006) em um estudo fitoquímico e de atividade antimicrobiana da *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne (jatobá) verificou-se alta sensibilidade de *S. aureus*, enquanto as bactérias gram negativas obtiveram resultados insignificantes. O percentual do uso de plantas para fins preventivos é muito baixo comparado a outras utilizações, porém existem relatos do uso de partes aéreas de *Artemisia absinthium* na prevenção de transtornos digestivos em bezerros lactantes (GUARRERA et al. 1981 apud VIEGI et al. 2003). Estudos sobre a medicina natural utilizada em ruminantes revelaram espécies de plantas que são utilizadas na terapêutica de mastites, doenças oculares, retenção de placenta e artrite encefalite caprina. As plantas apresentaram alta eficácia no controle destas enfermidades, incluindo ainda, ação contra a dor e parasitoses (LANS et al. 2007).

Extratos etanólicos de substâncias como a própolis têm sido utilizadas no tratamento de diversas afecções no organismo. Ela se caracteriza com uma substância resinosa ou cerosa, que é coletada por abelhas melíferas de diferentes exsudatos vegetais. Sua aplicação se baseia em seu amplo espectro de atividade biológica como anti-inflamatório, antibacteriano, antifúngico e anti-oxidante (SFORCIN et al. 2000; MARCUCCI et al. 2001).

VARGAS et al. (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato alcoólico de própolis sobre as bactérias *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Nocardia asteróides*, *Rhodococcus equi*, *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* e verificaram que 67% das amostras testadas apresentaram inibição de crescimento, sendo que 92,6% dos isolados gram positivos e 42,5% gram negativos foram sensíveis aos extratos.

9. Considerações finais

As enfermidades reprodutivas causam grandes prejuízos à exploração das espécies domésticas. A etiologia dessas doenças é plurietiológica, podendo ser causada por agentes infecciosos ou não, sendo ainda de relevância os microrganismos de caráter oportunista, que tornam o diagnóstico mais difícil.

A terapia e profilaxia de infecções genitais nas espécies domésticas possuem um complicador associado ao uso indiscriminado e incorreto de drogas e falhas no manejo sanitário. Dessa forma, considerando o baixo custo e grande disponibilidade de matéria prima, tornam-se necessários estudos acerca da atividade *in vitro* de extratos de plantas, a fim de se produzir alternativas de tratamento e controle.

10. Referencias Bibliográficas

- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.3, p.472-508, 2008.
- AIELLO, S. E. (Ed.). *Manual Merck de Veterinária*. 8. ed. São Paulo: Roca, 2001. 1861 p.
- ALMEIDA, S.R.; DIEHL, D.G.; RISSI, D.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Caracterização clinicopatológica da mamite aguda em ovelhas lactantes infectadas experimentalmente com o herpesvírus bovino 2. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.1, p.87-94, 2008.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> Acesso em 15 de março de 2010.
- ARAÚJO, C.W.G.; PEIXOTO-NETO, P.A.S.; CAMPOS, N.V.C.; PORFÍRIO, Z.; CAETANO, L.C.; Antimicrobial activity of *Pithecolobium avaremotemo* Bark. *Fitoterapia*, v.73, n.7/8, p.698-700, 2002.
- BALL, H.J.; MCCAUGHEY, W.J.; KENNEDY, S.; McLOUGHLIN, M. Experimental intrauterine inoculation of pregnant ewes with ureaplasmas. *Veterinary Research Communications*, v.9, p.35-43, 1985.
- BRAVO, J.A.; SAUVAIN, M.; GIMENEZ, A.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LE MEN-OLIVER, L.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C.; Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry*, v.50, n.1, p.71-74, 1999
- BRUUN, J.; ERSBOLL, A.K.; ALBAN, L. Risk factors for metritis in Danish dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, v.54, p.179-190, 2002.
- CACERES, A.; FLETES, L.; AGUILAR, L.; RAMIREZ, O.; FIGUEROA, L.; TARACENA, A.M.; SAMAYOA, B. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. *Journal Ethnopharmacology* v.38, p.31-38, 1993.
- CICERONI, L.; LOMBARDO, D.; PINTO, A.; CIARROCCHI, S.; SIMEONI, J. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige-South Tyrol. *Journal Veterinary Medicine*, v.47, n.5, p.217-223, 2000.
- CORBELLINI, L.G.; PESCADOR, C.A.; FRANTZ, F.J.; LIMA, M.; FERREIRO, L.; DRIEMEIER, D. Aborto por *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* em bovinos no sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.23, n.2, p.82-86, 2003.
- CORBELLINI, L.G.; PESCADOR, C.A.; FRANTZ, F.J.; CARDOSO, M.; DRIEMEIER, D. *Staphylococcus* spp. abortion: skin lesions caused by *Staphylococcus aureus* infection in an aborted bovine-fetus. *Veterinary Research Communications*, v.30, p.717-721, 2006
- COSTA, G.H.N.; CABRAL, D.D.; VARANDAS, N.P.; SOBRAL, E.A.; BORGES, F.A.; CASTAGNOLLI, K.C. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 22, n.1, p.61-66, 2001.
- DEL FAVA, C.; PITUCO, E.M.; GENOVEZ, M.E. Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em bovinos: experiência do Instituto Biológico. *Biológico*, São Paulo, v.69, n.2, p.73-79, 2007.
- DOHMEN, M.J.W.; LOHUIS, J.A.C.M.; NAGY, P. The relationships between bacteriological and clinical findings in cows with subacute/chronic endometritis. *Theriogenology*, v.43, p.1379-1388, 1995.
- DUARTE, E.R.; RESENDE, J.C.; ROSA, C.A.; HAMDAN, J.S. Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Journal Veterinary Medicine, Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, v.48, p.631-635, 2001

- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.2, n.3, p.230–233, 1990.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal Parasitology*, v.41, n.1, p.1–16, 2003.
- ELLIS, W.A.; BRYSON, D.G.; NEILL, S.D.; HANNA, J. Possible involvement of leptospire in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. *Veterinary Record*, v.26, n.12, p.291-293, 1983.
- ERSKINE, R.J., WALKER, R.D, BOLIN, C.A, BARTLETT, P.C, WHITE, D.G . Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *Journal Dairy Science*, v.85, p.1111-1118, 2002.
- EVERETT, K.D.E. Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye. *Veterinary Microbiology*, v.75, p.109-126, 2000.
- FARIA, E.B.; CAVALCANTI, E.F.T.S.F.; MEDEIROS, E.S.; PINHEIRO-JÚNIOR, J.W.; AZEVEDO, S.S.; ATHAYDE, A.C.R.; MOTA, R.A. Risk Factors Associated with *Neospora caninum* seropositivity in sheep from the State of Alagoas, in the northeast region of Brazil. *Journal Parasitology*, v. 96, n.1, p.197–199, 2010.
- FENNEL, C.W.; LINDSEY, K.L.; MCGAW, L.J.; SPARG, S.G.; STAFFORD, G.I.;
- ELGORASHI, E.E.; GRACE, O.M.; VAN STADEN, J. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *Journal Ethnopharmacology* v.94, p.205-217, 2004.
- FERNANDES, C.A.C.; VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M. Efeito do cloprostenol sódico no pós-parto de vacas leiteiras e retorno á atividade reprodutiva. *Hora Veterinária*, n.126, p.13-17, 2002.
- FERREIRA, A.C.; CARDOSO, R.; TRAVASSOS DIAS, I.; MARIANO, I.; BELO, A.; ROLÃO PRETO, I.; MATEIGAS, A.; PINA FONSECA, A.; CORREA DE SA, M.I. Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Veterinary Research*, v. 34, p. 297-305, 2003.
- FORAR, A. L.; GAY, J. M.; HANCOCK, D. D. The frequency of endemic fetal loss in dairy cattle: a review. *Theriogenology*. v.43, p.989-1000, 1995.
- FULLERINGER, S.L.; SEGUIN, D.; WARIN, S.; BEZILLE, A.; DESTERQUE, C.; ARNÉ, P.; CHERMETTE, R.; BRETAGNE, S.; GUILLOT, J. Evolution of the environmental contamination by thermophilic fungi in a turkey confinement house in France. *Poultry Science*, v.85, p.1875-1880, 2006.
- GARCIA, M.E.; LANZAROT, P.; RODAS, V.L.; COSTAS, E; BLANCO, J.L. Fungal flora in the trachea of birds from a wildlife rehabilitation centre in Spain. *Veterinarni Medicina*, v.52, n.10, p.464-470, 2007.
- HABRUM, B.; LISTES, E.; SPICIC, S.; CVETNIC, Z.; LUKACEVIC, D.; JEMERSIC, L.; LOJKIC, M.; KOMPES, G. An Outbreak of Salmonella Abortusovis Abortions in Sheep in South Croatia. *Journal Veterinary Medicine*, v.53, p. 286–290, 2006.
- HERRMANN, G.P.; LAGE, A.P.; MOREIRA, E.C.; HADDAD, J.P.A.; RESENDE, J.R.; RODRIGUES, R.O.; LEITE, R.C. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v.34, n.2, 2004.
- HOWE, L.; WEST, D.M.; COLLETT, M.G.; TATTERSFIELD, G.; PATTISON, R.S.; POMROY, W.E.; KENYON, P.R.; MORRIS, S.T.; WILLIAMSON, N.B. The role of *Neospora caninum* in three cases of unexplained ewe abortions in the southern North Island of New Zealand. *Small Ruminant Research*, v.75, p.115–122, 2008.

- IWU, M.M.; EZEUGWU, C.O.; OKUNGI, C.O.; SANSON, D.R.; TEMPESTA, M.S.; Antimicrobial activity and terpenoids of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *International Journal Crude Drug Research*, v.28, n.1, p.73-76, 1990.
- JONES, G.E.; RAE, A.G.; HOLMES, R.G.; LISTER, S.A.; JONES, J.M.W.; GRATER, G.S.; RICHARDS, N. Isolation of exotic mycoplasmas from sheep in England. *Veterinary Record*. v.3, p.540, 1983.
- JONES, C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clinical Microbiology Review*, v.16, n.1, p.79-95, 2003.
- JULIÁ, S.; CRAIG, M.I.; JIMENEZ, L.S.; PINTO, G.B.; WEBWE, E.L. First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, v.90, p.274–277, 2009.
- KLOUCEK, P.; POLESNY, Z.; SVOBODOVA, B.; VLKOVA, E.; KOKOSKA, L.; Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. *Journal Ethnopharmacology*., v.99, n.2, p.309-312, 2005
- KNUDTSON, W.U.; KIRKBRIDE, C.A. Fungi associated with bovine abortion in the northern plains state (USA). *Journal Veterinay Diagnostic Investigation*, v.4, p.181-185, 1992.
- KONÉ, W.M.; ATINDEHOU, K.K.; TERAUX, C.; HOSTETTMANN, K.; TRAORÉ, D.; DOSSO, M. Traditional medicine in North Cote –d’Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal Ethnopharmacology*, v.93, p.43-49, 2004
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. *Micologia Veterinária*. 8ª edição. São Paulo: Sarvier p.469-482, 1991.
- LANS, C.; TURNER, N.; KHAN, T.; BRAUER, G.; BOEPPLE, W. Ethnoveterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*,v.26, p.3-11, 2007.
- LEWIS, G.S. Steroidal regulation of immune defenses. *Animal Reproduction Science*, v.82, p.281-294, 2004.
- LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDÃO, F.Z.; CORTEZ, A.; RICHTZENHAIN, L.J.; VASCONCELOS, S.A. Detection of *Leptospira* spp.in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology* v.69, p.837–842, 2008.
- LIMA, J.T.R.; AHID, S.M.M.; BARRÊTO-JUNIOR, R.A.; PENA, H.F.J.; DIAS, R.A.; GENNARI, S.M. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos caprinos do município de Mossoró, Rio Grande do Norte. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 45, n.2, p.81-86, 2008.
- LINEK, J. Mycotic endophthalmitis in a dog caused by *Candida albicans*. *Veterinary Ophthalmology*, v.7, p.159-162, 2004.
- LOBATO, Z. I. P. Língua azul: a doença nos bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, n. 4, p. 515-523, 1999.
- LOKEN, T. Border disease in sheep. *Veterinary Clinics of North America*, v.11, p.579 - 595, 1995.
- MAIGA, A.; DIALLO, D.; FANE, S.; SANOGO, R.; PAULSEN, B.S.; CISSE, B. A survey of toxic plants on the market in the district of Bamako, Mali: traditional knowledge compared with a literature search of modern pharmacology and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, v.96, p.183-193, 2005
- MAKOVEC, J.A.; RUEGG, P.L. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994–2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.222, n.11, p.1582-1589, 2003.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; WENTZ, L. Aflatoxinas- aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. *Ciência Rural*, v. 24, n. 3, p. 635-643, 1994.

MAPA. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em 26 de julho de 2010.

MARCUCCI, M.C.; DE CAMARGO, F.A.; LOPES, C.M.A. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacol Limerick*, v.74, n.2, p.105–112, 2001.

MARTINEZ, R.; GIRONI, R.H.A.R.; SANTOS, V.R.S. Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos usados na prática médica, Ribeirão Preto – SP. *Medicina*, Ribeirão Preto, v.29, p. 278-284, 1996.

MARTINS, G.; FIGUEIRA, L.; PENNA, B.; BRANDÃO, F.; VARGES, R.; VASCONCELOS, C.; LILENBAUM, W. Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progestin- impregnated intravaginal sponges. *Small Ruminant Research*, v.81, p.182-184, 2009.

MARTINS, L.T.; NETO, P.C.S.; NETO, S.G.; RAUBER, L.P.; BERTOLINI, M.; VIEIRA, A.D.; MEZZALIRA, A. Avaliação microbiológica e funcional de um dispositivo vaginal alternativo (OB[®]) para sincronização de cio em ovelhas. *Ciência Rural*, v.40, n.2, p.389-395, 2010.

MAVROGIANNI, V.S., AMIRIDIS, G.S., GOUGOULIS, D.A., FRAGKOU, I.A., FTHENAKIS, G.C. Efficacy of difloxacin for the control of postpartum uterine infections of ewes. *Journal of Veterinary Pharmacology Theriogenology*, v.30, p.583-5, 2007.

MAYNART, G.; POUSSSET, J.L.; MBOUP, S.; DENIS, F. Antibacterial effect of borreverine, an alkaloid isolated from *Borreria verticillata* (Rubiaceae). *Comptés Rendus des Seances de la Société de Biologie et de ses Filiales*, v.174, n.5, p.925-928, 1980

McCHESNEY, J.D.; CLARK, A.M.; SILVEIRA, A.R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*. *Journal of Natural Products*, v.54, n.6, p.1625-1633, 1991.

MEJÍA, M.E.; LACAU-MENGIDO, I.M. Endometritis treatment with PGF₂α analog does not improve reproductive performance in a large dairy herd in Argentina. *Theriogenology*, v.63, p.1266-1276, 2005.

MILLER, D.M.; STUART, B.P.; CROWELL, W.A. Experimental Aflatoxicosis in Swine: Morphological and Clinical Pathological Results. *Canadian Journal of Comparative Medicine* v.45, p.343-351, 1981.

MODOLO, J.R.; STACCHISSINI, A.V.M.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; LANGONI, H.; PADOVANI, C.R.; BARROZO, L.V.; LEITE, B.L.S. Freqüência de anticorpos anti *Neospora caninum* em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.12, p.597-600, 2008.

MORAES, E.P.B.X.; BATISTA, A.M.; FARIA, E.B.; FREIRE, R.L.; FREITAS, A.C.; SILVA, M.A.R.; BRAGA, V.A.; MOTA, R.A. Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated sêmen containing different doses of tachyzoites in sheep. *Veterinary Parasitology*, v.170, p.318–322, 2010.

MORETTI, A.; POSTERARO, B.; BONCIO, L.; MECHELLI, L.; DE GASPERIS, E.; AGNETTI, F.; RASPA, M. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v.21, p.139-142, 2004.

MOTTA, A.C.; VIEIRA, M.I.B.; BONDAN, C.; EDELWEISS, M.I.A.; DAMETTO, M.A.; GOMES, A. Aborto em ovinos associado à toxoplasmose: caracterização sorológica, anatomo-patológica e imunoistoquímica. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.17, Supl. 1, p. 204-208, 2008.

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

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. 2ª edição, Guanabara Koogan, 2003, 137p.

NICHOLAS, R.A.J.; GRIEG, A.; BAKER, S.; AYLING, R.D.; HETLANDER, M.; JOHANNSSON, K.E.; HOUSHAYMI, B.; MILES, R.J. Isolation of *Mycoplasma fermentans* from a sheep. *The Veterinary Record*, v.142, p. 220–221, 1998.

NICHOLAS, R.A., WESSELS, M.; ORME, P.K.; WOOD, E.; SACHSE, K. Isolation of *Mycoplasma ovine/caprine* serogroup 11 from infertile sheep in Britain. *The Veterinary Record*. 1999 v.145 n.15, p.434-435, 1999.

NOGUEIRA, R.T.; SHEPHERD, G.J.; LAVERDE JR., A.; MARSAIOLI, A.J.; IMAMURA, P.M. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *Phytochemistry*, v.58, p.1153–1157, 2001.

NOGUEIRA, A.H.C.; PITUCO, E.M.; STEFANO, E.; CUCI, V.C.L.M.; CARDOSO, T.C. Detecção de anticorpos contra o vírus da língua azul em ovinos na região de Araçatuba, São Paulo, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 4, p. 1271-1276, 2009.

OGUZOGLU, T.C.; TAN, M.T.; TOPLU, N.; DEMIR, A.B.; BILGE-DAGALP, S.; KARAOGLU, T.; OZKUL, A.; ALKAN, F.; BURGU, I.; HAAS, L.; GREISER-WILKE, I. Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: A new BDV subgroup?. *Veterinary Microbiology*, v.135, p.374–379, 2009.

OKEMO, P.O.; MWATHA, W.E.; CHHABRA, S.C.; FABRY, W. The kill kinetics of *Azadirachta indica* a. juss. (meliaceae) extracts on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *African Journal of Science and Technology (AJST) Science and Engineering Series*, v.2, n.2, p.113-118, 2001.

OLIVEIRA, E.L.; ALBUQUERQUE, F.H.M.A.R. Manejo sanitário de pequenos ruminantes. Sobral: *Embrapa Caprinos e Ovinos*, 2008, 27 p.

OLIVEIRA, R.C. *Isolamento de ureaplasma e micoplasma do trato reprodutivo de ovinos e caprinos e tipificação genotípica por meio da PFGE e seqüenciamento do gene 16S rRNA*. Tese doutorado. Universidade de São Paulo, 139p., 2008.

OMER, M.E.; ELNIMA, E.I. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. *Fitoterapia*, v.74, n.1/2, p.122-126, 2003.

PAIVA, S.R.; FIGUEIREDO, M.R.; ARAGÃO, T.V.; KAPLAN, M.A.; Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n.7, p.959-961, 2003.

PARDON, P., SANCHIS, R.; MARLY, J.; LANTIER, F.; GUILLOTEAU, L.; BUZONI-GATEL, D.; OSWALD, I.P.; PEPIN, M.; KAEFFER, B.; BERTHON, P.; POPOFF, M.Y. Experimental Ovine Salmonellosis (*Salmonella Abortusovis*). Pathogenesis and Vaccination. *Research in Microbiology*, v.141, p.945–953, 1990.

PEIXOTO-NETO, P.A.S.; SILVA, M.V.; CAMPOS, N.V.C.; PORFÍRIO, C.Z.; CAETANO, L.C. Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. *Fitoterapia*, v.73, n.6, p.529-531, 2002.

PEREIRA, M.F.; PEIXOTO, R.M.; PIATTI, R.M.; MEDEIROS, E.S.; MOTA, I.O.; AZEVEDO, S.S.; MOTA, R.A. Ocorrência e fatores de risco para *Chlamydophila abortus* em ovinos e caprinos no estado de Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29 n.1, p.33-40, 2009.

PESCADOR, C.A.; CORBELLINI, L.G.; OLIVEIRA, E.C.; BANDARRA, P.M.; LEAL, J.S.; PEDROSO, P.M.O.; DRIEMEIER, D. Aborto ovino associado com infecção por *Sarcocystis* sp. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, n.10, 2007.

PINHEIRO, R.R.; CHAGAS, A.C.S.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F.S.F.A. Víroses de pequenos ruminantes, Sobral, *Embrapa Caprinos*, 30p., 2003.

PINHEIRO-JÚNIOR, J.W.; SOUZA, M.M.A.; GUERRA, N.R.; SANTANA, V.L.A.; MOTA, R.A. Frequência de aglutininas anti- *Brucella abortus* em caprinos e ovinos do sertão do Estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v.9, n.4, p.1096-1101, 2008.

PINHEIRO-JÚNIOR, J.W.; OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, R.A.; AGOTTANI, J.V.; JESUS, E.M.; ASSIS, S.T.; OLIVEIRA, C.Z. Ocorrência de ovinos sororeatores para *Brucella ovis* no Estado de Alagoas. *Veterinária e Zootecnia*, v.16, n.3, p.500-508, 2009a.

PINHEIRO-JÚNIOR, J.W.; MOTA, R.A.; OLIVEIRA, A.A.F.; FARIA, E.B.; GONDIM, L.F.P.; SILVA, A.V.; ANDERLINI, G.A. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, *Brazilian Parasitology Research*, v. 105, p.709-715, 2009b.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003, 325 p.

PRESSLER, B.M.; VADEN, S.L.; LANE, I.F.; COWGILL, L.D.; DYE, J.A. *Candida* spp urinary tract infections in 13 dogs and seven cats: predisposing factors, treatment, and outcome. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.39, p.263-270, 2003.

PUGH, D.G. *Clínica de ovinos e caprinos*. São Paulo: Roca, 2004, 513p.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto alegre, Artmed, 2005, 512p.

RIZZO, H.; GREGORY, L.; PINHEIRO, E.S.; CARVALHO, A.F.; SANTANA, R.L.; SILVA, L.M.P. Incidência de *Brucella ovis* em ovinos com histórico de distúrbios reprodutivos no estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, Suplemento 1, Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009.

RODRIGUES, F.H.M.A.; OLIVEIRA, E.L.; ALVES, F.S.F. *Desafios sanitários e de manejo na ovinocultura*, 2009. Disponível em:

<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewFile/8527/5991>. Acesso em 02 mar.2010

SAHIN, O.; PLUMMER, P.J.; JORDAN, D.M.; SULAJ, K.; PEREIRA, S.; AUSTERMAN, S.R.; WANG, L.; YAEGER, M.J.; HOFFMAN, L.J.; ZHANG, Q. Emergence of a Tetracycline-Resistant *Campylobacter jejuni* Clone Associated with Outbreaks of Ovine Abortion in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, p.1663–1671, 2008.

SANTOS, M.R.A.; INNECCO, R. Adubação orgânica e altura de corte da erva-cidreira brasileira. *Horticultura Brasileira*, v.22, p.182-185, 2004.

SANTOS, M.R.A.; LIMA, M.R.; FERREIRA, M.G.R. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. *Horticultura Brasileira*, v.26, p.244-250, 2008.

SARGISON, N.D.; HOWIE, F.; MEARNES, R.; PENNY, C.D.; FOSTER, G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* as a perennial cause of abortion in a closed flock of Suffolk ewes. *Veterinary Record*, v.160, p.875-6, 2007.

- SCHERER, C.F.C.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; CARON, L.; IRIGOVEN, L.F.; NEVES, J.P.; MACIEL, M.N. Experimental infection of pregnant sheep with bovine viral diarrhoea type 2 (BVDV-2): effects on the pregnancy and fetus. *Veterinary Microbiology*, v.79, p.285-299, 2001.
- SFORCIN, J.M.; FERNANDES, A.; LOPES, C.A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R. Seasonal effect of Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v.73, n.1-2, p.243-249, 2000.
- SILVA, N.; LOBATO, F.C.F. Isolation and antimicrobial susceptibility of bacteria recovered from uteri of dairy cows with postpartum endometritis. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.23, p.410-411, 1999.
- SILVA, N.; BRAGA, C.E.; COSTA, G.M.; LOBATO, F.C.F. Isolamento e teste de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias em infecções uterinas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n.3., 1999.
- SILVA, A.V.; CUNHA, E.L.P.; MEIRELES, L.R.; GOTTSCHALK, S.; MOTA, R.A.; LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência Rural*, v.33, n.1, p.115-119, 2003.
- SIMPLICIO, A.A.; WANDER, A.E.; LEITE, E.R.; LOPES, E.A.; A caprino-ovino cultura de corte como alternativa para a geração de emprego e renda. Sobral: *Embrapa Caprinos*, 2004, 44p.
- SINGH, K.V.; SHUKLA, N.P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. *Fitoterapia*, v.55, p.313-315, 1984.
- SOKKAR, S.M.; KUBBA, M.A.; AL-AUGAID, F. Studies on Natural and Experimental Endometritis in Ewes. *Veterinary Pathology*, v.17, p. 693-698, 1980.
- SUÁREZ, G.; ZUNINO, P.; CAROL, H.; UNGERFELD, R. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotics after treatment with intravaginal sponges in anestrus ewes. *Small Ruminant Research*, v.63, p.39-43, 2006.
- TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 22, n.2, p. 203-209, 2001.
- TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.42, n.2, 2006.
- TZORA, A.; LEONTIDES, L.S.; AMIRIDIS, G. S.; MANOS, G.; FTHENAKIS, G. C. Bacteriological and epidemiological findings during examination of the uterine content of ewes with retention of fetal membranes. *Theriogenology*, v.57, p. 1809-1817, 2002.
- VALENTIM, A.P.T. *Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne (jatobá)*. Dissertação de Mestrado em biotecnologia de produtos bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. 100p., 2006
- VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M., SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.1, p.159-163, 2004.
- VARGAS, A.C.; COSTA, M.M.; GROFF, A.C.M.; VIANA, L.R.; KREWER, C.C.; SPRICIGO, D.A.; KIRINU, J.K. Susceptibilidade de *Campylobacter foetus* subsp. *venerealis* isolado de bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.25, n.1, p.1-3, 2005.
- VASCONCELOS, C.O.P. *Estudo bacteriológico das vaginites e alterações na microbiota vaginal determinadas por implantes intravaginais em ovelhas*. 2009. 72f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Área de Clínica e Reprodução Animal). Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2009.

VIEGI, L.; PIERONI, A.; GUARRERA, P.M.; VANGELISTI, R. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *Journal of Ethnopharmacology*. v.89, p.221-44, 2003.

VOGEL, F.S.F.; ARENHART, S.; BAUERMANN, F.V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, v.36, n.6, 2006.

YENİŞEHİRLİ, G., BULUT, Y.; TUNÇOĞLU, E. Phospholipase, proteinase and hemolytic activities of *Candida albicans* isolates obtained from clinical specimens. *Mikrobiyol Bul.*,v.44, n.1, p.71-77, 2010.

YUNIS, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil, *Química Nova*, v.24, n.1, p.147-152, 2001.

CAPÍTULO 2

Microbiota cérvico-vaginal de ovelhas mestiças de Petrolina-PE e sua susceptibilidade aos antibióticos

(A ser submetido para a Revista Pesquisa Veterinária Brasileira)

Microbiota cérvico-vaginal de ovelhas mestiças de Petrolina- PE e sua susceptibilidade aos antibióticos¹

Silva V.F.²; Damasceno T.E.F.³; Souza N.J.D.⁴; Franco I.⁵; Costa M.M.^{6*}

ABSTRACT.- Silva V.F. ; Damasceno T.E.F.; Souza N.J.D.; Franco I.; Costa M.M. 2010. **[Cervical-vaginal microbiota of crossbred sheep in Petrolina-PE and its susceptibility to antibiotics.]** Microbiota cérvico-vaginal de ovelhas mestiças de Petrolina-PE e sua susceptibilidade aos antibióticos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Campus Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rod. BR 407, Km 12, Lote 543. Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n. Petrolina, PE 56300-990, Brazil. E-mail: mateus.costa@univasf.edu.br

Sheep farming has developed in recent decades, however there is still little information on the composition and pathogenic potential of cervical-vaginal flora of sheep. The purpose of the present study was to determine the main constituents of microorganisms cervical-vaginal flora of sheep and their antimicrobial susceptibility. Samples were taken in 60 healthy animals belonging to herds of Petrolina and region. Bacterial isolation was performed on blood agar and MacConkey agar, and the microorganisms identified according to morphological, gram staining and biochemical characteristics. The samples were subjected to disk diffusion test to determine the sensitivity to the following antimicrobial drugs: sulfamethazine, enrofloxacin, doxycycline, tetracycline, penicillin, amoxicillin, cephalothin and lincomycin. We obtained 94 isolates and found a higher frequency of *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* and *Micrococcus* spp., is also observed isolates of *Acinetobacter* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., and *Streptococcus* spp. The isolates were highly sensitive to the antibiotics tested was observed the lowest percentage of susceptibility to lincomycin.

INDEX TERMS: ovine, microbiota, antimicrobial sensitivity

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

²Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Campus Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rod. BR 407, Km 12, Lote 543. Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n. Petrolina, PE 56300-990, Brazil, valdenice.felix@hotmail.com

³ Campus Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rod. BR 407, Km 12, Lote 543. Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n. Petrolina, PE 56300-990, Brazil. *Autor para correspondência: mateus.costa@univasf.edu.br

Resumo.-A criação de ovinos tem se desenvolvido nas últimas décadas, entretanto ainda são escassas informações sobre a composição e potencial patogênico da microbiota cérvico-vaginal de ovelhas. O presente estudo teve como objetivo conhecer os principais microrganismos constituintes da microbiota cérvico-vaginal de ovelhas, bem como sua susceptibilidade aos antimicrobianos. Foram realizadas coletas em 60 animais sadios, pertencentes a rebanhos de Petrolina e região. Foi realizado o isolamento bacteriano em ágar sangue e ágar MacConkey, sendo os microrganismos identificados de acordo com características morfológicas, tintoriais e bioquímicas. As amostras foram submetidas ao teste de difusão em disco para determinar o perfil de sensibilidade aos seguintes antimicrobianos: sulfametazina, enrofloxacin, doxiciclina, tetraciclina, penicilina, amoxicilina, cefalotina e lincomicina. Foram obtidos 94 isolados, sendo constatada uma maior frequência de *Staphylococcus* spp. (32,97%), *Escherichia coli* e *Micrococcus* spp., sendo observado ainda, isolados de *Acinetobacter* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., e *Streptococcus* spp. Os isolados apresentaram alta sensibilidade aos antimicrobianos testados sendo observado o menor percentual de sensibilidade para lincomicina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: ovino, microbiota, sensibilidade antimicrobiana

INTRODUÇÃO

A ovinocultura vem crescendo nos últimos anos no Brasil, sendo em grande parte explorada na região nordeste do Brasil. O estado de Pernambuco possui cerca de 1,3 milhões de ovinos (IBGE 2009), concentrados principalmente na região do município de Petrolina. Nesta região, a criação de pequenos ruminantes se caracteriza como uma atividade intensificada nas propriedades rurais a fim de diversificar culturas, sendo constituída de animais deslanados destinados a produção de carne e pele, explorados de forma tradicional para subsistência e/ou complemento de renda (Simplicio et al. 2004). As principais causas da baixa eficiência reprodutiva em ovelhas são as infecções do trato reprodutivo causadas por bactérias, principalmente durante o período pós-parto, tendo como consequência perdas econômicas com o descarte de matrizes e redução do número de crias (Bouters & Vandesplasse 1977, Gregory & Rizzo 2009).

Sob condições normais, a microbiota vaginal apresenta composição e número variável de microrganismos, sendo estes também encontrados na pele e fezes, e devido suas propriedades invasivas, podem estar em pequeno número no útero de animais sadios (Ramaswamy et al. 1991). Os microrganismos habituais da vagina tornam-se patogênicos quando os animais apresentam o sistema imunológico comprometido, em decorrência do estresse causado por fatores variados tais como súbitas mudanças de temperatura, nutrição deficiente, final de gestação e parto, demonstrando seu caráter oportunista na origem de infecções (Verma et al. 1994, Lianjuan et al. 1995, Kuntze & Aurich 1995). Apesar das fêmeas possuírem barreiras físicas que impedem a colonização do trato genital por patógenos oportunistas, as mesmas podem se tornar susceptíveis aos microrganismos que passam pela cérvix e alcançam o útero (Rocha et al. 2004). Elliot et al. (1968) afirmaram que durante o período pós-parto ocorre a migração dos microrganismos presentes na vulva e vagina para a cérvix e útero. Parte das bactérias isoladas de conteúdo vaginal constitui-se de bastonetes gram negativos provenientes do trato gastrintestinal (TGI), especialmente *Escherichia coli* e cocos gram positivos como *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Ramaswamy et al. 1991, Sharda et al. 1991, Balassu et al. 1992, Campero et al. 1992, Arthur et al. 1996, Kunz et al. 2002).

A comunidade científica tem manifestado, nos últimos anos, preocupação em relação à resistência às drogas antimicrobianas, devido suas graves consequências, no tratamento de doenças. Várias publicações científicas relatam a relação entre os

antibióticos usados em animais e a seleção de cepas bacterianas resistentes e de importância na gênese de enfermidades nos seres humanos e nos animais (Piddock 1996, Witte 1998, Torres & Zarazaga 2002, Carneiro et al. 2007, Macedo et al. 2007).

Devido à presença de agentes com potencial oportunista no trato genital e ainda a carência de estudos científicos sobre a utilização de antimicrobianos relacionados às infecções genitais de ovelhas, é de fundamental importância o conhecimento da microbiota aeróbia parcial, bem como a determinação de sua susceptibilidade às drogas antimicrobianas, a fim de que a terapia correta e planejada seja estabelecida.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do experimento foram visitadas propriedades com rebanhos ovinos da região de Petrolina, Pernambuco. Os 60 animais utilizados se destinavam à produção de carne, sendo a amostragem constituída por fêmeas mestiças, sadias, não-prenhes, de diferentes idades e criadas em sistema extensivo e semi-extensivo.

Amostras da mucosa cérvico-vaginal foram obtidas a partir de *swabs* estéreis que após higiene da região vulvar foram introduzidos por meio de espéculo asséptico até o fundo de saco vaginal, realizaram-se movimentos de rotação visando obter maior quantidade de material. Após a coleta, os *swabs* foram acondicionados em tubos esterilizados contendo meio de transporte Stuart modificado e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco para processamento. Os *swabs* foram semeados em cada quadrante em placa contendo ágar - sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro e ágar MacConkey e incubados em estufa a 37 °C por 24 horas. Não se empregou metodologia para o isolamento de bactérias anaeróbias. As bactérias foram identificadas de acordo com características morfológicas, tintoriais e bioquímicas conforme descrito por Quinn et al.(1994).

A metodologia utilizada para verificar a sensibilidade dos agentes isolados aos antimicrobianos foi o método de difusão em disco Kirby-Bauer modificado (CLSI 2006). Os cultivos foram repassados para tubos de ensaio contendo caldo Müller-Hinton e incubados a 37° C até apresentar uma turbidez equivalente a 0,5 da escala padrão de Mac Farland. Com auxílio de um *swab*, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo ágar Müller Hinton. A etapa seguinte consistiu na aplicação dos discos, em que uma leve pressão permitiu o contato entre os mesmos e a superfície do meio inoculado. Os agentes antimicrobianos avaliados foram: penicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), sulfametazina (300 µg), doxiciclina (30 µg), amoxicilina (10 µg), enrofloxacina (5 µg), cefalotina (30 µg) e lincomicina (2 µg). As placas foram incubadas em estufa durante 24h a 37° C. Após a leitura dos halos foi determinado o perfil de sensibilidade dos isolados. Foi determinado o índice de resistência aos antimicrobianos dividindo o número de grupos de antimicrobianos aos quais os isolados foram resistentes pelo total de grupos de antimicrobianos testados (Krumperman 1983).

RESULTADOS

Das 60 amostras analisadas foram obtidos 94 isolados bacterianos. Foram observadas as seguintes freqüências de microrganismos: *Staphylococcus* spp. (32,97%), *Escherichia coli* (14,90%), *Micrococcus* spp. (12,76%), *Acinetobacter* spp. (10,64%), *Enterobacter* spp. (10,64%), *Klebsiella* spp. (9,58%), *Streptococcus* spp. (7,45%) e *Shigella* spp. (1,06%). No gênero *Staphylococcus* foram identificadas as seguintes espécies: *S. schleiferi* (63,3%), *S. epidermidis* (20%), *Staphylococcus* spp. (6,66%) e *S. saprophyticus*, *S. arlettae* e *S. lentus* respectivamente com 3,33%.

O perfil de sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos está demonstrado no quadro 1. O gênero *Staphylococcus* apresentou melhor sensibilidade à doxiciclina e a enrofloxacina com percentuais de 93,8% e 90,6% respectivamente. *Micrococcus* spp. demonstrou sensibilidade de 100% à doxiciclina obtendo menores percentuais à sulfametazina, penicilina e lincomicina. O gênero *Streptococcus* spp. mostrou-se altamente sensível à doxiciclina e tetraciclina (100%) e menores percentuais referentes à cefalotina, penicilina e lincomicina com valores de 42,9% e 0,0% respectivamente.

Escherichia coli apresentou maior sensibilidade à sulfametazina, enrofloxacina e doxiciclina (92,9%) e nenhuma sensibilidade à cefalotina, penicilina e lincomicina. Resultados semelhantes foram encontrados para o gênero *Enterobacter* spp., que se mostrou menos sensível às mesmas drogas, com melhor percentual para amoxicilina, tetraciclina (100%) e doxiciclina (90%). O gênero *Acinetobacter* spp. obteve percentual de 100% à doxiciclina, sendo a sensibilidade mais baixa relacionada à lincomicina (30%). De modo geral o gênero *Klebsiella* spp. apresentou alta sensibilidade à maioria dos antimicrobianos, obtendo menor percentual à penicilina e lincomicina (20%). O gênero *Shigella* spp. apresentou sensibilidade de 100% às drogas sulfametazina, enrofloxacina, amoxicilina e doxiciclina. Em média a maioria dos antimicrobianos testados apresentou um alto percentual de sensibilidade, tendo a penicilina e lincomicina alcançado os menores valores. O índice de resistência múltipla dos isolados variou de 0,15 a 0,5 entre os gêneros testados, sendo os índices obtidos respectivamente para isolados de *Staphylococcus* spp. e *Shigella* spp.

DISCUSSÃO

Os principais microrganismos isolados neste estudo foram *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*, o que corrobora com estudos semelhantes sobre o levantamento da microbiota presente na mucosa cérvico-vaginal de fêmeas domésticas (Rocha et al. 2004, Gomes 2006, Andrade 2006). Concorda ainda com outros autores que afirmam que em condições normais a composição e o número de agentes da microbiota são variáveis (Ramaswamy et al.1991, Sharda et al.1991, Balassu et al.1992, Campero et al.1992, Arthur et al. 1996, Kunz et al. 2002).

Microrganismos como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e coliformes são considerados habitantes da região vulvar, vagina, pele e trato gastrintestinal e possuem propriedades invasivas nos tecidos (Oliveira 1995). *Streptococcus* spp., quando associado a outros microrganismos, pode favorecer a proliferação de bactérias de maior patogenicidade, pois estes produzem penicilinase e protegem outras bactérias (Panangala et al. 1978, Kreplin 1990).

A predominância de *Staphylococcus* spp. deve-se possivelmente a este microrganismo ser originário da pele e mucosas, uma vez que são encontrados comumente em outros ruminantes (Rocha et al. 2004). Em um estudo da microbiota vaginal de vacas associadas a infecções uterinas, Gani et al. (2008) verificou a predominância do gênero *Staphylococcus* spp., corroborando com os dados descritos na literatura. Relatos semelhantes foram descritos em ovelhas por Moorthy & Singh (1982). Martins et al. (2009) verificaram a prevalência de *Staphylococcus* spp coagulase positiva na mucosa cérvico-vaginal de ovelhas. Entretanto, *S. epidermidis* foi isolado de seis animais, corroborando com os achados do presente estudo. O isolamento de *S. schleiferi* na mucosa genital já foi descrita em algumas espécies como em jabutis (Pessoa 2009), cães (Coggan et al. 2008) e em humanos (Campos et al. 2008), entretanto são escassos estudos referentes a este microrganismo no sistema genital de ovelhas. Bactérias do gênero *Micrococcus* são descritas como habitantes das mucosas de diversas espécies animais (Fornazari et al. 2007, Uchôa et al. 2009), sendo considerado de baixa patogenicidade (Wunder et al 1976). Um levantamento da microbiota vaginal de cabras verificou predominância de *Micrococcus* spp. em diferentes fases reprodutivas, sendo considerado componente da microbiota vaginal de cabras híidas (Gomes 2006).

Segundo Kuntze & Aurich (1995), as enterobactérias predominantes na mucosa da vulva e vagina são oriundas do trato gastrintestinal e podem causar processos infecciosos e deslocamento de células inflamatórias para os tecidos. No presente estudo, os principais gêneros de enterobactérias foram isolados, demonstrando a importância desses microrganismos na composição da microbiota genital de ovelhas e o risco de desenvolvimento de enfermidades reprodutivas, principalmente no pós-parto, quando a cérvix está relaxada, facilitando a invasão desses agentes oportunistas. Husted et al. (2003) em um levantamento de microbiota vaginal comparando vacas sadias e com vaginite, descreveu um percentual de 33% para *E. coli* e 20% para *Staphylococcus* spp.. Entretanto *Acinetobacter lwoffii* foi o microrganismo predominante em ambos os grupos, apresentando um percentual de 95%, enquanto que no presente estudo o percentual desse gênero foi 10,64%. A alta prevalência do microrganismo tanto em animais sadios como em enfermos o caracteriza como primário ou secundário da infecção, todavia são escassas informações sobre esse agente como constituinte da microbiota de ovelhas, sendo isolado nessa espécie principalmente em casos de mastite (Drescher et al. 2010, Domingues et al. 2006).

É de suma importância o conhecimento da microbiota dos animais sadios para que esta possa ser comparada com resultados de culturas obtidas de animais doentes. O presente estudo verificou a presença de microrganismos considerados de baixa patogenicidade, mas também agentes de caráter oportunista, que em situações de desequilíbrio podem desencadear doenças reprodutivas. O oportunismo dessas infecções é decorrente do manejo que é aplicado às fêmeas, principalmente o manejo alimentar no pós-parto, em que o animal se apresenta mais susceptível às doenças. Torres et al. (1997) observaram associação entre estresse e a ocorrência de infecções bacterianas no útero de vacas leiteiras, principalmente durante o período pós-parto. A microbiota normal residente protege o hospedeiro contra a colonização por essas bactérias potencialmente patogênicas. Esse antagonismo ocorre por meio da competição por nutrientes, produção de substâncias nocivas, alteração de pH e disponibilidade de oxigênio, reduzindo dessa forma a proliferação dos patógenos (Trabulsi 1999).

Em relação à sensibilidade aos antimicrobianos, observou-se alta sensibilidade dos isolados às drogas antimicrobianas utilizadas neste estudo. O menor percentual de sensibilidade foi encontrado para a lincomicina e penicilina.

Segundo Aiello (2001), a lincomicina possui um espectro limitado contra patógenos aeróbios, sendo os microrganismos gram negativos resistentes. O autor ainda ressalta que a resistência à lincomicina surge lentamente talvez como resultado de uma mutação cromossômica, podendo exibir resistência cruzada com outros antibióticos *in vitro*. *Streptococcus* spp. isolados de vacas com mastite foram resistentes à lincomicina (Faublée et al. 2002). Segundo os autores, o fenótipo comum envolvido na resistência em cocos gram positivos é o MLS_B, com resistência cruzada entre macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B, que ocorre devido à metilação do 23S do rRNA, resultando em diminuição da afinidade para drogas antimicrobianas destes grupos.

A baixa sensibilidade dos microrganismos frente à penicilina já foi demonstrada em inúmeros artigos científicos (Riedner et al. 1987, Fthenakis 1998, Freitas et al. 2005, Machado et al. 2008). A resistência aos β-lactâmicos, principalmente pelos gram positivos, pode ser oriunda tanto pela alteração das proteínas de ligação à droga quanto pela produção de β-lactamases (Lyon et al 1987, Livermore et al. 1995). Jacob et al. (2002) avaliando a susceptibilidade de bactérias isoladas de *swab* uterino e da fossa clitoriana de éguas, observou um percentual médio de sensibilidade à penicilina de 29,16% e 16,6% respectivamente. Neste mesmo estudo, as bactérias gram negativas foram totalmente resistentes a esta droga, sendo esses achados semelhantes aos descritos aqui. Apesar da pressão de seleção oriunda da utilização massiva da droga constantemente relatada na literatura, os gêneros gram positivos apresentaram um percentual de sensibilidade relativamente bom frente à penicilina, podendo este fármaco ser utilizado no tratamento de infecções causadas por esses agentes. Um estudo de dez anos realizado por Lollai et al. (2008) verificou que *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, *S.aureus*, *S. uberis* e *E.coli*, apresentaram sensibilidade a penicilina superior aos descritos na literatura, e ainda que estes patógenos causadores de mastite em ovinos são mais sensíveis aos antimicrobianos quando comparados aos de bovinos. Bactérias gram negativas apresentam resistência intrínseca à penicilina, principalmente as enterobactérias, que no presente estudo foram os microrganismos isolados em maior número, justificando dessa forma a baixa efetividade dessa droga.

Martins et al.; (2009) avaliando a susceptibilidade de bactérias isoladas da mucosa vaginal de ovelhas observaram que os coliformes apresentaram baixa

sensibilidade à amoxicilina, tetraciclina e cefalotina, não corroborando com os achados deste estudo, que verificou alta sensibilidade os isolados frente às mesmas drogas. O perfil de sensibilidade dos microrganismos frente aos antimicrobianos pode variar de acordo com a região em que o estudo foi realizado, visto que o presente experimento foi realizado no nordeste e aquele no sudeste do país onde as condições de produção de ovinos e a terapia de infecções podem ser distintas. Resultados semelhantes a este experimento foram encontrados por Gani et al. (2008), em que os antimicrobianos amoxicilina e sulfametazina obtiveram alta sensibilidade contra *Staphylococcus* spp. e coliformes.

Perante o número de drogas antimicrobianas testadas neste estudo, e cálculo de IRMA segundo Krumperman (1983), os gêneros de microrganismos não se apresentaram multirresistentes. Porém, um isolado de *Enterobacter* spp. apresentou um índice de 0,83. A multirresistência dos microrganismos é oriunda do uso inadequado das drogas antimicrobianas, apresentando um risco potencial para a saúde pública que pode dificultar o tratamento de doenças animais e de humanos, agravando quadros clínicos curáveis (Sena 2000).

De acordo os resultados de sensibilidade, as drogas testadas, de maneira geral, apresentam um alto potencial para utilização em tratamentos de enfermidades do trato genital. Entretanto, Andrade et al.(2005) verificaram maiores percentuais de susceptibilidade para a gentamicina e a neomicina para o tratamento de transtornos reprodutivos. Resultados de alguns estudos descrevem as tetraciclinas como eficientes na terapêutica de endometrites e metrites sendo a conduta mais utilizada a aplicação via parenteral (Pimentel 2001, Smith 1993, Smith et al. 1998). Vacas acometidas de metrite puerperal tóxica foram tratadas com penicilina, oxitetraciclina e ceftiofur, sendo os três tratamentos efetivos contra a enfermidade (Smith et al. 1998). A doxiciclina possui um amplo espectro de ação para microrganismos envolvidos em transtornos reprodutivos, principalmente infecções venéreas (Vicente et al. 2010), sendo confirmado pelo alto percentual de sensibilidade encontrado, caracterizando-a como a droga de escolha para o tratamento de infecções, inclusive causadas pelos agentes isolados neste estudo.

CONCLUSÕES

A microbiota da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas criadas na região de Petrolina-PE é constituída principalmente por microrganismos do gênero *Staphylococcus* e enterobactérias, entretanto, estudos semelhantes devem ser realizados em diferentes regiões do Estado, e até mesmo em microrregiões, a fim de verificar a variabilidade na microbiota nessa espécie. Os isolados bacterianos obtidos neste estudo são sensíveis à maioria dos grupos de drogas antimicrobianas testadas, principalmente à classe das tetraciclina e quinolonas, representadas pelas drogas doxiciclina, tetraciclina e enrofloxacin indicando seu potencial de uso em infecções genitais em ovinos da região de estudo. Além disso, a ausência de multirresistência frente aos grupos de antimicrobianos permite uma maior disponibilidade de escolha para o tratamento dessas enfermidades.

REFERÊNCIAS

- Aiello S.E. (Ed.). 2001. Manual Merck de Veterinária. 8. ed. São Paulo: Roca, 1861p.
- Andrade J.R.A., Silva N., Silveira W., Teixeira M.C.C. 2005. Estudo epidemiológico de problemas reprodutivos em rebanhos bovinos na bacia leiteira de Goiânia. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 57(6): 720-725.
- Andrade J.B. 2006. Estudo Microbiológico e Citológico do Trato Genital de Gatas Domésticas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 43p.
- Arthur G. H., Noakes D. E., Pearson H., Parkinson T.J. 1996. Veterinary reproduction & obstetrics. 17.ed. London: W. B. Saunders Company.
- Balassu M.T., Torres E.B., Vizmanos M.F.C. 1992. Bacteriologic profile of the uterus and vagina of non-pregnant buffalo-cows. Philadelphia Journal of Medicine, Philadelphia, 29(2): 35-41.
- Bouters R., Vandeplassche M. 1977. Post partum infection in cattle: diagnosis, preventive and curative treatment. J.S. Afr. Vet. Assoc., 48(4): 237-239.
- Campero C.M., Conosciuto G., Odriozola E. 1992. Hallazgos clinicos, bacteriológicos e histopatológicos en vaca lecheras, asociados com problemas reprodutivos. Rev. Med. Vet. Buenos Aires, Buenos Aires, 72(6): 264-272.

- Campos A.C.C., Junior R.F., Ribeiro, L.F.J., Paulinelli R.R., Reis, C. 2008. Prevalence of vulvovaginitis and bacterial vaginosis in patients with koilocytosis. *Sao Paulo Med J.*,126(6):333-336.
- Carneiro D.O., Figueiredo H.C.P., Pereira Júnior D.J. 2007. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 59:869-896.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement, document M100-S16. Wayne, PA, USA: CLSI
- Coggan J.A., Melville P.A., Oliveira C.M., Faustino, M., Moreno A.M., Benites N.R. 2008. Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. *Braz. J. Microbiol.*, 39:477-483.
- Drescher G., Matiello S.P., Peixoto R.M., Vargas A.C., Maciel M.N., Costa M.M. 2010. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. *Ciênc. Anim. Bras.*, Goiânia, 11(1): 188-193.
- Domingues P.F.,Lucheis S.B.,Serrão L.S., Fernandes S., Contente A.P.A., Martins, E.C.V., Langoni H. 2006. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em ovelhas da raça santa Inês. *Ars. Vet.*, 22(2):146-152.
- Elliot L. McMahon K.J., Gier H.T., Marion G.B. 1968. Uterus of the cow after parturition: bacterial content. *Am. J. Vet. Res.*, 29(1): 77-81.
- Faubleé V.G., Tardy F., Bouveron C., Carret G. 2002. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 19: 219–226.
- Fornazari F., Ribeiro M.G., Santos F.C., Teixeira C.R., Rahal S.C., Teixeira R.H.F., Rassy F.B. 2007. Microbiota oral e sensibilidade microbiana in vitro em oito quatis criados no zoológico municipal Quinzinho de Barros, Sorocaba, SP. *Ciênc. Vet. Tróp.*,10(2/3):108-112.
- Freitas M.F.L., Pinheiro Júnior J.W., Stamford T.L.M., Rabelo S.S.A, Silva D.R., Silveira Filho V.M., Santos F.G.B., Sena M.J., Mota R.A. 2005. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 72(2):171-177.

- Fthenakis G.G. 1998. Susceptibility to antibiotics of staphylococcal isolates from cases of ovine or bovine mastitis in Greece. *Small Rumin. Res.*, 28: 9–13.
- Gani M.O, Amin M.M., Alam M.G.S., Kayesh M.E.H., Karim M.R., Samad M.A., Islam M.R. 2008. Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy cows. *Bangl. J. Vet. Med.* 6 (1): 79–86.
- Gomes M.C. 2006. Microbiota vaginal de cabras nas fases do proestro, pós cópula e pós parto. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 39p.
- Gregory L., [Rizzo H.](#) Atualidades no manejo das enfermidades reprodutivas. In: 4^o Congresso Internacional Feinco 2009, 2009, São Paulo. Disponível em: <http://www.sheepembryo.com.br/files/artigos/172.pdf>. Acesso em 21 fev. 2010.
- Husted J.R. 2003. Bacterial and fungal organisms in the vagina of normal cows and cows with vaginitis. Dissertação de mestrado. Texas A & M University: Veterinary Microbiology, 29p.
- IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 26/05/2009.
- Jacob J.C.F., Jesus V.L.T., Barbosa H.P., Zimmerman M.F., Silva A.G., Melo C.M. 2002. Susceptibilidade antimicrobiana de *swab* uterino e da fossa clitoriana de éguas com subfertilidade. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida*, 22(2): 109-114.
- Kreplin C.M. 1990. Infectious causes of reduced fertility in cattle. *Alberta Agriculture, Food and Rural Development*, 1: 31.
- Krumperman P.H. 1983. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foodst. *Appl. Environ. Microbiol.*, p. 165-170.
- Kuntze A., Aurich, J. 1995. *Der Endometritis–Pyometra–Komplex bei Tieren*. Vet. Special, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- Kunz T.L., Gambarini M.L., Oliveira Filho B.D., Galindo A.D.S. 2002. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião–patógenos. *Rev. Cons. Fed. Med. Vet.*, 8: 28-36.
- Lianjuan M., Yuemin L., Xun-m.1995. Microbial flora of the vagina of cows after parturition. *Chin. J. Vet. Scienc. Technol.*, 25(5): 7-26.

- Livermore D.M., 1995 Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance, Clin. Microbiol., 8:557-584.
- Lollai S.A., Ziccheddu M., Di Mauro C., Manunta D., Nudda A., Leori G. 2008. Profile and evolution of antimicrobial resistance of ovine mastitis pathogens (1995–2004). Small Rumin. Res., 74: 249-254.
- Lyon B.R., Skurray R. 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis, Microbiol. 51:88-134.
- Macedo N.R., Menezes C.P.L., Lage A.P., Ristow L.E., Reis A., Guedes R.M.C. 2007. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarréicos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 59: 1117-1123.
- Machado T.R.O., Correa M.G., Marin J.M. 2008. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 60(1): 278-282.
- Martins G., Figueira L., Penna B., Brandão F., Vargas R., Vasconcelos C., Lilenbaum W. 2009. Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progestin-impregnated intravaginal sponges. Small Rumin. Res., 81:182-184.
- [Moorthy A.R.](#), [Singh S.P.](#) 1982. Studies on the bacterial flora of the female genital tract of sheep. [Bull Anim. Health Prod. Afr.](#) 30(1):8-15.
- Oliveira S.J. 1995. Guia bacteriológico prático. Canoas: Ulbra.
- Panangala V.S., Fish N.A., Barnum D.A. 1978. Microflora of the Cervico-Vaginal Mucus of Repeat Breeder Cows. The Can. Vet. J., 19(4):83-89.
- Pessoa C.A. 2009. Avaliação da microbiota bacteriana e fúngica presente na cloaca de jabutis (*Geochelone carbonária*) criados em domicílio e análise do potencial risco à saúde humana. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 97p.
- Piddock L.J.V. 1996. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? J. Antimicrob. Chemother., 38:1-3.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe, 648p.

- Pimentel C. A. Infertilidade na fêmea bovina. In: Riet-Corrêa F., Shild A.L., Méndez M.C., Lemos R.A.A. 2001. Doenças de Ruminantes e Eqüinos. São Paulo: Varela, 2(6): 361-81.
- Ramaswamy V., Andrew M., Roy P. 1991. Aerobic microbes of cervico-vaginal mucus from repeat breeders bovines and their antibiogram. Sing. Vet. J., 14(15): 60-65.
- Riedner S., Albuquerque A.J.D., Badke M.R.T.1987. Weiblen R.1987. Resistência de bactérias isoladas do leite de vacas frente a doze drogas antibacterianas. Rev. C. Ciênci. Rur., Santa Maria, 11(3): 251-260.
- Rocha A.A., Gambarini M.L. Andrade M.A., Filho B.D.O., Gomes F.A. 2004. Microbiota cérvico-vaginal durante o final de gestação e puerpério em vacas girolando. Ciênci. Anim. Bras., 5(4): 215-220.
- Sena, M. J. 2000. Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE. Tese (Doutorado) - Escola Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 75p.
- Simplicio, A.A.; Wander, A.E.; Leite, E.R.; Lopes, E.A.; A caprino-ovinocultura de corte como alternativa para a geração de emprego e renda. Sobral: Embrapa Caprinos, 2004, 44p.
- Smith B.P. 1993. Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais. 1.ed. São Paulo: Manole.
- Smith B.I., Donovan G.A., Risco C., Littell R. Young C., Stanker L.H., Elliot J. 1998. Comparison of various antibiotic treatments for cows diagnosed with toxic puerperal metritis. J. Dairy Sci. Danvers: American Dairy Science Association, 81(6):1555-1562.
- Sharda R., Monghe M.N., Tanwani S.K. 1991. Antibiotic sensitivity pattern of bacteria isolated from repeat breeding animals. Indian Vet. J., 68: 197-200.
- Tabulsi I.R. 1999. Microbiologia. 3ª ed. São Paulo: Ateneu, 1.
- Torres E.B, Nakao T., Hiramune T., Moriyoshi M., Kawata K., Nakada K. 1997. Stress and uterine bacterial flora in dairy cows following clinically normal and abnormal puerperium. J. Reprod. Dev., 43(2):157-163.
- Torres C., Zarazaga M. 2002. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. Vamos por el buen camino? Gac. Sanit.,16: 109-112.

- Uchoa J. M. W. M. C., Silva N. G., Barreto M. B. P., Wischral A., Silva L. B. G., Batista A. M., Ferreira M. P. B. 2009. Flora bacteriana saprófita de fêmeas caprinas nulíparas criadas em regime de estabulação e pastoreio. [IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE](#). Disponível: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0472-1.pdf> acesso em 02 de março 2010.
- Vargas A.C., Costa M.M., Groff A.C.M., Viana L.R., Krewer C.C., Spricigo D.A., Kirinu J.K. 2005. Susceptibilidade de *Campylobacter foetus* subsp. *venerealis* isolado de bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 25(1):1-3.
- Verma H.K., Sharma D.K., Kaur H., Dhablama D.C. 1994. A bacteriological study of repeat breeders cows and their treatment. *Indian Vet. J.*, 47(6): 467-470
- Vicente D., Trallero E.P. 2010. Tetraciclina, sulfamidas y metronidazol. *Enferm. Infecc. Microbiol.Clin.*2010, 28(2):122–130.
- Witte W. 1998. Medical consequences of antibiotics use in agriculture. *Science*, 279: 996-997.
- Wunder J. A., Brinner W. W., Calkins G. P. 1976. Identification of the cultivable bacteria in dental plaque from the beagle dog. *J. Den. Res.*, Alexandria, 55(6):1097-1112.

Quadro 1. Percentual de sensibilidade aos antimicrobianos de microrganismos isolados da mucosa cérvico vaginal de ovelhas

ISOLADOS	(N)	SUT	ENO	CEF	PEN	AMO	DOX	TET	LIN	IRMA
<i>S. epidermidis</i>	06	100	100	100	83,3	100	100	66,6	83,3	0,06
<i>S.saprophyticus</i>	01	100	100	0	0	0	100	100	0	0,5
<i>S. schleiferi</i>	19	68,4	89,4	84,2	73,6	84,2	94,7	89,4	68,4	0,14
<i>S.lentus</i>	1	100	0	100	100	100	100	100	0	0,16
<i>S.arletae</i>	1	100	100	0	0	0	100	0	0	0,5
<i>Staphylococcus spp.</i>	2	100	100	100	50	50	100	100	50	0,33
<i>Escherichia coli</i>	14	92,8	92,9	0	0	78,6	92,9	78,6	0	0,36
<i>Micrococcus spp.</i>	12	41,7	91,7	66,7	41,7	50	100	75	41,7	0,30
<i>Acinetobacter spp.</i>	11	70	70	70	70	90	100	70	30	0,25
<i>Enterobacter spp.</i>	10	80	80	20	0	100	90	100	0	0,33
<i>Klebsiella spp.</i>	10	80	90	90	20	90	100	90	20	0,26
<i>Streptococcus spp.</i>	7	71,4	57,1	42,9	42,9	71,4	100	100	0	0,26
<i>Shigella spp.</i>	1	100	100	0	0	100	100	0	0	0,50
Média sensibilidade (%)		84,9	82,3	51,8	37,0	70,3	98,2	74,6	22,5	

N (número de isolados), SUT (sulfametazina), ENO (enrofloxacina), CEF (cefalotina), PEN (penicilina), AMO (amoxicilina), DOX (doxiciclina), TET (tetraciclina), LIN (lincomicina).

CAPÍTULO 3

Potencial antibacteriano *in vitro* do extrato etanólico de plantas pertencentes à flora do Nordeste do Brasil frente a *Staphylococcus* spp. isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas

(a ser submetido para Revista Small Ruminant Research)

Potencial antibacteriano do extrato etanólico de plantas pertencentes à flora nordestina frente à *Staphylococcus* spp. isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas

Valdenice Félix da Silva, Mateus Matiuzzi da Costa

Resumo

A utilização de antibióticos geralmente é o tratamento de escolha para infecções do trato reprodutivo das fêmeas domésticas. Entretanto, o surgimento de estirpes bacterianas resistentes tem incitado pesquisas referentes a alternativas que poderiam ser utilizadas para o mesmo fim. *Staphylococcus* spp. são considerados como componentes da microbiota genital de ovelhas, embora, em situações de estresse pode causar doença, caracterizando-os como agentes oportunistas. A fitoterapia tem sido alvo de inúmeros estudos a fim de verificar a eficácia de extratos de plantas contra esses microrganismos. Este estudo teve como objetivo verificar a atividade antibacteriana de extratos de plantas pertencentes à flora nordestina do Brasil frente à *Staphylococcus* spp. isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas. Foram selecionadas quatro plantas do bioma caatinga: *Encholirium spectabile*, *Bromelia laciniosa*, *Amburana cearensis* e *Hymenaea martiana*. O material vegetal foi processado até obtenção do extrato bruto. Este foi testado por meio da microdiluição em placa e determinação da concentração bactericida mínima, segundo documento do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), sendo os extratos diluídos em água destilada e álcool. Foram utilizados 30 isolados de *Staphylococcus* spp.. Na diluição aquosa, o maior percentual de inibição foi observado com *E. spectabile* e *H. martiana*, respectivamente, em 63,3 e 76,6% dos

isolados. Enquanto que na diluição alcoólica a maior atividade inibitória foi propiciada pelos extratos de *H. martiana* e *B. laciniosa*, que inibiram 50% dos isolados, enquanto que os extratos de *E. spectabile* e *A. cearensis* inibiram 43,3 e 36,6% respectivamente.

Palavras-chave: microbiota vaginal, sensibilidade, extrato de plantas

Abstract

The use of antibiotics is usually the treatment of choice for infections of the reproductive tract of female domestic. However, the emergence of resistant bacterial strains has prompted research regarding alternatives that could be used for the same purpose. *Staphylococcus* spp. are considered as components of the genital microflora of sheep, although in situations of stress can cause disease, characterizing them as opportunistic agents. Phytotherapy has been the subject of numerous studies to verify the effectiveness of plant extracts against these microorganisms. This study aimed to verify the antibacterial activity of extracts of plants of northeastern flora against *Staphylococcus* spp. isolated from cervical-vaginal mucosa of sheep. We selected four plants in caatinga biome: *Encholirium spectabile*, *Bromelia laciniosa*, *Amburana cearensis* and *Hymenaea martiana*. The plant material was processed to obtain the crude extract. This was tested by microdilution plate and determining the minimum bactericidal concentration, the second document of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the extracts diluted in water and alcohol. We used 30 strains of *Staphylococcus* spp.. In aqueous dilution, the highest percentage of inhibition was observed with *E. spectabile* and *H. martiana*, respectively, 63.3 and 76.6% of isolates. While the dilution alcoholic highest inhibitory activity was generated by the extracts of *H.*

martiana and *B. laciniosa*, which inhibited 50% of isolates, as the extracts of *E. spectabile* and *A. cearensis* inhibited 43.3 and 36.6% respectively.

Key words: vaginal microbiota, sensitivity, plants extracts

1. Introdução

A antibioticoterapia é a terapêutica comumente utilizada em infecções do trato reprodutivo, porém, a crescente preocupação com a presença de resíduos de drogas nos produtos de origem animal e o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes, tem estimulado a busca por meios alternativos que reduzam ou eliminem tais problemas (Pinto et al. 2001).

Staphylococcus spp. são considerados habitantes da pele e trato gastrintestinal (Oliveira et al. 1995), e são constantemente isolados tanto da microbiota vaginal normal (Rocha et al. 2004, Gomes, 2006, Martins et al. 2009,) como de amostras oriundas de infecções do trato reprodutivo (Husted 2003, Gani et al. 2008), sendo considerados microrganismos de caráter oportunista.

Alguns artigos foram publicados demonstrando a atividade antimicrobiana de plantas, sendo utilizadas em tratamentos tanto em humanos (Ahmad et al. 2001, Pessini et al., 2003, Seydnejad et al., 2010;) como em animais (Pinto et al., 2001; Santurio et al., 2007; Schuch et al., 2008) principalmente na terapia de infecções oculares e em transtornos dos sistemas digestivo e reprodutivo (Lans et al., 2007). A atividade antimicrobiana de alguns extratos de espécies vegetais nativas ou endêmicas encontradas no semiárido brasileiro foi testada, apresentando resultados satisfatórios principalmente contra bactérias gram positivas (Novais et al. 2003).

Em medicina veterinária, evidências científicas sugerem um potencial significativo do uso de plantas para melhorar a saúde animal em geral, particularmente em ruminantes (Viegi et al. 2003). O conhecimento da influência de bioativos de plantas (principalmente contendo saponinas e taninos), na eficiência reprodutiva, produção de leite e melhoria da qualidade da carne têm sido objetivo de inúmeras pesquisas (Rochfort et al., 2008).

Desta forma este artigo teve por objetivo avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana de quatro extratos de plantas oriundas do bioma caatinga frente à *Staphylococcus* spp. isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas criadas na microrregião de Petrolina, Pernambuco.

2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco, no município de Petrolina – PE, a uma latitude de -09° 23' 55" e longitude de 40° 30' 03", sendo localizada no Nordeste do Brasil.

2.1. Coleta do material vegetal

As espécies vegetais selecionadas foram *Encholirium spectabile* Mart. Ex Schult. f. (6443), *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A.C.Smith (5545) *Bromelia laciniosa* Mart. Ex Schult. f. (6442) e *Hymenaea martiana* Hayne (6444). O material vegetal foi identificado por um botânico sendo as exsicatas das espécies depositadas no Herbário da Universidade Federal do Vale do São Francisco (HVASF).

2.2. Processamento do material vegetal

O material vegetal foi dessecado em estufa com circulação forçada à temperatura média de 40 °C durante três dias. Após a secagem e completa estabilização (eliminação de água, inativação de enzimas, etc.) o material foi processado em moinho, obtendo-se um material vegetal seco e pulverizado.

2.3. Obtenção do Extrato Etanólico Bruto

O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração exaustiva com etanol 95% em um recipiente de aço inoxidável. Foram feitas várias extrações num intervalo de 72 horas entre cada extração até completo esgotamento do material vegetal. A solução extrativa obtida passou por um processo de destilação do solvente em evaporador rotativo à pressão reduzida a uma temperatura média de 50 °C. Após este processo de evaporação do solvente, obteve-se o extrato etanólico bruto.

2.4. Testes de sensibilidade aos extratos etanólicos

Foram utilizados 30 isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas pertencentes aos rebanhos do município de Petrolina e região. Foi utilizada uma cepa “methicillin-resistant de *Staphylococcus aureus*” (MRSA) como controle, conforme recomendado por Cos et al. (2006). Foram testados 0,25 g de cada extrato etanólico, os quais foram diluídos em água destilada estéril e álcool absoluto, sendo utilizados 10 mL em ambos os diluentes, obtendo-se uma solução estoque na concentração de 25 mg/mL. A microdiluição, baseada no documento M7-A7 (CLSI, 2006), consistiu na distribuição de 200 µL de caldo Muller-Hinton em placas de microtitulação; a seguir, 200 µL da solução estoque do extrato eram acrescentados ao primeiro poço e, após homogeneização, transferia-se para o segundo e assim sucessivamente, sendo obtidas as seguintes concentrações finais: 12.500; 6.250; 3.125; 1.562,5; 781,3; 390,6; 195,3 e 97,6 µg/mL.

Na preparação do inóculo, colônias desenvolvidas em Ágar Muller-Hinton foram utilizadas na obtenção de uma suspensão bacteriana com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland. Desta suspensão, foi inoculado 10 µL nos poços das microplacas contendo a diluição do extrato etanólico. O material foi incubado a 37 °C por 24h, em condições de aerobiose. De todos os poços, retirou-se uma alíquota de 10 µl, semeando-se na superfície de ágar MH e incubando por 24 horas a 37 °C. A concentração bactericida mínima (CBM) foi definida como a menor concentração do extrato etanólico em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Para os extratos diluídos em álcool, além do controle positivo e negativo, foi realizada a diluição do etanol absoluto sem os extratos, sendo consideradas as CBM dos extratos, quanto menores que aquelas obtidas para o etanol absoluto. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5. Análise estatística

O delineamento utilizado foi do tipo inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 30 (isolados de *Staphylococcus* spp.) x 4 (extratos etanólicos vegetais), em três repetições. Avaliou-se o efeito dos isolados, dos extratos e a interação entre estes fatores, e os tratamentos que apresentaram significância foram comparados pelo teste de Tukey a 5%.

3. Resultados

Foram obtidas as seguintes médias de CBM para a MRSA frente às espécies vegetais: *Encholirium spectabile* (10.417 µg/mL), *Bromelia laciniosa* (10.417 µg/mL), *Amburana cearensis* (12.500 µg/mL) e *Hymenaea martiana* (10.417 µg/mL). As quatro espécies de plantas apresentaram atividade antimicrobiana em ambas as diluições. De modo geral, os isolados apresentaram sensibilidade aos extratos vegetais utilizados, assim como diferença significativa de sensibilidade entre os isolados para um determinado extrato, sendo as médias de CBM listadas na Tabela 1. O extrato de *E. spectabile* apresentou atividade antimicrobiana com diferenças significativas entre os isolados de *Staphylococcus* spp., assim como os de *B. laciniosa* em que observou-se 11 isolados com respostas similares, diferindo significativamente dos demais e apresentando menor susceptibilidade ao extrato, enquanto em apenas dois isolados (24 e 25) houve efeito ativo do extrato. Frente ao extrato etanólico de *H. martiana*, 20 isolados foram estatisticamente semelhantes, apresentando médias abaixo de 1.562,5 µg/mL, demonstrando uma maior atividade do extrato. Perante o extrato de *A. cearensis* os isolados foram significativamente diferentes entre si, destacando-se o isolado 20 que foi o mais sensível.

As médias de CBM para os extratos quando diluídos em álcool são listadas na tabela 2. Perante o extrato de *E. spectabile* um isolado apresentou diferença

estatística dos demais, com média de 5.208 µg/mL. Enquanto que frente a *B. laciniosa*, observou-se nove isolados semelhantes, sendo estes mais sensíveis ao extrato. O extrato de *A. cearensis* inibiu o crescimento de 11 isolados de *Staphylococcus* spp., com CBM variando de 195,3 a 3.125 (Tabela 2), dentre estes, 8 isolados não diferiram entre si, com CBM de 195,3 a 781,3, mas apresentaram diferenças em relação aos demais. Assim como na diluição aquosa, a maioria dos isolados (n=11) foram estatisticamente semelhantes frente ao extrato de *H. martiana* diluído em álcool, apresentando médias inferiores a 781,3 µg/mL.

Em relação ao percentual de atividade antibacteriana, quando diluídos em água, o maior percentual de inibição foi observado com *E. spectabile* e *H. martiana*, respectivamente em 63,3 e 76,6% dos isolados. Enquanto que na diluição alcoólica a maior atividade inibitória foi propiciada pelos extratos de *H. martiana* e *B. laciniosa*, que inibiram 50% dos isolados, à medida que os extratos de *E. spectabile* e *A. cearensis* inibiram 43,3 e 36,6% respectivamente.

Tabela 1. Susceptibilidade de *Staphylococcus* spp. isolados da mucosa cérvico vaginal de ovelhas frente aos extratos etanólicos de plantas, da flora nordestina, diluídos em água

Isolados	Extratos etanólicos (Média CBM (µg/mL))			
	<i>E. spectabile</i>	<i>B. laciniosa</i>	<i>A. cearensis</i>	<i>H. martiana</i>
1	s/a	s/a	s/a	s/a
2	3.125b	6.250b	6.250b	390,6c
3	10.416ab	12.500a	s/a	521c
4	s/a	s/a	s/a	8.463ab
5	s/a	s/a	s/a	156c
6	12.500a	12.500a	s/a	12.500a
7	6.250b	s/a	s/a	1.562,5c
8	1.562,5c	1.562,5e	6.250b	390,6c
9	s/a	s/a	s/a	s/a
10	12.500a	12.500a	8.333b	1.562,5c
11	10.416ab	5.208c	s/a	781,3c
12	s/a	s/a	s/a	s/a
13	s/a	s/a	s/a	s/a
14	1.562,5c	12.500a	12.500a	1.562,5c
15	1.562,5c	s/a	s/a	651c
16	6.250b	6.250b	s/a	651c
17	12.500a	12.500a	12.500a	651c
18	s/a	s/a	s/a	s/a
19	12.500a	12.500a	s/a	781,3c
20	s/a	s/a	2.604c	1.562,5c
21	s/a	s/a	s/a	s/a
22	12.500a	12.500a	12.500a	97,6c
23	6.250b	s/a	s/a	195,3c
24	6.250b	3.125d	s/a	97,6c
25	6.250b	3.125d	s/a	195,3c
26	12.500a	12.500a	s/a	781,3c
27	12.500a	12.500a	s/a	6.250b
28	12.500a	12.500a	s/a	1.562,5c
29	s/a	12.500a	12.500a	1.562,5c
30	s/a	s/a	s/a	s/a
Média	8.415,5 ¹	9.589,5 ²	9.179,7 ³	1.866,5 ⁴

¹n=19, ²n= 17, ³n=8, ⁴n=23 n= número de amostras s/a= sem atividade

Tabela 2. Susceptibilidade de *Staphylococcus* spp. isolados da mucosa cérvico vaginal de ovelhas frente aos extratos etanólicos de plantas, da flora nordestina, diluídos em álcool.

Isolados	Extratos etanólicos (Média CBM (µg/mL))			
	<i>E. spectabile</i>	<i>B. laciniosa</i>	<i>A. cearensis</i>	<i>H. martiana</i>
1	5.208a	2.604 ^a	s/a	2.604a
2	s/a	1.562,5b	s/a	1.562,5b
3	s/a	s/a	s/a	s/a
4	s/a	s/a	s/a	s/a
5	1.562,5b	1.562,5b	s/a	s/a
6	s/a	s/a	s/a	s/a
7	s/a	s/a	s/a	s/a
8	s/a	s/a	s/a	s/a
9	781,3b	781,3c	781,3c	781,3bc
10	s/a	s/a	s/a	s/a
11	1.562,5b	1.562,5b	781,3c	781,3bc
12	1.562,5b	3.125 ^a	3.125a	1.562,5b
13	781,3b	781,3c	781,3c	390,6c
14	s/a	s/a	s/a	s/a
15	390,6b	390,6cd	195,3c	195,3c
16	781,3b	781,3c	781,3c	781,3bc
17	390,6b	390,6cd	s/a	195,3c
18	s/a	s/a	s/a	s/a
19	s/a	s/a	s/a	s/a
20	s/a	s/a	s/a	s/a
21	781,3b	781,3c	390,6cd	195,3c
22	s/a	s/a	s/a	s/a
23	s/a	s/a	s/a	s/a
24	s/a	s/a	s/a	s/a
25	s/a	s/a	s/a	97,6c
26	s/a	1.562,5b	2.083b	2.083a
27	1.562,5b	781,3c	1.562,5b	195,3c
28	s/a	s/a	s/a	s/a
29	781,3b	781,3c	781,3c	97,6c
30	651b	781,3c	390,6cd	195,3c
Média	1.292 ¹	1.215,3 ²	1.059,4 ³	781,3 ⁴

¹n=13, ²n=15, ³n=11, ⁴n=15 n= número de amostras s/a= sem atividade

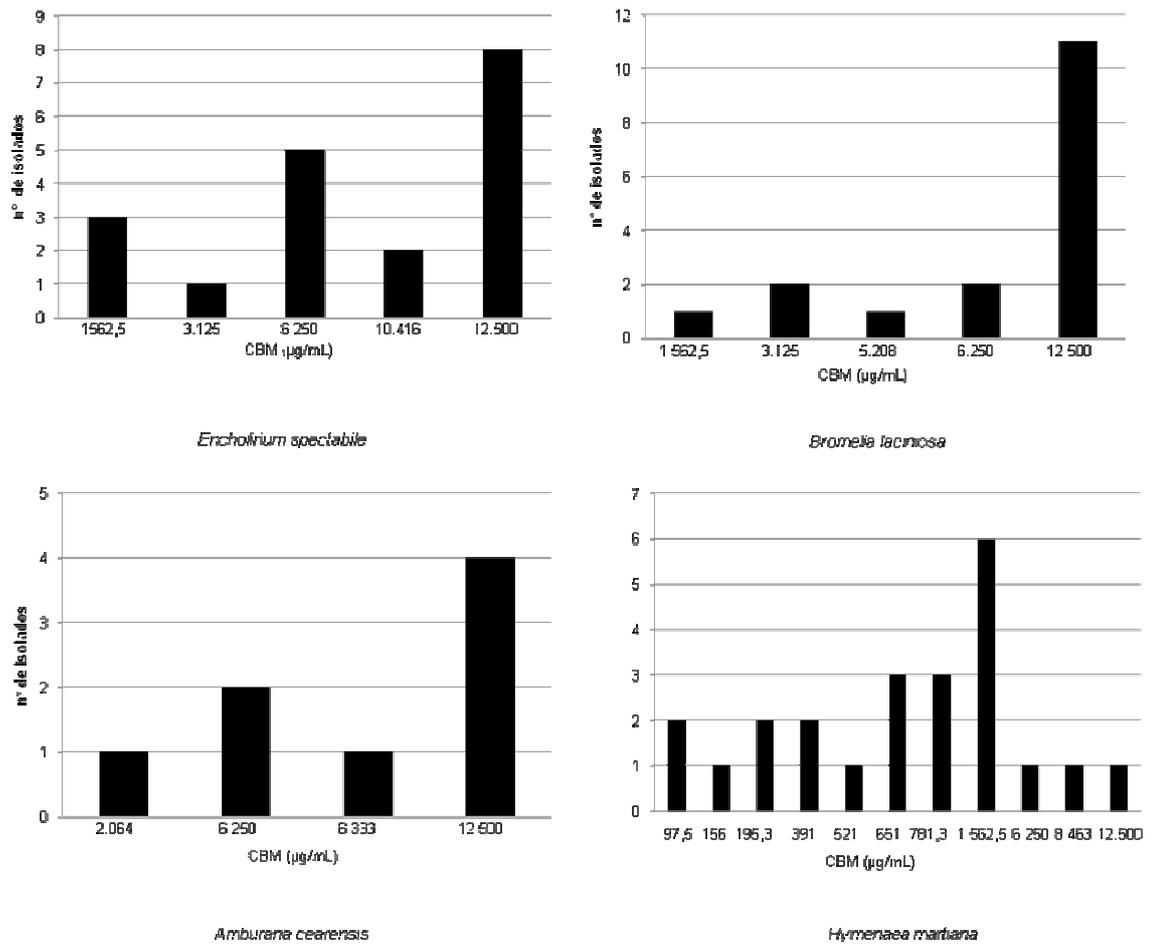


Figura 1. Distribuição das concentrações inibitórias mínimas dos extratos de plantas do bioma caatinga, diluídos em água, sobre isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos da mucosa genital de ovelhas.

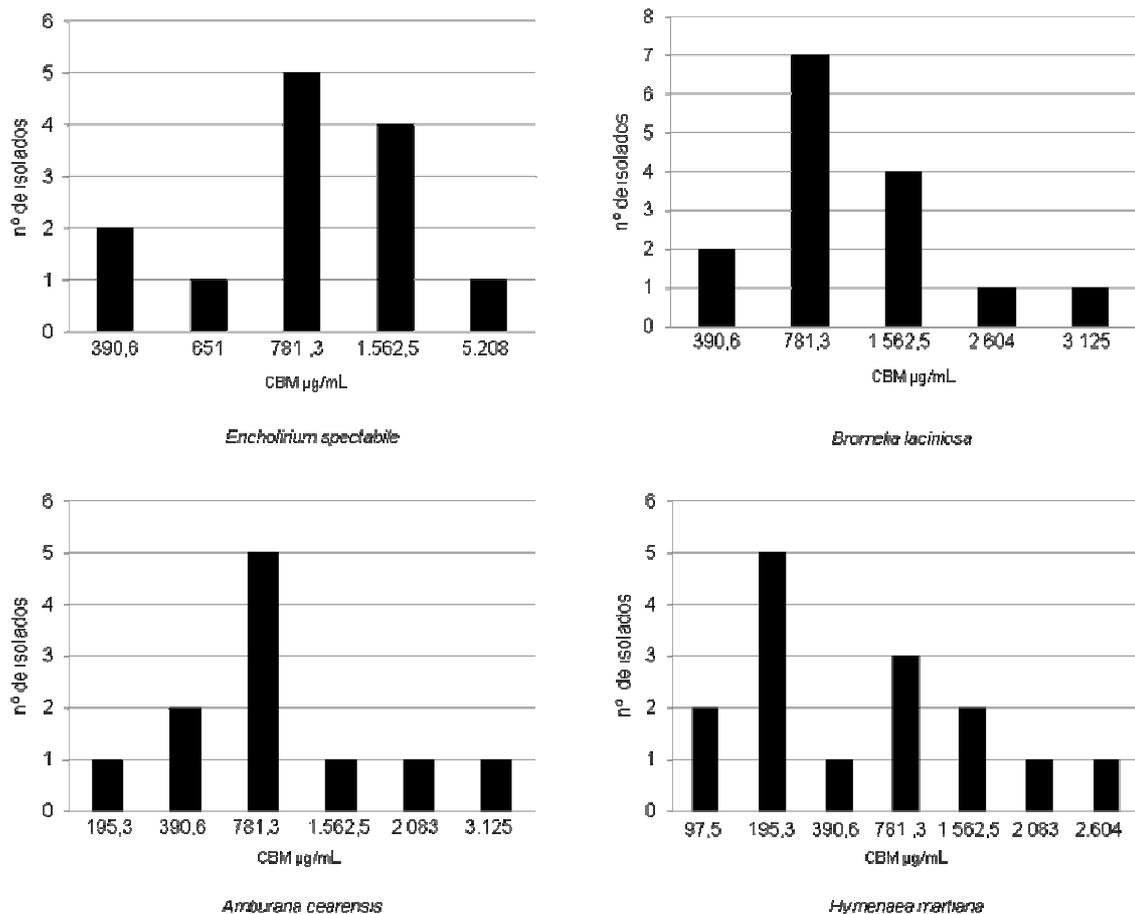


Figura 2. Distribuição das concentrações inibitórias mínimas dos extratos de plantas do bioma caatinga, diluídos em álcool, sobre isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos da mucosa genital de ovelhas.

4. Discussão

No presente estudo verificou-se que a água foi capaz de extrair compostos com ação antimicrobiana das espécies de plantas, entretanto, pesquisas posteriores devem ser realizadas a fim de caracterizar essas substâncias bioativas. O maior percentual de inibição foi propiciado pelas espécies *E. spectabile* (63,3%) e *H. martiana* (76,6%). Resultados semelhantes foram encontrados por Peixoto (2009), que, avaliando a atividade antimicrobiana das mesmas espécies frente a *Staphylococcus* spp. oriundos de mastite ovina e caprina, verificou um percentual de

49,9% e 99,4% respectivamente. Segundo Salisbury & Ross (1992), a atividade biológica demonstrada por plantas advém de metabólitos secundários como: flavonóides, lignanas, terpenos, alcalóides, esteróis, ácidos graxos, taninos, açúcares, suberinas, ácidos resinóicos, carotenóides entre outros. Manetti et al. (2009) relataram a presença de triterpenos, esteróides e flavonóides em espécies da família Bromeliaceae, entretanto, do ponto de vista farmacológico existem poucos estudos, principalmente referentes à *B. laciniosa*. O extrato de *A. cearensis* apresentou o menor percentual de inibição frente à *Staphylococcus* spp., embora seja relatada atividade antimicrobiana dessa espécie de planta, inclusive contra bactérias gram negativas (Bravo et al. 1999, Peixoto, 2009).

Quando diluídos em álcool, o extrato de *H. martiana* apresentou maior atividade antibacteriana, com média de 781 µg/mL. Gonçalves et al. (2005), por meio de difusão em ágar, verificaram atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolólico a 10% de *H. courbaril* frente a *S. aureus*. Esta espécie de planta é conhecida por conter terpenos e compostos fenólicos com comprovada propriedade antimicrobiana (Marsaioli, 1975). Em um estudo da atividade antibacteriana do extrato hidroalcolólico de *H. courbaril* frente à *Staphylococcus* spp., Fernandes et al. (2005) verificaram uma CIM de 1,25 mg/mL que corresponde à 1.250 µg/mL, valor semelhante ao que foi encontrado neste estudo, demonstrando que a planta apresenta atividade biológica semelhante frente a amostras do mesmo gênero, embora de origens diferentes. Pereira et al. (2007) verificaram atividade antimicrobiana do óleo essencial de *H. courbaril* e obtiveram alta inibição frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores ainda observaram a toxicidade do óleo frente a larvas de *Artemia salina*, sendo classificada como eficiente por apresentar uma CL₅₀ de 8,83 µg/mL, inferior ao limite que é 1.000 µg/mL.

Os extratos das espécies testadas, quando diluídos tanto em água, como em álcool apresentaram grandes variações nas médias de CBM. Segundo Duarte (2007), não existe um consenso sobre o nível de inibição ideal para produtos naturais, entretanto, uma classificação de extratos vegetais com base em resultados de CBM foi proposta, sendo considerado como forte inibição - CBM até 500 µg/mL; inibição moderada – CBM entre 600 e 1.500 µg/mL e como fraca inibição - CBM acima de 1.600 µg/mL (Aligianis et al. 2001). Entretanto Cos et al.(2006) consideram uma IC₅₀ com valores inferiores a 100 µg/mL para extratos naturais. A classificação de resultados como de alta ou baixa inibição apresenta caráter subjetivo, em que não são considerados fatores como o tipo de microrganismo testado, o número de amostras utilizadas no teste, assim como a variabilidade e disponibilidade dos compostos ativos presentes no extrato. Ao analisarmos a distribuição das CBM nos diferentes isolados (Figuras 1 e 2), podemos observar uma grande variação nos resultados, logo, uma interpretação pouco criteriosa dos resultados, pode levar a erros (Cos et al., 2006).

Dessa forma, deve-se levar em consideração o número de amostras testadas, principalmente com relação ao estabelecimento das concentrações do produto que seriam indicadas em tratamentos. Também não existe um consenso com relação a um número mínimo de amostras que devam ser testadas ao se avaliar a atividade antimicrobiana de produtos naturais, sendo encontrada grande variação nesse tipo de experimento (Chah et al. 2000, Fernandes et al. 2005, Degáspari et al. 2005, Santurio et al. 2007). Souza et al. (2007) verificaram atividade anti-séptica de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville em três amostras, sendo estas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *E. coli*, obtendo concentração bactericida mínima entre 50.000 e 75.000 µg/mL. Enquanto Peixoto (2009) avaliou a

atividade de seis plantas da flora nordestina frente a 160 isolados de *Staphylococcus* spp. com médias de CBM entre 2.811 e 11.995 µg/mL.

5. Conclusões

Nos dois diluentes testados, água e álcool, o extrato de *H. martiana* apresentou melhor atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus* spp. Os extratos diluídos em água induziram maiores percentuais de sensibilidade nos isolados, contudo as CBMs foram menores quando os mesmos foram diluídos em álcool, sugerindo que o tipo de diluente é importante nos testes de atividade antibacteriana de produtos naturais. Levantamentos referentes às concentrações dos extratos que seriam consideradas como ideais para tratamentos, principalmente nas espécies estudadas, são limitados. Pesquisas referentes a estes fatores têm grande relevância, uma vez que propiciam uma perspectiva para o desenvolvimento de fitoterápicos, principalmente na região nordeste, que possui alta disponibilidade dessas espécies de plantas.

6. Referências Bibliográficas

- Ahmad, I, Beg, A, 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian Medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 113–123.
- Aligianis, N, Kalpoutzakis, E, Mitaku, S, Chinou, IB, 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4168-4170.

- Bravo, J.A., Sauvain, M., Gimenez, A., Munoz, V., Callapa, J. Le Men-Oliver, L., Massiot, G., Lavaud, C., 1999. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry*. 50(1), 71-74.
- Chah, KF, Mukob, UKN, Oboegbulema, SI, 2000. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. *Fitoterapia*, 71, p.187-189.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement, document M100-S16. Wayne, PA, USA: CLSI.
- Cos, P, Vlietinck, AJ, Berghe, DV, Maes, L, 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. 106, 290-302.
- Duarte, MCT, 2007. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multiciência*. 7, 1-16
- Degáspari, CH, Waszczyński, N, Prado, MRM, 2005. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. *Ciênc. agrotec.*, 29(3), p. 617-622.
- Fernandes, T.T., Santos, A.T.F., Pimenta, F.C., 2005. Atividade antimicrobiana das plantas – *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Rev. de Pat. Trop.* 34(2), 113-122.
- Gani M.O, Amin M.M., Alam M.G.S., Kayesh M.E.H., Karim M.R., Samad M.A., Islam M.R. 2008. Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy cows. *Bangl. J. Vet. Med.* 6 (1): 79–86.
- Gomes M.C. 2006. Microbiota vaginal de cabras nas fases do proestro, pós cópula e pós parto. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 39p.

Gonçalves, AL, Alves Filho, A, Menezes, H, 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arq. Inst. Biol. 72(3), 353-358.

Husted J.R. 2003. Bacterial and fungal organisms in the vagina of normal cows and cows with vaginitis. Dissertação de mestrado. Texas A & M University: Veterinary Microbiology, 29p.

[Lans, C](#), [Turner, N](#), [Khan, T](#), [Brauer, G](#), [Boepple, W](#), 2007. Ethnoveterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada. [J Ethnobiol Ethnomed.](#), 26, p.3-11.

Manetti, L.M., Delaporte, R.H., Javerde Junior, A., 2009. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. Quím. Nova. 15, 1-13.

Martins G., Figueira L., Penna B., Brandão F., Vargas R., Vasconcelos C., Lilenbaum W. 2009. Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progestin- impregnated intravaginal sponges. Small Ruminant Research, 81:182-184.

Marsaioli, AJ, 1975. Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. Phytochemistry, 14, p.1882-1883.

Novais, TS, Costa, JFO, David, JPL, David, JM, Queiroz, LP, França, F, Giulietti, AM, Soares, MBP, Santos, RR, 2003. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. Rev. Bras. de Farmacognosia. 14, p.5-8.

Oliveira S.J. 1995. Guia bacteriológico prático. Canoas: Ulbra.

Peixoto, RM, 2009. Mastite em pequenos ruminantes: Etiologia, fatores de risco, diagnóstico e sensibilidade aos agentes antimicrobianos e extratos de plantas. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Pernambuco, 114p.

- Pereira, C.K.B., Rodrigues, F.F.G., Mota, M.L., Sousa, E.O., Leite, G.O., Barros, A.R.C., Lemos, T.L.G., Costa, J.G.M., 2007. Composição química, atividade antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* L. (jatobá). Anais 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, São Paulo, SP (Resumo).
- Pessini, GL, Holetz, FB, Sanches, NR, Cortez, DAG, Dias Filho, BP, Nakamura, CV, 2003. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. Rev. Bras.Farmacogn., 3, p. 21-24.
- Pinto, MS, Faria, JE, Message, D, Cassini, STA, Pereira, CS, Gioso, MM, 2001. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. Braz. J. vet. Res. anim. Sci. 38(6) p. 278-283.
- Rocha A.A., Gambarini M.L. Andrade M.A., Filho B.D.O., Gomes F.A. 2004. Microbiota cérvico-vaginal durante o final de gestação e puerpério em vacas girolando. Ciência Animal Brasileira, 5(4): 215-220.
- Rochfort, S, Parker, AJ, Dunshea, FR, 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. Phytochemistry. 69, 299-322.
- Santurio, JM, Santurio, DF, Pozzatti, P, Moraes, C, Franchin, PR, Alves, SH, 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. Ciência Rural, 37(3), p. 803-808.
- Salisbury, FB, Ross, CW, 1992. Plant Physiology, 4ª ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company.
- Schuch, LFD, Wiest, JM, Coimbra, HS, Prestes, LS, De Toni, L, Lemos, JS, 2008. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a

microrganismos relacionados à mastite bovina. *Ciência Animal Brasileira*, 9(1), p. 161-169.

Seyydnejad, SM, Niknejad, M, Darabpoor, I, Motamedi, H, 2010. Antibacterial Activity of Hydroalcoholic Extract of *Callistemon citrinus* and *Albizia lebbek* . *American Journal of Applied Sciences* 7 (1) p.13-16.

Souza, TM, Moreira, RRD, Pietro, RCLR, Isaac, VLB, 2007. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. *Rev. Bras. Pharmacogn.*, 17(1) p.71-75.

[Viegi, L](#), [Pieroni, A](#), [Guarrera, PM](#), [Vangelisti, R](#), 2003. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. [J Ethnopharmacol.](#) 89, p.221-44.

CAPÍTULO 4

Potencial antimicrobiano “*in vitro*” de extratos etanólicos de plantas frente a bacilos gram negativos isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas criadas na região de Petrolina-PE.

(a ser submetido para Revista Brasileira de Farmacognosia)

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.

Valdenice Félix da Silva, Mateus Matiuzzi da Costa

Resumo

Infecções do trato reprodutivo são as principais causas de baixa eficiência reprodutiva de ovelhas. Bacilos gram negativos pertencentes à microbiota genital podem ser patógenos oportunistas. Falhas na antibioticoterapia e a preocupação com resíduos destas drogas nos animais de produção têm incitado pesquisas referentes a alternativas para o tratamento de enfermidades. A fitoterapia tem sido considerada nesse âmbito, sendo alvo de inúmeras pesquisas. Este estudo teve por objetivo avaliar o potencial antibacteriano de extratos etanólicos de plantas pertencentes à flora nordestina frente a bacilos gram negativos isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas. Foram selecionadas seis plantas do bioma caatinga: *Encholirium spectabile*, *Bromelia laciniosa*, *Neoglaziovia variegata*, *Amburana cearensis*, *Hymenaea martiana* e *Selaginella convoluta*. O material vegetal foi processado até obtenção do extrato bruto. Este foi testado por meio da microdiluição em placa e determinação da concentração bactericida mínima, segundo documento do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), sendo os extratos diluídos em água destilada e álcool. Foram utilizados 43 isolados gram negativos, sendo: 14 *E. coli*, 10 *Enterobacter* spp., 10 *Acinetobacter* spp. e 9 *Klebsiella* spp.. Na diluição aquosa o gênero *Klebsiella* apresentou resposta somente às espécies *B. laciniosa*, *S. convoluta* e *H. martiana*. Todos os extratos testados apresentaram atividade antimicrobiana perante *Acinetobacter* spp e nenhuma atividade frente *E. coli* e *Enterobacter* spp. Dentre os extratos diluídos em água, *H. martiana* demonstrou a maior atividade antibacteriana. Na diluição alcoólica todos os extratos apresentaram atividade inibitória perante todos os gêneros bacterianos, porém não apresentaram diferença estatística entre eles.

Palavras – chave: trato reprodutivo, bactérias oportunistas, fitoterapia

Abstract

Reproductive tract infections are the main causes of losses from the low reproductive efficiency of sheep. Gram negative bacilli belonging to the normal flora of the genital region can trigger diseases. The pathogenicity of these agents is expressed when females are with weakened immune system, either by food or stress management. Flaws in and concern about antibiotic residues in animal production have prompted research regarding alternatives for the treatment of diseases. The herbal medicine has been considered in this context is the subject of numerous studies. This study aimed to evaluate the antibacterial potential of ethanol extracts of plants belonging to the flora of the Northeast against gram negative bacilli isolated from cervical-vaginal mucosa of sheep. Six plants were selected from Caatinga biome: *Encholirium spectabile*, *Bromelia laciniosa*, *Neoglaziovia variegata*, *Amburana cearensis*, *Hymenaea martiana* and *Selaginella convoluta*. The plant material was processed to obtain the crude extract. This was tested by microdilution plate and determining the minimum bactericidal concentration, the second document of Clinical and Laboratory Standards

Institute (CLSI) and the extracts diluted in water and alcohol. We used 43 gram negative isolates, as follows: 14 *E. coli*, 10 *Enterobacter* spp., 10 *Acinetobacter* spp. 9 and *Klebsiella* spp. In the aqueous dilution *Klebsiella* spp. showed response only to species *B. laciniosa*, *S. convoluta* and *H. martiana*. All tested extracts showed antibacterial activity against *Acinetobacter* spp and no activity against *E. coli* and *Enterobacter* spp. Among the extracts diluted in water *H. martiana* showed the highest antibacterial activity. In all dilution alcoholic extracts showed inhibitory activity against all bacterial genera, but no statistical difference between them.

Key words: reproductive tract, opportunistic bacteria, phytotherapy

1. INTRODUÇÃO

A principal causa da baixa eficiência reprodutiva de ovelhas está relacionada às infecções do trato reprodutivo, que são responsáveis por perdas ocasionadas pelo descarte de fêmeas e diminuição do número de crias destinadas ao abate (Forar et al., 1995). Bacilos gram negativos são componentes da microbiota normal da região cérvico-vaginal em diversas espécies domésticas (Rocha et al., 2004, Martins et al., 2009). Esses microrganismos, principalmente enterobactérias, são considerados como patógenos oportunistas, desencadeando doença em situações de estresse, como o final da gestação e pós-parto. Mudanças bruscas de temperatura, deficiências nos manejos alimentar, de transporte e práticas como vacinações podem desencadear desequilíbrios entre os hospedeiros e microrganismos fazendo com que estes expressem sua patogenicidade (Verma et al., 1994). Artigos demonstram a prevalência de enterobactérias na etiologia de enfermidades do trato reprodutivo (Husted, 2003, Andrade et al., 2005), sendo a *Escherichia coli* o principal agente isolado.

Resultados insatisfatórios frente à utilização de drogas antimicrobianas, a preocupação com a resistência bacteriana e os resíduos teciduais deixados pelas drogas nos animais destinados à produção de alimentos enfatizam a necessidade de alternativas para o tratamento das enfermidades do trato reprodutivo (Aiello, 2001). Estudos referentes a fitoterápicos têm se desenvolvido no Brasil nas últimas décadas, sendo parte deles envolvendo espécies nativas do

nordeste, especificamente do bioma caatinga (Agra et al., 2008, Albuquerque et al., 2005). Alguns trabalhos vêm demonstrando a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de plantas da flora nordestina. Pode-se citar a *Amburana cearensis* (Bravo et al., 1999), *Hymenaea courbaril*, (Nogueira et al., 2001), *Borreria verticillata* (Peixoto-Neto et al. 2002), *Croton sonderianus* (McChesney, 1991), *Hyptis suaveolens* (Iwu et al. 1990), *Maytenus rigida* (Kloucek et al. 2005), *Pithecellobium cochliacarpum* (Araújo et al. 2002), *Plumbago scandens* (Paiva et al. 2003), *Ximenia americana* (Koné et al., 2004), *Guazuma ulmifolia* (Caceres et al., 1993).

A utilização dessa alternativa terapêutica por criadores e veterinários tem sido descrita, sendo os mesmos administrados aos animais em forma de soluções e pomadas para uso local ou administração de plantas verdes ou secas via oral (Schuch et al., 2008). Fernandes et al. (2005) verificaram atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *G. ulmifolia* e *H. courbaril* frente *E. coli*.

Sendo assim esse trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato etanólico de seis plantas pertencentes à flora nordestina (bioma caatinga) frente a bacilos gram negativos isolados da mucosa cérvico-vaginal de ovelhas mestiças criadas na região de Petrolina – PE.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina – PE.

2.1. Coleta do material vegetal

As espécies vegetais selecionadas foram: *Encholirium spectabile* Mart. Ex Schult. f. (6443), *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A.C.Smith (5545) *Bromelia laciniosa* Mart. Ex Schult. f. (6442) e *Hymenaea martiana* Hayne (6444), *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (6440) e *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez (6441). O material vegetal foi identificado por um botânico sendo as exsicatas das espécies depositadas no Herbário da Universidade Federal do Vale do São Francisco (HVASF).

2.2. Processamento do material vegetal

O material vegetal foi dessecado em estufa com circulação forçada à temperatura média de 40°C durante três dias. Após a secagem e completa estabilização (eliminação de água, inativação de enzimas, etc.) o material foi processado em moinho, obtendo-se um material vegetal seco e pulverizado.

2.3. Obtenção do Extrato Etanólico Bruto

O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração exaustiva com etanol 95% em um recipiente de aço inoxidável. Foram feitas várias extrações num intervalo de 72 horas entre cada extração até completo esgotamento do material vegetal. A solução extrativa obtida passou por um processo de destilação do solvente em evaporador rotativo à pressão reduzida a uma temperatura média de 50 °C. Após este processo de evaporação do solvente, obteve-se o extrato etanólico bruto.

2.4. Testes de sensibilidade aos extratos etanólicos

Foram utilizados 43 isolados, sendo distribuídos da seguinte forma: 14 *E. coli*, 10 *Enterobacter* spp., 10 *Acinetobacter* spp. e 9 *Klebsiella* spp. obtidos da mucosa cérvico-

vaginal de ovelhas sadias, não-prenhes pertencentes aos rebanhos do município de Petrolina e região. Foram testados 0,25 g de cada extrato etanólico, os quais foram diluídos em água destilada estéril e álcool absoluto, sendo utilizados 10 mL em ambos os diluentes, obtendo-se uma solução estoque na concentração de 25 mg/mL. A microdiluição, baseada no documento M7-A7 (CLSI, 2006), consistiu na distribuição de 200 µL de caldo Muller-Hinton em placas de microtitulação; a seguir, 200 µL da solução estoque do extrato eram acrescentados ao primeiro poço e, após homogeneização, transferia-se para o segundo e assim sucessivamente, sendo obtidas as seguintes concentrações finais: 12.500; 6.250; 3.125; 1.562,5; 781,3; 390,6; 195,3 e 97,6 µg/mL.

Na preparação do inóculo foi utilizado cultivo bacteriano em Ágar Muller-Hinton, para obtenção de uma suspensão bacteriana com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland. Desta suspensão, foi inoculado 10 µL nos poços das microplacas contendo a diluição do extrato etanólico. O material foi incubado a 37 °C por 24h em condições de aerobiose. De todos os poços retirou-se uma alíquota de 10 µl, semeando-se na superfície de ágar MH e incubando por 24 horas a 37 °C. A concentração bactericida mínima (CBM) foi definida como a menor concentração do extrato etanólico em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Para os extratos diluídos em álcool, além do controle positivo e negativo, foi realizada a diluição do etanol absoluto sem os extratos, sendo consideradas as CBM dos extratos, quanto menores que aquelas obtidas para o etanol absoluto. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5. Análise estatística

O delineamento utilizado foi do tipo inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 2 gêneros bacterianos x 6 (extratos etanólicos vegetais), em 6 repetições para a diluição em água enquanto para a diluição em alcóol em arranjo de 4 gêneros x 6 (extratos etanólicos) em

18 repetições. Avaliou-se o efeito dos isolados, dos extratos e a interação entre estes fatores, e os tratamentos que apresentaram significância foram comparados pelo teste de Tukey a 5%.

3. RESULTADOS

As atividades antimicrobianas dos extratos etanólicos de plantas diluídos em água estão dispostas na tabela 1. O gênero *Klebsiella* apresentou resposta somente às espécies *Bromélia laciniosa*, *Selaginella convoluta* e *Hymenaea martiana*, respectivamente com as seguintes médias para CBM: 6.250 µg/mL, 4.167 µg/mL e 12.500 µg/mL. Todos os extratos testados apresentaram atividade inibitória frente à *Acinetobacter* spp., obtendo as seguintes médias para CBM: 10.417 µg/mL (*E. spectabile*), 8.333 µg/mL (*B. laciniosa*), 6.250 µg/mL (*N. variegata*), 9.375 µg/mL (*A. cearensis*), 1.042 µg/mL (*H. martiana*) e 2.604 µg/mL (*S. convoluta*).

Quanto ao percentual de atividade, a *H. martiana* apresentou a maior atividade entre as espécies de plantas testadas, inibindo 70% (7/10) dos isolados de *Acinetobacter* spp., enquanto que no gênero *Klebsiella* a espécie de maior atividade foi a *S. convoluta*, que inibiu 20% (2/10) dos isolados. O gênero *Enterobacter* spp. e os isolados de *E. coli* não apresentaram sensibilidade a nenhum dos extratos testados.

Todos os extratos etanólicos quando diluídos em álcool apresentaram atividade antimicrobiana perante os isolados avaliados, porém não demonstraram diferença estatística entre eles. As menores médias de CBM foram observadas no gênero *Acinetobacter* spp. e foram propiciadas pelos extratos de *N. variegata*, *A. cearensis*, *H. martiana* e *S. convoluta*, com um valor de 1.302 µg/mL (Tabela 2). *Enterobacter* spp. apresentou os melhores resultados com valores médios de CBM de 520,83 µg/mL e 390,6 µg/mL, respectivamente para *N. variegata* e *A. cearensis*. *E. coli* apresentou a média de CBM de 1.302 µg/mL para todos os extratos testados. Os extratos de *H. martiana* e *A. cearensis* foram os extratos que

apresentaram melhores resultados de CBM para o gênero *Klebsiella* spp. com médias de 954,9 µg/mL e 911,4 µg/mL respectivamente.

Tabela 1. Concentração Bactericida Mínima dos extratos etanólicos de plantas do bioma caatinga diluídos em água frente a bactérias gram negativas obtidas da microbiota cérvico-

Família/Espécie	Gêneros Bacterianos			
	Concentração Bactericida Mínima Médias (µg/mL)			
	<i>E.coli</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp
Bromeliaceae				
<i>Encholirium spectabile</i>	S/A	S/A	10.417 ^a	S/A
<i>Bromelia laciniosa</i>	S/A	S/A	8.333 ^{ab}	6.250 ^b
<i>Neoglaziovia variegata</i>	S/A	S/A	6.250 ^{abc}	S/A
Fabaceae				
<i>Amburana cearensis</i>	S/A	S/A	9.375 ^{ab}	S/A
Caesalpinaceae				
<i>Hymenaea martiana</i>	S/A	S/A	1.042 ^c	4.167 ^b
Selaginellaceae				
<i>Selaginella convoluta</i>	S/A	S/A	2.604 ^{bc}	12.500 ^a

vaginal de ovelhas

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey.

S/A= sem atividade

Tabela 2. Concentração Bactericida Mínima dos extratos etanólicos de plantas do bioma caatinga diluídas em álcool frente a bactérias gram negativas obtidas da microbiota cervico-vaginal de ovelhas.

Família/Espécie	Gêneros Bacterianos			
	Concentração Bactericida Mínima Médias (µg/mL)			
	<i>E.coli</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp
Bromeliaceae				
<i>Encholirium spectabile</i>	1.302,1	585,9	1.563	1.041,7
<i>Bromelia laciniosa</i>	1.302,1	781,3	1.475,7	1.041,7
<i>Neoglaziovia variegata</i>	1.302,1	520,8	1.302,1	1.041,7
Fabaceae				
<i>Amburana cearensis</i>	1.302,1	390,6	1.302,1	911,4
Caesalpinaceae				
<i>Hymenaea martiana</i>	1.302,1	542,5	1.302,1	954,9
Selaginellaceae				
<i>Selaginella convoluta</i>	1.302,1	781,3	1.302,1	1.041,7

4. DISCUSSÃO

Os extratos etanólicos das plantas, quando diluídos em água apresentaram baixa atividade antimicrobiana frente às bactérias gram negativas testadas. Microrganismos dessa natureza possuem uma parede celular quimicamente mais complexa que os demais, podendo não ser atingida pelos ativos das plantas que foram extraídos pela água (Quinn et al. 2005). Resultados semelhantes foram relatados por Souza et al. (2004), que de dezoito plantas testadas nenhuma apresentou atividade contra *E. coli*. Entretanto, Bravo et al. (1999), avaliando substâncias bioativas presentes em *A. cearensis* encontraram atividade biológica contra *E. coli* isolada de humanos. A atividade antibacteriana de extratos de plantas frente ao gênero *Acinetobacter* spp. já foram relatadas (Borges et al. 2007). Manetti et al. (2009) relatam diferentes classes de substâncias bioativas nas espécies da família Bromeliaceae, entre eles triterpenos, esteróides, flavonóides e gliceróis. Entretanto, do ponto de vista farmacológico, existem poucos estudos disponíveis. A atividade inibitória das plantas testadas sugere a presença de substâncias ativas contra microrganismos, porém estudos devem ser implantados a fim de identificá-las. Pesquisas desenvolvidas com *A. cearensis* revelaram a presença de flavonóides e cumarinas, compostos tidos como responsáveis pela ação farmacológica da planta (Canuto e Silveira, 2006).

A melhor média de CBM, no extrato diluído em água, foi propiciada pela *H. martiana* tanto para *Klebsiella* spp. como para *Acinetobacter* spp.. Nogueira et al. (2001) em estudos fitoquímicos dessa espécie de planta verificaram a presença de diterpenos nas cascas e na resina exsudada do tronco, sendo estes considerados protetores contra infecções (Robbers et al., 1997). O gênero *Hymenaea* tem sido um dos mais estudados do ponto de vista antibacteriano, sendo relatada a presença de substâncias ativas como oligopolissacarídeos e polissacarídeos (Valentim, 2006). Sua utilização na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades é demonstrada em alguns artigos, tanto para uso humano (Silva &

Albuquerque, 2005) como animal (Rochfort, 2008). Fernandes et al. (2005) avaliando a atividade antimicrobiana de plantas, entre elas *H. courbaril*, com o extrato diluído em água destilada estéril, verificaram atividade inibitória perante *E. coli*, não corroborando com os achados deste estudo.

Todos os extratos testados, quando diluídos em álcool, demonstraram atividade inibitória, sugerindo que alguns compostos com ação antibacteriana foram extraídos pelo álcool e não pela água. Silva et al.(2009) avaliando a atividade antibacteriana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. diluído em álcool absoluto verificaram inibição do mesmo perante *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella* spp. Girolometto et al. (2009) avaliando diferentes métodos para extração de princípios ativos da *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. (erva mate), verificaram que, independente da bactéria testada, a alcoolatura (folhas verdes em etanol absoluto) apresentou melhor atividade antibacteriana. Souza & Conceição (2007) verificaram que soluções alcoólicas de *Rosmarinus officinalis* L. de 1 e 3% apresentaram atividade perante bactérias gram positivas mas não contra *E. coli* em ambas as concentrações. A atividade antibacteriana propiciada pelo extrato hidroalcoólico de *Syzygium cumini* (L.) Skells a 10%, avaliada por Loguercio et al. (2005), não apresentou diferença de sensibilidade entre microrganismos gram positivos e gram negativos. O autor relaciona ainda a atividade antimicrobiana à presença de grande quantidade de taninos na planta. Segundo Scalbert et al. (1991) pressupõe-se que os taninos inibem enzimas bacterianas e agem sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo.

O estudo do potencial antimicrobiano de plantas pertencentes à flora nordestina é de grande importância, pois estes estudos servirão como base para produção de fitoterápicos. Pesquisas referentes à utilização de plantas em Medicina Veterinária revelaram o uso de inúmeras espécies na terapêutica dos animais domésticos (Marinho et al., 2007). Esclarecimentos a criadores e veterinários com relação à utilização dessa alternativa se

tornam pertinentes, já que se trata de uma opção de baixo custo e alta disponibilidade (Marinho et al., 2007).

5. CONCLUSÕES

Os extratos etanólicos quando diluídos em álcool apresentaram melhor atividade bacteriana frente às bactérias gram negativas. Entretanto, pesquisas referentes a fatores como toxicidade, em virtude da utilização desse diluente devem ser consideradas. Na diluição aquosa, as espécies *H. martiana* e *A. cearensis* apresentaram maior atividade antibacteriana, demonstrando o potencial de utilização dessas plantas para o desenvolvimento de fitoterápicos.

6. REFERÊNCIAS

- Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Bras. de Farmacognosia*, 18(3): 472-508.
- Aiello, S. E. (Ed.). *Manual Merck de Veterinária*. 8. ed. São Paulo: Roca, 2001. 1861 p.
- Albuquerque, U.P., Andrade, L.H.C., Silva, A.C.O. 2005. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). *Acta bot. bras.* 19(1): 27-38.
- Andrade, J.R.A., Silva, N., Silveira, W., Teixeira, M.C.C. 2005. Estudo epidemiológico de problemas reprodutivos em rebanhos bovinos na bacia leiteira de Goiânia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 57(6): 720-725.
- Araújo, C.W.G.; Peixoto-Neto, P.A.S.; Campos, N.V.C.; Porfírio, Z.; Caetano, L.C. 2002. Antimicrobial activity of *Pithecolobium avaremotemo* Bark. *Fitoterapia*, 73, 7/8: 698-700.
- Borges, L.R.; Astolfi, V.; Mossi, A.J.; Cansian, R.L. Determinação de atividades biológicas em extratos de carqueja (*Baccharis trimera* (LESS) D.C). Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG.
- Bravo, J.A.; Sauvain, M.; Gimenez, A.; Munoz, V.; Callapa, J.; Le Men-Oliver, L.; Massiot, G.; Lavaud, C. 1999. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry*, 50(1): 71-74.
- Caceres, A., Fletes, L., Aguilar, L., Ramirez, O., Figueroa, L., Taracena, A.M., Samayoa, B. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol.* 38: 31-38.

- Canuto, K.M., Silveira, E.R., 2006. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* A.C. SMITH. *Quím. Nova.* 29(6), 1241-1243.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement, document M100-S16. Wayne, PA, USA: CLSI.
- Fernandes, T.T., Santos, A.T.F., Pimenta, F.C., 2005. Atividade antimicrobiana das plantas – *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Rev. de Pat. Trop.* 34(2): 113-122.
- Forar, A. L.; Gay, J. M.; Hancock, D. D. 1995. The frequency of endemic fetal loss in dairy cattle: a review. *Theriogenology.* 43, 989:1000.
- Girolometto, G., Avancini, C.A.M., Carvalho, H.H.C., Wiest, J.M. 2009. Atividade antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). *Rev. Bras. Pl. Med.* 11(1): 49-55.
- Iwu, M.M., Ezeugwu, C.O., Okungi, C.O., Sanson, D.R., Tempesta, M.S. 1990. Antimicrobial activity and terpenoids of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Int. J. Crude Drug. Res.*, 28(1): 73-76.
- Kloucek, P., Polesny, Z., Svobodova, B., Vlkova, E., Kokoska, L. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *J. Ethnopharmacol.*, 99(2): 309-312.
- Koné, W.M., Atindehou, K.K., Tereaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D., Dosso, M. 2004. Traditional medicine in North Cote d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 93: 43-49.
- Husted, J.R. 2003. *Bacterial and fungal organisms in the vagina of normal cows and cows with vaginitis*. Dissertação de mestrado. Texas A & M University: Veterinary Microbiology, 29p
- Loguercio, A.P., Battistin, A., Vargas, A.C., Henzel, A., Witt, N.M. 2005. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural*, Santa Maria, 35(2):371-376.
- Manetti, L.M., Delaporte, R.H., Javerde Junior, A., 2009. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. *Quím. Nova.* 15, 1-13.
- Marinho, M.L., Alves, M.S., Rodrigues, M.L.C., Rotondano, T.E.F., Vidal, I.F., Silva, W.W., Athayde, A.C.R., 2007. A utilização de plantas medicinais em Medicina Veterinária. *Rev. Bras. Pl. Med.* 9(3), 64-69.

- Martins G., Figueira L., Penna B., Brandão F., Vargas R., Vasconcelos C., Lilenbaum W. 2009. Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progestin-impregnated intravaginal sponges. *Small Ruminant Research*, 81:182-184.
- McChesney, J.D., Clark, A.M., Silveira, A.R. 1991. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*. *Journal of Nature Product*, 54(6): 1625-1633.
- Nogueira, R.T., Shepherd, G.J., Laverde Jr., A., Marsaioli, A.J., Imamura, P.M. 2001. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *Stilbocarpa*. *Phytochemistry*, 58:1153–1157.
- Paiva, S.R., Figueiredo, M.R., Aragão, T.V., Kaplan, M.A. 2003. Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98(7): 959-961.
- Peixoto-Neto, P.A.S, Silva, M.V., Campos, N.V.C., Porfírio, C.Z., Caetano, L.C. 2002. Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. *Fitoterapia*, 73(6): 529-531.
- Quinn, P.J.; Markey, B.K.; Carter, M.E.; Donnelly, W.J.; Leonard, F.C. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto alegre, Artmed, 2005, 512p.
- Robbers, J.E, Speedie, M.K, Tyler, V.E., 1997. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. Premier, São Paulo, 372p.
- Rocha, A.A., Gambarini, M.L. Andrade, M.A., Filho, B.D.O., Gomes, F.A. 2004. Microbiota cérvico-vaginal durante o final de gestação e puerpério em vacas girolando. *Ciência Animal Brasileira*, 5(4): 215-220.
- Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R., 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*. 69: 299-322.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, Chichester, 30(12): 3875-3883.
- Schuch, L.F.D., Wiest, J.M., Coimbra, H.S., Prestes, L.S., De Toni, L., Lemos, J.S. 2008. Cinética da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. *Ciência Animal Brasileira*, 9(1): 161-169.
- Silva, A.C.O. Albuquerque, U.P. 2005. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). *Acta bot. bras.* 19(1): 17-26.
- Silva, A.B., Teixeira, L.M., Galdino, R.M.N. 2009. Atividade antibacteriana in vitro do extrato hidroalcoólico de *Anacardium occidentale* Linn. Disponível em:

www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0177-1.pdf acesso em 23 de abril 2010.

- Souza, G.C., Haas, A.P., Von Poser, G.L., Schapoval, E.E., Elisabetsky, E. 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol* 90: 135–143.
- Sousa, T.M.P., Conceição, D.M. 2007. Atividade antibacteriana do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). *Revista de Ciências Veterinárias*, 5: 7-13.
- Valentim, A.P.T. 2006. *Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne (jatobá). Dissertação de Mestrado em biotecnologia de produtos bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. 100p.
- Verma, H.K., Sharma, D.K., Kaur, H., Dhablana, D.C. 1994. A bacteriological study of repeat breeders cows and their treatment. *Indian Veterinary Journal*, 47(6): 467-470.

Considerações finais

- Microrganismos oportunistas de potencial patogênico como *Staphylococcus* spp. e *E. coli*, estão presentes na microbiota cérvico-vaginal de ovelhas criadas na região de Petrolina. Esse conhecimento permite um melhor direcionamento diagnóstico e terapêutico de infecções do trato reprodutivo.
- As bactérias isoladas neste estudo são sensíveis a diversos grupos antimicrobianos, demonstrando o potencial destes para utilização na região.
- Alguns gêneros bacterianos constituintes da microbiota de ovelhas apresentam sensibilidade aos extratos etanólicos vegetais, confirmando dessa forma, o grande potencial de utilização de plantas pertencentes à flora do bioma caatinga. Entretanto pesquisas *in vivo* devem ser instituídas a fim de considerar a farmacodinâmica dos compostos.
- Apesar da grande disponibilidade das plantas na região, fatores como a exploração sustentável dessas espécies devem ser consideradas, caso sejam utilizadas para o desenvolvimento de fitoterápicos em grande escala.