



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

Jamille Cristina Pereira Cordeiro

**Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e
formação de biofilme pelos isolados de *Salmonella*
spp. provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São
Francisco**

Petrolina - PE
2014

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

Jamille Cristina Pereira Cordeiro

**Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e
formação de biofilme pelos isolados de *Salmonella*
spp. provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São
Francisco**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco, UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Petrolina – PE
2014

C794a	<p>Cordeiro, Jamille Cristina Pereira</p> <p>Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e formação de biofilme pelos isolados de <i>Salmonella</i> spp. provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco /Jamille Cristina Pereira Cordeiro. -- Petrolina, 2014. xi; 70f.: il. 29 cm.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina, 2014.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa.</p> <p>1. Plantas Medicinais. 2. Alternativas antimicrobianas. 3. Isolados Bacterianos. 4. Plantas da Caatinga I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.</p> <p style="text-align: center;">CDD 632.32</p>
-------	---

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

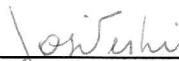
Jamille Cristina Pereira Cordeiro

**Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais e
Formação de Biofilme pelos isolados de *Salmonella*
spp. provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São
Francisco**

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



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



Dra. Josir Laine Aparecida Veschi
Embrapa Semiárido



Profª. Dra. Mércia Rodrigues Barros
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Petrolina, 24 de março de 2014.

Dedico ao meu maior Mestre, conselheiro,
amigo e minha inspiração diária,
meu pai: Joaquim Pereira Neto.
Você é o mentor desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado, guiando meus passos pelos melhores caminhos e me dando sabedoria e paciência para transpor os obstáculos.

Ao Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa, pela orientação, confiança, compreensão, apoio, ensinamentos e todo investimento intelectual.

A Maria da Conceição “Ceixa”, pelo apoio com palavras confortantes, otimistas, auxílio nas dúvidas e acima de tudo pela amizade.

Aos meus pais, Joaquim e Cida pelo amor incondicional, compreensão e incentivo aos meus sonhos e ideais.

A minha irmã, Amanda pela ajuda fundamental neste trabalho e companhia até altas horas no laboratório.

A René, meu companheiro, pela compreensão, por me ouvir nos momentos difíceis e me dar apoio e amor sempre. Te amo !

A René Neto, meu filho amado, pelo carinho e amor verdadeiro. Você é a razão das minhas lutas, conquistas e a maior alegria em nossas vidas. Te amo muito.

Aos meus familiares, pelo carinho, a família Costa, aos meus avós Luiz e Maria Odete “Vó Morena” pelas orações, a família Cordeiro, em especial a Dona Alice *in memorian*, e a família Pereira, ao meu avô Antônio Pereira “Pereirinha” *in memorian*.

Aos amigos e professores, José Alves e Jaciane Campelo, pela colaboração, palavra amiga, incentivo e pelas belas imagens que vieram a engrandecer esta dissertação.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Univasf: Carina, Carol, Evandro, Gisele, Isamara, Izabela, Jennifer, Jusciene, Mariana, Naedja, Naiane, Renata, Renilde, Ruan (pelas risadas), Samilly, Samira, Thais, Uirá, Valdenice, Werônica, Wilton, em especial a Rafael Libório pelo apoio durante o mestrado.

Aos estagiários e aos bolsistas de iniciação científica júnior, pela colaboração.

Aos colegas da pós-graduação, em especial a Maíra e Grace.

A Milka Carvalho de Azevedo, pelos isolados de *Salmonella* e atenção.

Aos professores, Jackson Guedes e Xirley Nunes pela concessão dos extratos vegetais.

Aos professores da pós-graduação em Ciência Animal, pelos conhecimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pela oportunidade. A Rosangela Fonseca "Rosinha", pela recepção calorosa, disposição, ajuda e seu bom humor.

À CAPES pela concessão da bolsa de pós-graduação, em nome do Prof. Lêucio Câmara Alves da UFRPE.

Aos funcionários do *Campus* de Ciências Agrárias da UNIVASF.

A todos, muito obrigada!

“O homem não teria alcançado o possível, se inúmeras vezes
não tivesse tentado **atingir o impossível**”

Max Weber

RESUMO

A atividade antimicrobiana de plantas medicinais frente a isolados de *Salmonella* spp. tem sido bastante pesquisada, com o intuito de caracterizar as plantas como alternativa na terapia, devido principalmente ao surgimento de cepas bacterianas resistentes a vários antibióticos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de (Caroá) *Neoglaziovia variegata*; (Amburana) *Amburana cearensis*; (Jatobá) *Hymenaea martiana*; (Jurema-preta) *Mimosa tenuiflora*; (Angico-de-bezerro) *Pityrocarpa moniliformis* e (Pereiro-de-tinta) *Simira gardneriana* e quantificar a formação de biofilme frente a isolados de *Salmonella* spp. obtidos de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco. Foram utilizados 60 isolados bacterianos de *Salmonella* spp., sendo que destes 30 eram provenientes de fezes de caprinos e 30 de ovinos. A ação antibacteriana foi avaliada através da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos alcoólicos sobre as cepas bacterianas, sendo utilizado o método de diluição em microplacas. A determinação da formação do biofilme foi realizada utilizando o cristal violeta e com base na densidade óptica produzida pelos biofilmes, as estirpes bacterianas foram classificadas. Os extratos de *N. variegata*, *H. martiana*, *S. gardneriana* independente da concentração, não inibiram o crescimento dos isolados de *Salmonella* spp. utilizados no presente estudo. O extrato de *A. cearensis* apresentou ação inibitória nas concentrações de 12.500 µg/mL e 6.250 µg/mL em quatro isolados, três provenientes de caprinos e um de ovino. O extrato de *M. tenuiflora* apresentou ação antimicrobiana em todos os 60 isolados de *Salmonella* com valor de CBM: 781,3 µg/mL. O extrato de *P. moniliformis* também apresentou ação antimicrobiana em todos os isolados estudados, com CBM: 1.562,5 µg/mL. Os extratos de *A. cearensis* e *M. tenuiflora* e *P. moniliformis* possuíram atividade antimicrobiana, enquanto que os extratos de *N. variegata* e *H. martiana* não apresentaram ação antimicrobiana sobre as bactérias pesquisadas. Os isolados também foram classificados em dois grupos: Fraca Produção de Biofilme (FPB) e Moderada Produção de Biofilme (MPB). Os 11 isolados de *Salmonella* spp. com Moderada Produção de Biofilme tratados com os extratos de *Mimosa tenuiflora* e *Pityrocarpa moniliformis* apresentaram redução no Biofilme em formação, diminuição na medida de densidade óptica, sendo reclassificados em fraco e não produtores de biofilme. Estes achados indicam o potencial de plantas do bioma Caatinga no controle de patógenos como *Salmonella* spp. obtidos de caprinos e ovinos, o que representa um reflexo positivo sobre a produção animal no Vale do São Francisco e Saúde Pública.

Palavras-chave: Plantas Medicinais. Alternativas Antimicrobianas. Isolados Bacterianos.

ABSTRACT

The antimicrobial activity of medicinal plants against isolates of *Salmonella* spp. has been extensively investigated in order to characterize the plants as an alternative therapy, mainly due to the emergence of multiple antibiotic resistant bacterial strains. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of the extracts (Caroá) *Neoglaziovia variegata*; (Amburana) *Amburana cearensis*; (Jatobá) *Hymenaea martiana*; (Jurema-preta) *Mimosa tenuiflora*; (Angico-de-bezerro) *Pityrocarpa moniliformis* and (Pereiro-de-tinta) *Simira gardneriana* and quantify biofilm formation against *Salmonella* isolates obtained from goats and sheep Valley San Francisco. A total of 60 bacterial isolates of *Salmonella* spp., and of these 30 were from feces of goats and 30 sheep. The antibacterial activity was evaluated by the minimum bactericidal concentration (MBC) of the ethanolic extracts of the bacterial strains, by using the microplate dilution method. The determination of biofilm formation was performed using the crystal violet, based on O.D produced by the biofilms, the bacterial strains were classified. Extracts of *N. variegata*, *H. Martiana*, *S. gardneriana* independent of concentration, did not inhibit the growth of *Salmonella* isolates surveyed. The extract of *A. cearensis* showed inhibitory activity at concentrations of 12.500 mg/ mL and 6.250 mg / mL for 4 isolates, 3 from goats and 1 from sheep. The extract of *M. tenuiflora* showed antimicrobial action in all 60 *Salmonella* isolates with MBC value: 781.3 mg/ mL. The extract of *P. moniliformes* also showed antimicrobial activity in all isolates studied, with MBC: 1,562.5 g / mL. The extracts of *A. cearensis* e *M. tenuiflora* e *P. moniliformes* showed antimicrobial activity, while extracts of *N. variegata* e *H. martiana* does not have an antimicrobial action against the bacteria studied. The 60 *Salmonella* were classified into two groups: Weak Production of Biofilm and Moderate Production of Biofilm. The 11 *Salmonella* isolates with Moderate Production of Biofilm treated with the extracts of *Mimosa tenuiflora* and *Pityrocarpa moniliformis* showed action on Biofilm formation, decrease the measure of optical density, being reclassified as weak and biofilm non-producers. These findings indicate the potential of plants of Caatinga to control pathogens such as *Salmonella* spp. obtained from goats and sheep, which is a positive reflection on animal production in the São Francisco Valley and Public Health.

Keywords: Medicinal Plants. Alternative Antimicrobial. Bacterial Isolates.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - *Hymenaea martiana* Hayne – Jatobá..... p.27
- Figura 2** - *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. Amburana..... p.28
- Figura 3** - *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez – Caroá p.29
- Figura 4** - *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. – Jurema-preta..... p.31
- Figura 5** - *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH.) LUCKOW & R. W. JOBSON – Angico de bezerro..... p.33
- Figura 6** - *Simira gardneriana* M.R.V. Barbosa & Peixoto – Pereiro-de-Tinta p.34
- Figura 7** - Frequência de ação antimicrobiana de acordo com o extrato e concentrações utilizadas, (1): 12.500 µg/mL; (2): 6.250 µg/mL; (3): 3.125 µg/mL; (4): 1.562,5 µg/mL; (5): 781,3 µg/mL; (6): 390,6 µg/mL; (7): 195,3 µg/mL e (8): 97,6 µg/mL e os extratos: 1 - *M. tenuiflora* (Jurema-preta), 2- *P. moniliformes* (Angico-de-bezerro) e 3- *A. cearenses* (Amburana).....p. 42
- Figura 8** - Probabilidade de ação antimicrobiana dos extratos 1- *M. tenuiflora* (Jurema-preta), 2- *P. moniliformes* (Angico-de-bezerro), 3- *A. cearenses* (Amburana), em função das concentrações testadas.....p. 45
- Figura 9** - Probabilidade de ação antimicrobiana em função das concentrações testadas no estudo de acordo com a fonte/origem dos isolados. (1): Ovino, (2): Caprino e (3) Bactéria de referência – ATCC..... p. 46
- Figura 10** - Reclassificação dos isolados após tratamento com os extratos (1- *M. tenuiflora*, 2- *P. moniliformes*) sobre o Biofilme em Formação. (FPB) Fraca Produção de Biofilme e (NPB) Não Produtora de Biofilme.....p. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análises das Estimativas de Máxima Verossimilhança..... p.43

Tabela 2: Análises das Estimativas de Máxima Verossimilhança para regressão logística múltipla de efeitos individuais e interação entre as variáveis p.44

Tabela 3: Número de isolados de *Salmonella* spp. e suas classificações de acordo com a produção de biofilme..... p.46

Tabela 4: Análise de variância dos isolados quanto a produção de biofilme..... p.47

Tabela 5: Análise de variância de classificação hierárquica (biofilme consolidado)..... p.48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BV/BPLS	Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose
CBM	Contagem Bactericida Mínima
CIM	Contagem Inibitória Mínima
DCLS	Deoxicolato Citrato Lactose Sacarose
D.O	Densidade Óptica
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
FoPB	Forte Produção de Biofilme
FPB	Fraca Produção de Biofilme
MH	Mueller-Hinton
MPB	Moderada Produção de Biofilme
NPB	Não Produtora de Biofilme
PROB	Probabilidade
pH	Potencial Hidrogeniônico
RV	Rappaport- Vassiliadis
SS	Salmonella-Shigella
TSA	Triptona Soja Ágar
TSB	Peptona Caseína Soja
XLD	Xilose Lisina Deoxicolato

LISTA DE SÍMBOLOS

g	grama
h	Hora
m	Metro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μg	micrograma
μl	microlitro

SUMÁRIO

	RESUMO	08
	ABSTRACT.....	09
	LISTA DE FIGURAS.....	10
	LISTA DE TABELAS.....	11
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
	LISTA DE SIMBOLOS.....	13
1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Gênero <i>Salmonella</i>	18
2.2	Salmonelose em Pequenos Ruminantes.....	19
2.3	Formação de Biofilme por <i>Salmonella</i> spp.....	21
2.4	Resistência aos Antimicrobianos.....	23
2.5	Plantas Medicinais - Antimicrobianos Alternativos.....	24
2.6	<i>Hymenaea martiana</i> Hayne - Jatobá.....	26
2.7	<i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C. Sm. – Amburana.....	27
2.8	<i>Neoglaziovia variegata</i> (Arruda) Mez – Caroá.....	29
2.9	<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir. – Jurema-preta.....	30
2.10	<i>Pityrocarpa moniliformis</i> (BENTH.) LUCKOW & R. W. JOBSON – Angico-de-bezerro.....	32
2.11	<i>Simira gardneriana</i> M.R.V. Barbosa & Peixoto – Pereiro-de-Tinta.....	33
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo Geral.....	35
3.2	Objetivos Específicos.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	Local de Estudo.....	36
4.2	Isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	36

4.3	Material Vegetal.....	36
4.4	Extratos Vegetais.....	37
4.5	Verificação da Qualidade Microbiológica dos Extratos.....	37
4.6	Bioensaio da Atividade Antibacteriana <i>in vitro</i>	38
4.7	Quantificação de Biofilme para <i>Salmonella</i> spp.....	39
4.8	Interação do Extrato com o Biofilme Consolidado.....	40
4.8.1	Interação do Extrato com o Biofilme em Formação.....	40
4.9	Análise Estatística.....	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Bioensaio da Atividade Antibacteriana <i>in vitro</i>	42
5.1.2	Bioensaio da Atividade Antibacteriana <i>in vitro</i> - Método de Regressão Múltipla (Backward).....	43
5.1.2. 1	Análise da Significância Individual.....	43
5.1.2. 2	Análise da Significância Interação.....	44
5.1.3	Bioensaio da Atividade Antibacteriana <i>in vitro</i> - Método de regressão logística múltipla de efeitos individuais e interação entre as variáveis.....	44
5.1.3 .1	Análise Gráfica das Interações.....	45
5.2	Quantificação de Biofilme para <i>Salmonella</i> spp.....	46
6.2. 1	Interação do Extrato com o Biofilme em Formação.....	47
5.2. 2	Interação do Extrato com o Biofilme Consolidado.....	48
6	DISCUSSÃO.....	49
6.1	Bioensaio da Atividade Antibacteriana <i>in vitro</i>	49
6.2	Quantificação de Biofilme para <i>Salmonella</i> spp. e Interação do Extrato com o Biofilme em Formação e Consolidado.....	52
7	CONCLUSÃO.....	54
8	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

A criação de caprinos e ovinos vêm se destacando no cenário do agronegócio brasileiro. São estimados 14 milhões de animais, os quais estão distribuídos em 436 mil estabelecimentos agropecuários. Na região Nordeste encontra-se a maior parte do rebanho caprino, compreendendo os estados da Bahia, Pernambuco, Piauí e Ceará. A ovinocultura tem maior representatividade nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2013).

As doenças de origem infecciosa e/ou parasitária constituem um sério entrave ao desenvolvimento da caprino-ovinocultura, pelas perdas na produção animal, com grande repercussão econômica. Nesse contexto, surgem as enfermidades causadas por bactérias, que representam uma ameaça ao desenvolvimento da caprino-ovinocultura brasileira (EMPARN, 2006).

O uso indiscriminado das drogas antimicrobianas na produção animal é comum, trazendo importantes impactos ao meio ambiente e a saúde humana (GOULD et al., 2010). Nos últimos anos, a resistência dos micro-organismos patogênicos a múltiplos fármacos tem aumentado devido uso indiscriminado de antimicrobianos em animais, como promotores de crescimento e no tratamento de doenças infecciosas (PAPHITOU, 2013; TOUTAIN e BOUSQUET-MELOU, 2013). Estas ações podem contribuir para o aumento da resistência aos antimicrobianos em seres humanos, bem como a presença destes resíduos na carne e derivados (FULLER, 1989).

O surgimento de micro-organismos resistentes a antimicrobianos demonstra que o tratamento dos animais não deve se basear no uso de antimicrobianos sem reflexão crítica. A multirresistência às drogas antimicrobianas em *Salmonella* spp. é um assunto de grande interesse a comunidade científica, visto seu potencial de transmissão aos seres humanos pelos alimentos (MOLLA et al., 2007). A formação de biofilme pelos micro-organismos é uma estratégia que contribui para reduzir a susceptibilidade aos antibióticos e desinfetantes, tornando a sua eliminação um grande desafio (MULCAHY, CHARRON-MAZENOD e LEWENZA, 2008; SIMÕES e VIEIRA, 2009).

Devido à crescente resistência microbiana aos fármacos, a busca de novos agentes antimicrobianos a partir de plantas é intensa (RADULOVIC et al., 2013), principalmente devido aos menores custos de pesquisa, provavelmente por apresentar menor risco de efeitos colaterais e um grande potencial de efeito sinérgico (SALEEM et al., 2010; VUUREN e VILJOEN, 2011).

Essa situação tem estimulado cada vez mais os pesquisadores, que buscam novos compostos em diferentes fontes. Os vegetais por terem potencial antimicrobiano e uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos químicos, tem se tornando um importante objeto de estudo científico com relação às suas variadas propriedades medicinais (NOVAIS et al., 2003). O interesse na diversidade molecular das plantas tem estimulado a busca pelo conhecimento do seu metabolismo secundário, o qual é responsável pela síntese de grande parte dos compostos vegetais com atividade biológica, bem como seus derivados que tem sido alvo de investigação a respeito de suas propriedades medicinais, aromáticas e curativas (ALVES, 2001).

A região Nordeste do Brasil abriga em seu ecossistema, uma grande biodiversidade, com um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas não encontradas em outras regiões do globo. Desta forma, diante do potencial botânico da Caatinga e da necessidade de se encontrar novos compostos capazes de controlar a ação de micro-organismos, buscou-se realizar um trabalho que viabilize um maior conhecimento das espécies existentes na região. Tendo em vista as infecções por *Salmonella* em pequenos ruminantes, a preocupação com a resistência aos antimicrobianos e a formação de biofilmes, por estas bactérias, torna-se de grande importância a realização deste estudo que vise avaliar a possível ação antimicrobiana dos extratos vegetais da Caatinga, (Caroá) *Neoglaziovia variegata*; (Amburana) *Amburana cearenses*; (Jatobá) *Hymenaea martiana*; (Jurema-preta) *Mimosa tenuiflora*; (Angico-de-bezerro) *Pityrocarpa moniliformis* e (Pereiro-de-tinta) *Simira gardneriana* sobre *Salmonella* spp.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2. 1 Gênero *Salmonella*

Salmonella é um gênero da família Enterobacteriaceae, definido como bastonetes gram-negativos, não esporogênicos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies, *Salmonella bongori* e *S. enterica*, sendo que a última inclui seis subespécies, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. enterica*, *S. houtenae*, *S. indica* e *S. salamae* (TINDALL et al., 2005). Existem no total 2.610 diferentes sorovares de *Salmonella*, das quais 1.547 pertencem ao grupo *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Essas bactérias estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser encontradas na água, frutas, grãos, flores, árvores e no trato gastrointestinal do homem e de vários mamíferos, além de répteis, aves e insetos (HOLT et al., 1994; CDC, 2002).

As colônias do gênero *Salmonella* em ágar sangue medem 1 a 3 mm após incubadas durante 24 horas a 37°C, variando muito na forma, podendo ser lisas, circulares, convexas e achatadas. Não são hemolíticas. Os meios seletivos de enriquecimento mais usados são caldo Selenito-cistina, que contém cistina para estimular o crescimento das Salmonelas; caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), que contém verde malaquita, cloreto de magnésio e um pH ligeiramente reduzido como fator seletivo; e o caldo Tetrionato Muller-Kauffman, contendo verde brilhante, tetrionato e bile. Já os meios seletivos sólidos mais usados são ágar Xilose Lisina Deoxicolato (XLD), ágar SS (Salmonella-Shigella), ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BV/BPLS), e o ágar Deoxicolato Citrato Lactose Sacarose (DCLS). No ágar MacConkey, as colônias se apresentam incolores, pois não fermentam a lactose, em 24 horas de incubação a 37°C (OLIVEIRA, 2012).

Em estudos realizados na Inglaterra, País de Gales e Austrália, a salmonelose é considerada como a principal doença transmitida por alimentos juntamente com a infecção pelo gênero *Campylobacter*. Nos Estados Unidos estima-se que o gênero *Salmonella* seja responsável por 11% (1,0 milhão) dos casos de doenças transmitidas por alimentos notificados, além de 35% dos

casos que resultam em hospitalização e 28% dos óbitos em decorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos - DTAs (SCALLAN et al., 2011).

No Brasil, segundo dados epidemiológicos da ANVISA o sorovar *S. enteritidis* possui a maior taxa de prevalência nos surtos de salmonelose em humanos (BRASIL, 2011), sendo o mesmo reportado pelo “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) em Atlanta e pelo Centro de Referência “Robert Koch Institute” na Alemanha (RABSCH et al., 2001).

O agente etiológico mais prevalente em surtos alimentares são *Salmonella* spp. seguido de *Staphylococcus aureus*. As regiões aonde mais ocorrem os surtos são a região sul e sudeste do Brasil com maior notificação de surtos alimentares, a região sul com 42,1%, sudeste com 37,3% e nordeste com 12%, no período de 2000 a 2011 (BRASIL, 2011). *Salmonella* é o principal agente identificado em DTAs, responsável por 19,16% dos casos entre 2000 a 2011, com 1660 casos confirmados (SVS, 2011). Em humanos as doenças mais comuns causadas por salmonelas são a febre tifóide e as gastroenterites (MADIGAN et al., 2010).

2. 2 Salmonelose em Pequenos Ruminantes

As infecções pelo gênero *Salmonella* em animais de produção estão associadas a uma grande variedade de manifestações clínicas entéricas e extra-entericas (RADOSTITS et al., 2007), com sinais clínicos e severidade variável, dependendo da faixa etária dos animais e principalmente pelos sorotipos envolvidos (UZZAU et al., 2001). Os sorovares *Abortusovis*, *Dublin* e *Typhimurium*, que estão associados com a doença em ovelhas (JACK , 1971).

Os caprinos e ovinos podem apresentar a salmonelose na forma subclínica ou latente, sendo apenas portadores de salmonelas (WOLDEMARIAN et al., 2005; MILNES et al., 2008; BONKE et al., 2012). Porém, fatores como estresse, transporte, superlotação, prenhez, temperatura ambiental extrema, privação de água podem ativar a doença para a forma clínica (QUINN et al., 2005), principalmente quando estão associadas a infecções intercorrentes e doenças secundárias e influenciadas pelo número de salmonelas ingeridas, da virulência do sorotipo e da suscetibilidade do hospedeiro, podendo levar a altas taxas de mortalidade em ovelhas,

associadas a retenção da placenta (UZZAU, BOSSI, FIGUEROA-BOSSI, 2002). A mortalidade dos animais decorrente de infecções por *Salmonella* geram grandes perdas econômicas, sendo o aborto um dos principais problemas na produção de pequenos ruminantes (RUSHTON, 2009).

Não existe um padrão de sinais clínicos característicos em rebanhos infectados por *Salmonella* spp. (SANDBERG et al., 2002). Porém, na salmonelose entérica aguda, comum em ovelhas adultas, é frequentemente observado nos animais: febre, anorexia, depressão e diarreia, enquanto que a septicemia é comum em animais jovens (SHARMA, et al., 2001; KUSILUKA, KAMBARAG, 1996).

O sorotipo *Abortusovis* pode levar à morte fetal, metrite, retenção de placenta, peritonite, sendo que as ovelhas infectadas podem apresentar febre, anorexia e depressão antes do aborto. Os sorotipos *Typhimurium* e *Dublin* também foram relatados, como causa de aborto, porém menos frequentes que os relatos por *Salmonella Abortusovis* (UZZAU et al., 2001; HABRUN, et al., 2006; JACK, 1968).

Os recém-nascidos morrem muitas vezes dentro de horas após o nascimento. Os cordeiros que sobrevivem por algumas semanas, podem manifestar poliartrite, pneumonia e diarreia severa. A infecção por *Salmonella Abortusovis* em ovelhas não prenhes e em carneiros é predominantemente assintomática, porém a sintomatologia venérea tem sido descrita, em alguns casos (UZZAU, BOSSI, FIGUEROA-BOSSI, 2002).

A prevalência de *Salmonella* entre pequenos ruminantes pode variar consideravelmente dependendo dos sorotipos, rebanhos e regiões geográficas. Surtos de *S. Abortusovis* em ovelhas foram relatados, na Suíça, em que as infecções pelo sorotipo *Abortusovis* contribuíram com até 70% de perdas no pós-parto entre 2003 e 2007 (BELLOY, 2009).

S. diarizonae é o agente causador da disenteria do inverno, uma doença comum em ovelhas, que também está associada à abortos e animais natimortos. A prevalência deste sorotipo em rebanhos ovinos da Noruega tem sido estimada em aproximadamente 12%, com a prevalência dentro do rebanho de 0-45% quando as amostras foram coletadas no matadouro e o estresse pode ter contribuído para o aumento da prevalência observada

(ALVSEIKE; SKJERVE, 2002). Segundo Edrington et al. (2009) a contaminação ambiental por *Salmonella* spp. é bastante elevada em fazendas. Estes autores relataram isolamento de *Salmonella* em 50% das amostras de lã, mas somente 7% nas amostras fecais coletadas de ovinos confinados nos EUA, indicando um importante papel de reservatórios ambientais.

2. 3 Formação de Biofilme por *Salmonella* spp.

O conhecimento sobre os biofilmes tem avançado, assim como as pesquisas que vêm sendo realizadas em muitas áreas relacionadas com a ecologia microbiana. A microbiologia moderna estuda os principais mecanismos fisiológicos e de controle entre as formas microbianas sésseis (biofilme) e planctônicas (livres) (CAPELLETI, 2006).

O biofilme microbiano é definido como uma associação de células bacterianas e fúngicas, fixadas às superfícies, bióticas ou abióticas, inclusas em uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas (LUCCHESI, 2006). Os biofilmes são constituídos tipicamente por água, micro-organismos, substâncias poliméricas extracelulares (EPS, *Extracellular Polymeric Substances*), substâncias dissolvidas, adsorvidas e partículas retidas (PEREIRA, 2001). Sendo as fímbrias e celulose os principais componentes da matriz em biofilmes de *Salmonella* spp. (COLLINSON et al., 1996).

A capacidade de um micro-organismo isolado em aderir ou não a uma superfície, formar ou se manter em biofilme está relacionada com o seu fenótipo e genótipo. Alguns aparatos celulares, quando presentes, como pili, flagelos e fímbrias, algumas proteínas da superfície, assim como sistemas *quorum sensing*, garantem um incontestável diferencial à bactéria, em nível de aderência e formação do biofilme (STOODLEY et al., 2002; BOARI, 2008).

Para ocorrer o desenvolvimento do biofilme, deve haver uma interação entre as células bacterianas, a superfície a qual elas vão se aderir e a composição do meio circundante (DAVEY e O'TOOLE, 2000; DONLAN, 2002; DUNNE, 2002; STOODLEY et al., 2002). As salmonelas conseguem formar biofilmes em várias superfícies abióticas, como plástico, borracha, cimento, vidro e aço inoxidável (JOSEPH et al., 2001; SOLANO et al., 2002; PROUTY e

GUNN, 2003; ARNOLD e YATES, 2009; HURRELL et al., 2009; MORETRO et al., 2009).

Diversos microrganismos podem participar de processos de adesão e gerar problemas de saúde pública e/ou de ordem econômica como: *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus sp.*, *Enterococcus faecium*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Alcaligenes* e *Flavobacterium* (CAIXETA, 2008; CAPELLETTI, 2006; LUCCHESI, 2006).

A formação do biofilme é uma estratégia dos micro-organismos para sua sobrevivência em ambientes com condições adversas (TRACHOO, 2003), podendo provocar uma alteração fenotípica de células planctônicas (vida livre) para a forma sésil. Células que crescem em biofilme expressam propriedades distintas das células planctônicas, uma destas é o aumento da resistência aos agentes antimicrobianos e biocidas (LECHEVALIER; CAWTHON; LEE, 1988; HOLAH et al., 1990; MOSTELLER; BISHOP, 1993; WALKER; ROGERS; KEEVIL, 1994; EGINTON et al., 1998; TRACHOO, 2003).

Esta resistência é, em parte, atribuída à matriz polimérica, pois parece funcionar como uma barreira protetora contra fatores agressivos externos, como os biocidas (PEREIRA, 2001). A elevada resistência de biofilmes bacterianos, pode ser explicada pela difusão limitada de agentes antimicrobianos por meio da matriz do biofilme, interações de agentes antimicrobianos com a matriz (células e polímeros), resistência mediada por enzimas, adaptação genética, níveis de atividade metabólica dentro do biofilme, e outros fatores inter-relacionados, como as barreiras de difusão, ultraestrutura da parede celular e atividade metabólica diferencial (CAIXETA, 2008).

Tal resistência gera um impacto negativo em várias atividades, podendo ocasionar perdas significativas nestas (SIMÕES, PEREIRA e VIEIRA, 2003). A formação da matriz pode atuar como um substrato para outros micro-organismos menos propensos a formação de biofilme, aumentando a probabilidade da sobrevivência destes e sua disseminação (LAPIDOT, ROMLING e YARON, 2006). A formação do biofilme pelas células bacterianas,

oferece tolerância ao estresse, contribuindo para reduzir a susceptibilidade aos antibióticos e desinfetantes, tornando a sua eliminação um grande desafio (MULCAHY, CHARRON-MAZENOD e LEWENZA, 2008; SIMÕES e VIEIRA, 2009).

2. 4 Resistência aos Antimicrobianos

Um número crescente de agentes infecciosos está se tornando cada vez mais resistentes aos compostos antimicrobianos comerciais (HANCOCK, NIJNIK, PHILPOTT et al. 2012). A necessidade de desenvolver novos medicamentos exige estratégias variadas, entre elas, a bioprospecção de metabólitos secundários produzidos por plantas medicinais (DIONISI; LOZADA; OLIVERA 2012; BENKO-ISEPPON e CROVELLA 2010).

Os antibióticos vegetais possuem uma estrutura química que difere daquela dos antibióticos sintéticos, podendo regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas (MICHELIN et al., 2005). O uso de antimicrobianos naturais, como temperos, condimentos e extratos vegetais, tende a ser uma alternativa interessante (SILVA et al., 2010).

A resistência antimicrobiana é uma questão importante, tanto na produção animal quanto na saúde pública (BARZA, 2002), o que também é relatado pela *World Health Organization*, 2009. Na Medicina Veterinária a utilização dos antimicrobianos tem como objetivo manter ou melhorar a saúde dos animais. Porém, em animais saudáveis é comum, o uso profilático de antimicrobianos, com o intuito de evitar alguma infecção que possa acarretar perdas na produtividade (PALERMO-NETO, 2011).

Os antimicrobianos também são utilizados como aditivo zootécnico melhorador de desempenho (promotor de crescimento), levando a um aumento da eficiência alimentar (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE; 2010). De acordo com a Instrução Normativa nº 26/2009, os antimicrobianos indicados como promotores de crescimento devem apresentar eficácia e segurança comprovada na quantidade e espécies alvo, para as quais o produto é indicado

(BRASIL, 2009a). Entretanto, a subdosagem de antimicrobianos usados como promotores de crescimento podem aumentar a chance de seleção de cepas resistentes de bactérias e levar ao surgimento de outras cepas multirresistentes (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE; 2010; SCHWARZ et al., 2010).

2. 5 Plantas Medicinais - Antimicrobianos Alternativos

Com o aumento da resistência bacteriana às múltiplas drogas antimicrobianas surge a preocupação e a procura de novas alternativas terapêuticas, como fonte importante para obtenção destes medicamentos. A atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais foi comprovada em vários estudos realizados em países que possuem uma flora diversificada (NOVAIS et al., 2003).

De acordo com a *World Health Organization*, os remédios extraídos de plantas são utilizados por 80% da população mundial, em especial nas áreas rurais dos países em desenvolvimento ou em locais em que a população não tem acesso ou condições de adquirir medicamentos. No Brasil, um número significativo de plantas é usado na forma de extratos brutos para o tratamento de infecções comuns embora, poucas evidências científicas sejam relatadas comprovando a eficácia desse tratamento (LIMA et al., 2006).

A estrutura química dos antibióticos vegetais diferem daqueles derivados de micro-organismos, podendo regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas (MICHELIN et al., 2005). As plantas são capazes de produzir diferentes substâncias tóxicas em grandes quantidades, aparentemente para sua defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. Muitas dessas substâncias são responsáveis pelas suas propriedades medicinais e aromáticas que são utilizadas na medicina popular e despertam interesse científico pelas suas atividades biológicas. No entanto, plantas utilizadas como medicamentos são xenobióticos e como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos até que se prove o contrário (LAPA et al., 2002).

O metabolismo das plantas é dividido em primário (ou de macromoléculas - proteínas, lipídios e carboidratos) que são amplamente distribuídos nos organismos vivos, e secundário (ou de micromoléculas - tais como, alcalóides, terpenóides e flavonóides) de ocorrência restrita, embora estes sejam essenciais para os organismos que os produzem (PERES, 2004; HASSANPOUR et al., 2011; RENSHENG e WEININ, 2011).

Os metabólitos secundários têm importantes funções ecológicas para as plantas, e são frequentemente associados a mecanismos de defesa contra agentes externos, como por exemplo, pragas, radiação solar, predação por micro-organismos, insetos, herbívoros e outros causadores de estresse. Para os seres humanos, estes compostos são importantes, por apresentarem várias propriedades terapêuticas: calmante, antiviral, contraceptivo, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e inseticida que são utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, químicas, alimentos e de cosméticos (GOTTLIEB, 1981; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010; MAFFEI; GERTSCH; APPENDINO, et al., 2011;. CARTAXO et al., 2010).

O uso de antimicrobianos naturais, como extratos vegetais tende a ser uma alternativa interessante para reduzir ou eliminar patógenos transmitidos por alimentos, possibilitando uma combinação com métodos já existentes (BURT, 2004; SILVA et al., 2010). Além disso, devido ao aumento de cepas bacterianas resistentes, houve um aumento no número de publicações sobre atividade antibacteriana de extrato de plantas (ELOFF, 1998).

Trabalhos realizados por Wiest et al., (2009) sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente a isolados de *Salmonella* spp., constataram dentre os extratos aquosos, alcoólicos/hidroalcoólicos de 86 plantas, em estudo, 58% apresentaram alguma inibição ou inativação sobre *Salmonella* spp.

2. 6 *Hymenaea martiana* Hayne – Jatobá

Hymenaea martiana Hayne, conhecida popularmente como Jatobá, Jataí e Jitaí, é uma árvore conhecida na região Nordeste do Brasil, típica dos biomas Cerrado e Caatinga, ocorre nos estados da Bahia, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Piauí, Goiás e Mato Grosso do Sul e no Distrito Federal (SIQUEIRA FILHO et al., 2009; RIBEIRO, 2010). As espécies do gênero *Hymenaea* também ocorrem na Floresta Amazônica, Floresta Atlântica e Pantanal (RIBEIRO, 2010). O gênero engloba 14 espécies, destas 12 ocorrem no Brasil, *Hymenaea aurea* Y.T. Lee & Langenh., *H. courbaril* L., *H. eriogyne* Benth., *H. intermedia* Ducke, *H. maranhensis* Y.T.Lee & Langenh., *H. martiana* Hayne, *H. oblongifolia* Huber, *H. parvifolia* Huber, *H. reticulata* Ducke, *H. rubriflora* Ducke, *H. stigonocarpa* Mart. ex Hayne e *H. velutina* Ducke (RIBEIRO, 2010).

As plantas do gênero *Hymenaea* são utilizadas na medicina tradicional brasileira para o tratamento de processos inflamatórios, infecções bacterianas, reumatismo e anemia (GAZZANEO, 2005; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007). Esta árvore é indicada para recuperação de áreas degradadas e arborização de jardins, parques e rodovias, sua madeira é utilizada na construção civil, carpintaria, marcenaria e no artesanato (SIQUEIRA-FILHO et al., 2009).

Esta planta é caracterizada por apresentar tronco com exsudado resinoso, podendo ser reconhecida por conter folhas bifolioladas, flores grandes com pétalas e frutos robustos, lenhosos e indeiscentes (QUEIROZ, 2009). O tronco exsuda uma resina, a qual é utilizada localmente na medicina popular para o tratamento de feridas, bronquite e distúrbios estomacais. Atividades biológicas de extratos desta espécie têm sido relatados. Em estudos anteriores observaram atividade anti-inflamatória relacionada com extrato hidroalcoólico obtido a partir da casca do Jatobá (MARSAIOLI; LEITÃO-FILHO; CAMPELLO, 1975).



Figura 1 – *Hymenaea martiana* Hayne – Jatobá
(Foto: J.A. Siqueira-Filho)

2. 7 *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. – Amburana

A *Amburana cearensis* (Alemão) AC Smith, pertence à família Fabaceae, conhecida como Cumaru, Amburana ou Amburana-de-cheiro, é uma árvore que atinge 10-12 m de altura (ANDRADE-LIMA, 1989). É encontrada no Brasil, nos estados de Pernambuco, Bahia, Sergipe, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo,

São Paulo, Minas Gerais, Distrito Federal e em outros países como Paraguai, Peru, Argentina e Bolívia (SIQUEIRA-FILHO et al., 2009).

Tem sido explorada para fabricação de móveis, esculturas e marcenaria, sendo listada como uma espécie ameaçada de extinção (HILTON-TAYLOR, 2000). Devido às suas propriedades medicamentosas, a casca e as sementes são utilizadas para o tratamento de tosse, asma, bronquite e coqueluche (BEZERRA; CANUTO; SILVEIRA; 2005). As sementes também são utilizadas para facilitar a digestão, tratar enxaquecas, cólicas e derrames. Suas folhas e frutos são palatáveis aos caprinos (SIQUEIRA-FILHO et al., 2009).

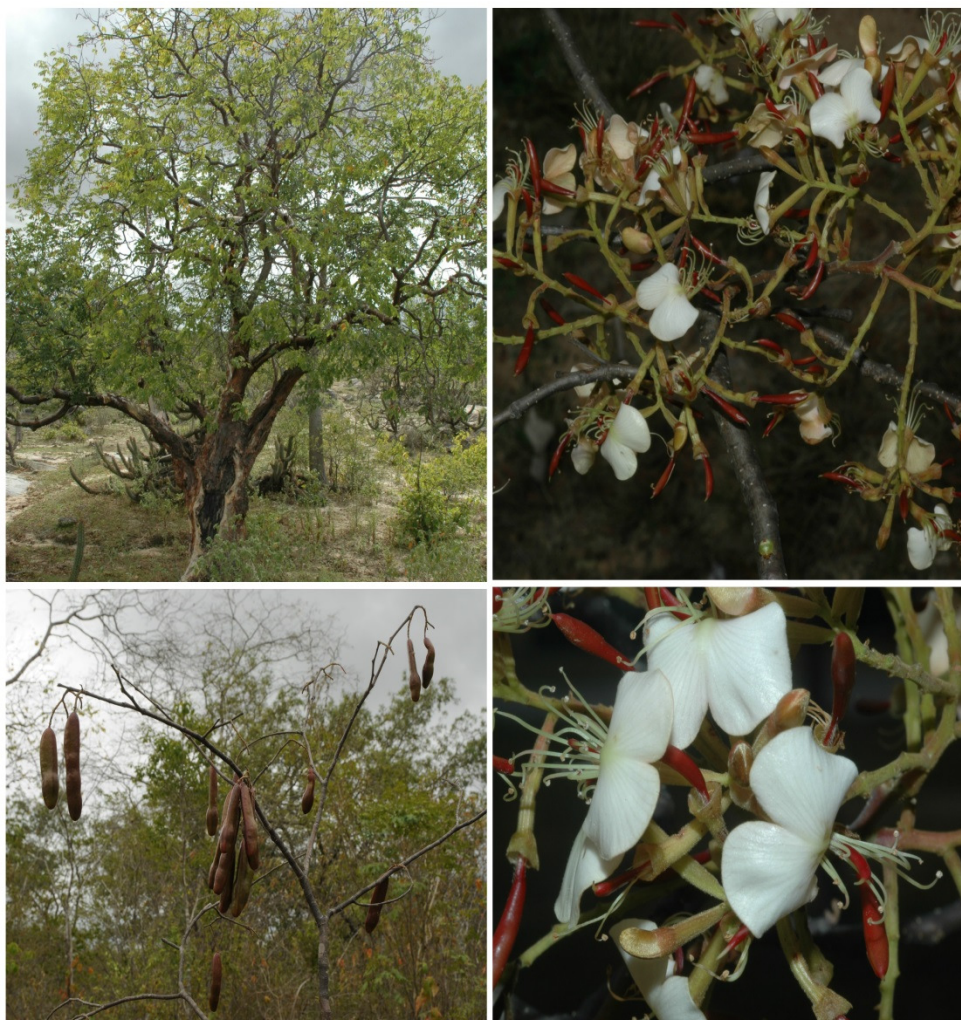


Figura 2 – *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. – Amburana
(Foto: J.A. Siqueira-Filho)

Estudos demonstraram atividade antiespasmódica, anti-inflamatória, antitussígena, bronco-dilatadora e analgésica do extrato hidroalcoólico (BRAGA, 1976; CORREA, 1984; LEAL, 1997; LEAL et al., 2003). A partir do tronco da casca de *A. cearensis* vários compostos foram isolados, incluindo cumarinas, flavonóides e os glicosídeos de fenol (CANUTO e SILVEIRA, 2006; BRAVO e SAUVAIN, 1999).

2. 8 *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez – Caroá



Figura 3 – *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez – Caroá
(Foto: J.A. Siqueira-Filho)

Neoglaziovia variegata pertence à família Bromeliaceae, subfamília Bromelioideae, é popularmente conhecida no Brasil como "Caroá". Esta espécie pode ser geralmente encontrada em regiões semiáridas do Nordeste do Brasil (PEREIRA; QUIRINO, 2008).

As sementes de *N. variegata* são difíceis de serem encontradas, devido ao hábito alimentar de alguns animais e pássaros que consomem as bagas verdes e principalmente, as maduras (XAVIER, 1982), dificultando assim a coleta na época ideal da maturação dos frutos (SILVEIRA et al., 2009).

O Caroá constitui uma das matérias-primas mais utilizadas para o artesanato na região semiárida do Brasil, gerando emprego e renda para muitas famílias. As folhas são usadas na extração de fibras para fabricação de cordas, chapéus, bolsas, tapetes, redes, redes de pesca e tecidos (SILVEIRA et al., 2011). No entanto, esta espécie tem sido coletada diretamente na Caatinga de forma extrativista, sem qualquer sistematização de cultivo, por isto praticamente desapareceu em algumas regiões (SILVEIRA et al., 2009).

2. 9 *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. – Jurema-preta

A jurema-preta é uma planta arbustiva encontrada em larga escala na Caatinga, é disseminada nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (OLIVEIRA et al., 1999).

Na medicina popular a casca do caule é a principal parte da planta utilizada no tratamento de diversas enfermidades como queimaduras e inflamações. No México, onde também é muito conhecida popularmente por “tepescohuite”, a *Mimosa tenuiflora* tem sido muito estudada quanto ao seu potencial terapêutico. Trabalhos realizados no México avaliando as propriedades antimicrobianas do caule de *M. tenuiflora* demonstraram a ação inibitória dos extratos aquoso e etanólico contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos dermatófitos (LOZOYA et al., 1989).

Devido à sua importância como forrageira no semiárido nordestino, estudos sobre a *Mimosa tenuiflora* têm sido mais direcionados para seu valor nutricional bem como ao seu caráter tóxico, fatores que interferem diretamente na produtividade animal. No nordeste do Brasil, a ingestão de *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta) tem sido associada a malformações congênitas, incluindo anomalias ósseas craniofaciais, malformações oculares em ovinos, caprinos e bovinos (MEDEIROS et al., 2005, NÓBREGA JÚNIOR et al., 2005, DANTAS et al., 2010). Casos espontâneos de anomalias congênitas também

são descritos em ovinos criados extensivamente no semiárido associados ao consumo de *M. tenuiflora* (DANTAS et al., 2010).

O efeito teratogênico é dose-dependente e a incidência, o tipo e a severidade da malformação dependem da composição do princípio ativo, do estágio da gestação em que ocorre a ingestão e da quantidade do teratôgeno ingerido (PANTER et al., 1998, WELCH et al., 2011). A ingestão de altas doses destes princípios ativos pode causar toxicidade materna resultando em morte embrionária ou fetal (PANTER et al., 1994; BERNARDI 2002; WELCH et al., 2011). O princípio ativo da *M. tenuiflora* é, ainda desconhecido, mas alguns autores relatam que os alcalóides derivados da triptamina já foram isolados em folhas e sementes (GARDNER et al., 2011).



Figura 4 – *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. – Jurema-preta
(Foto: J.A. Siqueira-Filho)

Dentre as espécies forrageiras destacam-se a jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret), e a jurema-branca (*Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke) abundantes na Caatinga e muito apreciadas como alimento por ovinos, caprinos e bovinos, principalmente na estação seca quando não há pastagens para sua alimentação. Porém, seu uso pelas populações locais vai além do seu

valor forrageiro, sendo utilizada também como madeira, carvão e usada na medicina caseira em tratamentos de queimaduras, acne, problemas de pele e ainda pelo seu potencial antimicrobiano, analgésico, regenerador de células, antitérmico e adstringente peitoral (MAIA, 2004).

2. 10 *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH.) LUCKOW & R. W. JOBSON – Angico-de-bezerro

Pityrocarpa moniliformis (= *Piptadenia moniliformis*) Benth (Leguminosae - Mimosoideae) é uma planta lenhosa do Nordeste do Brasil conhecida popularmente como Catanduva, Catanduba, Rama-de-bezerro (PI), Muquém, Angico-de-bezerro, Surucucu (BA), Quipembé (PE) (LORENZI, 2002; AZÊREDO, 2009). É frequentemente encontrada nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia e particularmente frequente no Vale do Rio São Francisco e em florestas secas na região de Sucre (Venezuela) (LORENZI, 2002; SILVA et al., 2012; TRENTIN et al., 2011).

O angico-de-bezerro é uma espécie pioneira, rústica e de rápido crescimento, indicada para reflorestamentos heterogêneos com fins preservacionistas. Devido ao pequeno porte que esta árvore atinge, sua madeira é utilizada em pequenas obras de construção civil, marcenaria leve, lenha e carvão (LORENZI, 2002). A apicultura da região Nordeste do Brasil tem como fonte as flores de plantas nativas, sendo esta espécie uma planta melífera de destaque e potencial. Suas flores são apreciadas pelas abelhas, fornecendo mel de excelente qualidade. Esta espécie também apresenta propriedades medicinais e fornece forragem para a caprinocultura e bovinocultura (SILVA et al., 2004).

Alguns pesquisadores mostraram que esta planta é uma fonte de compostos ativos com atividade antimicrobiana, antibacteriana, anti-biofilme e antioxidante (SILVA et al, 2011, 2012; TRENTIN et al, 2011). O elevado potencial da *Pityrocarpa moniliformis* está na sua grande diversidade de estrutura e propriedades físico-químicas (NEWMAN e CRAGG, 2012).



Figura 5 – *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH.) LUCKOW & R. W. JOBSON – Angico-de-bezerro (Foto: J.A. Siqueira-Filho)

2.11 *Simira gardneriana* M.R.V. Barbosa & Peixoto – Pereiro-de-Tinta

Simira gadneriana (Rubiaceae, Rondeletieae) é uma árvore pequena, que atinge de 4 - 7 m de altura. Ocorre em áreas com terreno arenoso e precipitação anual de 500-700 mm (BARBOSA & PEIXOTO, 2000; SIQUEIRA-FILHO et al., 2013).

Simira gardneriana M. R. Barbosa & A. L. Peixoto, havia sido previamente listada como endêmica para a Caatinga e mapeada em Prado (1991) sob *Simira* sp. Pode ser encontrada nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Piauí, em que é conhecida como Pereiro-de-Tinta ou Pereiro-Vermelho (SIQUEIRA-FILHO et al., 2013).

A madeira de *Simira gardneriana* é usada na construção civil e na produção de cercas. Durante a estação seca, pode ser utilizada como forragem para alimentação animal (BARBOSA & PEIXOTO, 2000).

Esta espécie está ameaçada de extinção e encontra-se presente na lista de espécies da Flora Brasileira, na categoria dados deficientes (SIQUEIRA-FILHO et al., 2013).



Figura 6 – *Simira gardneriana* M.R.V. Barbosa & Peixoto – Pereiro-de-Tinta
(Foto: J.A. Siqueira-Filho)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais de plantas da Caatinga frente a *Salmonella* spp. isoladas de fezes de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez (Caroá); *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. (Amburana); *Hymenaea martiana* Hayne (Jatobá); *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Jurema-preta); *Simira gardneriana* M.R.V. Barbosa & Peixoto (Pereiro-de-tinta); *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH.) LUCKOW & R. W. JOBSON (Angico-de-bezerro) frente às cepas de *Salmonella* spp. proveniente de fezes de caprinos e ovinos.

Quantificar a formação de biofilme pelos isolados de *Salmonella* spp.

Verificar a interação dos extratos vegetais com o biofilme em formação e consolidado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Estudo

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco, localizado no Campus de Ciências Agrárias, Rodovia BR 407, 12 Lote 543 - Projeto de Irrigação - Nilo Coelho - S/N C1 - Petrolina/PE - CEP: 56300-000.

4.2 Isolados de *Salmonella* spp.

Para as avaliações antimicrobianas foram utilizadas uma cepa bacteriana de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC): 14023 e sessenta isolados de *Salmonella* spp., 30 provenientes de caprinos e 30 de ovinos de raças diferentes. Estes isolados foram mantidos em ágar *Tryptone Soya Broth* (TSB) e incubados a 37°C por 24 h. Os animais eram provenientes de 12 propriedades e do Abatedouro Municipal de Petrolina (Latitude S09°23'55"; Longitude W40°30'03"), localizada na região do Submédio São Francisco, estado de Pernambuco. As amostras provenientes do abatedouro pertenciam a animais oriundos dos municípios de Dormentes-PE e Casa Nova-BA. Antes da coleta os animais foram avaliados clinicamente quanto a presença de sinais clínicos de diarreia, foram coletadas apenas amostras de animais assintomáticos.

4.3 Material Vegetal

O material vegetal para obtenção dos extratos vegetais foram cedidos pelo biólogo José Alves de Siqueira Filho. As plantas foram coletadas na cidade de Petrolina, Estado de Pernambuco, Brasil, no período de 2011 - 2012. As amostras foram identificadas por um botânico do Centro de Recuperação de Áreas Degradadas da Caatinga (CRAD) e as exsiccatas foram codificadas e depositadas no Herbário do Vale do São Francisco (HVASF) da Universidade Federal do Vale São Francisco.

4.4 Extratos Vegetais

Os extratos vegetais das seis plantas utilizadas no experimento, foram cedidos gentilmente pelos professores farmacêuticos Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida e Xirley Pereira Nunes, do Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais da Univasf. Estes extratos foram obtidos por dessecação em estufa com circulação forçada, com temperatura média de 40^oC, durante três dias, seguido de processamento em moinho, para obtenção de um material vegetal seco e pulverizado, o qual foi submetido à maceração exaustiva com etanol 95% em um recipiente de aço inoxidável. Após várias extrações, com intervalos de 72 horas, obteve-se o completo esgotamento do material vegetal. A solução extrativa passou então pela destilação do solvente, obtendo-se os seguintes extratos etanólicos bruto (EEB):

- 1- *Hymenaea martiana* Hayne (Jatobá): Extrato etanólico bruto da casca (EEB);
- 2- *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. (Amburana): Extrato etanólico bruto da casca (EEB);
- 3- *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez (Caroá): Extrato etanólico bruto das flores;
- 4- *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Jurema-preta) Extrato etanólico bruto da casca (EEB);
- 5- *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH.) LUCKOW & R. W. JOBSON (Angico-de-bezerra): Extrato etanólico bruto das folhas (EEB);
- 6- *Simira gardneriana* M.R.V. Barbosa & Peixoto (Pereiro-de-Tinta): Extrato etanólico bruto das folhas (EEB).

4.5 Verificação da Qualidade Microbiológica dos Extratos

Os extratos foram avaliados quanto à contaminação bacteriana e fúngica previamente aos testes antimicrobianos. Sendo que para determinação da presença de bactérias foi realizada semeadura em meio ágar triptona de soja

(TSA - trypticase soy agar) com incubação em estufa bacteriológica por 24 h a 35 °C. Para a determinação dos fungos foi utilizado o meio ágar Sabouraud com incubação à temperatura ambiente por cinco dias. Após a incubação observou-se o aparecimento ou não de colônias nos meios de cultura, o que indicaria contaminação bacteriana ou fúngica.

4. 6 Bioensaio da Atividade Antibacteriana *in vitro*

Para os bioensaios da atividade antibacteriana foram utilizadas os 60 isolados de *Salmonella* spp. e a ATCC 14023, disponíveis no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco. Utilizou-se como meio de cultura o caldo Mueller-Hinton (MH). O preparo do inóculo bacteriano foi realizado de acordo com a metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbio: Norma Aprovada – Sexta Edição (Normas do CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*) (NCCLS, 2003). A atividade antimicrobiana foi determinada por meio da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de *N. variegata*; *A. cearensis*; *H. martiana*; *M. tenuiflora*; *P. moniliformis* e *S. gardneriana* sobre as cepas bacterianas. Foi adicionado 1,25g do extrato etanólico a 50 mL de água destilada, obtendo-se uma solução de concentração de 25 mg/mL. A metodologia empregada foi a Microdiluição em Placa, baseando-se no protocolo M7-A7 do CLSI (CLSI, 2006), que consistiu na distribuição de 200 µL de caldo Muller-Hinton (MH) em placas de microtitulação. Em seguida foram adicionados 200 µL da solução estoque do extrato no primeiro poço, com posterior homogeneização, seguido de diluições seriadas, a fim de se obter as oito (08) concentrações finais: (1): 12.500 µg/mL; (2): 6.250 µg/mL; (3): 3.125 µg/mL; (4): 1.562,5 µg/mL; (5): 781,3 µg/mL; (6): 390,6 µg/mL; (7): 195,3 µg/mL e (8): 97,6 µg/mL. Na preparação do inóculo, colônias desenvolvidas em Ágar MH, foram utilizadas para obtenção de uma suspensão bacteriana com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland, resultando em uma suspensão contendo aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ células/mL. Esta solução foi então diluída (1:10) para obter o inóculo com

concentração de 10^7 células/mL. Quando cada poço da microplaca recebeu o inóculo, a concentração final ficou entre 5×10^5 e $7,5 \times 10^5$ células/mL (NCCLS, 2003). Desta suspensão, 10 μ L foram inoculados 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, foi retirada uma alíquota de 10 μ l, semeando-a na superfície de ágar MH e incubando por 24 h a 37 °C. A CBM é a menor concentração de um agente antimicrobiano que é capaz de causar danos irreversíveis à célula microbiana, impedindo o crescimento do micro-organismo (MAHBOUBI et al., 2012). Assim, a concentração bactericida mínima (CBM) foi definida como sendo a menor concentração do extrato etanólico em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Como controle positivo, foram utilizados poços contendo apenas bactérias e meio de cultura e como controle negativo poços contendo apenas meio de cultura. A coloração dos extratos dificulta a visualização da turvação na microplaca, por isto não foi realizada a concentração inibitória mínima (CIM), sendo considerados apenas os resultados da concentração bactericida mínima (CBM).

4. 7 Quantificação de Biofilme para *Salmonella* spp.

Cada isolado de *Salmonella* foi incubado overnight em TSB. Em seguida, do TSB diluído 1:10 foi retirado 200 μ l, adicionado em microplacas e incubados a 30°C durante 48h. Como controle negativo foram utilizados poços contendo apenas meio de cultura e como controle positivo a ATCC 14023. A determinação da formação do biofilme em placas de microdiluição foi realizada utilizando a coloração cristal violeta conforme descrito por Patel e Sharma (2010). Após 48h de incubação em microplaca, 200 μ l da cultura foi completamente removido por aspiração, e o poço foi lavado cinco vezes com água destilada estéril. As placas foram deixadas secar em temperatura ambiente durante 45 minutos, em seguida os poços foram corados com 200 μ l com solução de cristal violeta (0,41% de corante w/v) à temperatura ambiente durante 45 min. A solução de cristal violeta foi completamente removida por aspiração e os poços foram lavados cinco vezes com água destilada estéril. Depois de permitir que os poços fossem secos durante 45 min, 200 μ l de etanol

a 95% foi adicionado a cada poço, para dissolver o corante cristal violeta. A formação do biofilme no poço foi medida usando a densidade óptica (D.O.) de 600 nm (D.O. 600) utilizando um leitor de microplacas modelo EXPERT PLUS-UV. Com base na D.O. produzida pelos biofilmes, as estirpes bacterianas foram classificadas nas seguintes categorias: não produtora de biofilme, fraca, moderada ou forte produtoras de biofilme, como previamente descrito por (STEPANOVIC et al., 2000). A densidade óptica de corte (D.O.c) foi definida como três desvios padrão acima da média D.O. do controle negativo. As cepas foram classificadas da seguinte forma: $D.O. \leq D.O.c$ = não produtora de biofilme (NPB), $D.O.c < D.O. \leq (2 \times D.O.c)$ = fraca produtora de biofilme (FPB), $(2 \times D.O.c) < D.O. \leq (4 \times D.O.c)$ = moderada produtora de biofilme (MPB) e $(4 \times D.O.c) < D.O.$ = forte produtora de biofilme (FoPB). Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram calculados.

4.8 Interação do Extrato com o Biofilme Consolidado

A formação de biofilme em microplacas foi obtida a partir da incubação de 100 μ l da suspensão bacteriana dos isolados de *Salmonella* que foram classificados com MPB (moderada produtora de biofilme) e/ou FoPB (forte produtora de biofilme) por 48 h a 30 °C. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com água destilada, para a remoção de células planctônicas, e então acrescidos de 100 μ l do extrato (0,5 CBM), que apresentou a melhor ação bactericida no experimento, como descrito por Nostro et al., 2007, com algumas modificações. A densidade óptica (DO) foi determinada imediatamente após a adição do extrato (0 h) e (24 h) depois.

4.8.1 Interação do Extrato com o Biofilme em Formação

De acordo com os resultados obtidos da CBM, a concentração de 0,5 CBM foi utilizada sobre o biofilme em formação. Este ensaio foi realizado em microplacas. Os inóculos bacterianos classificados com MPB (moderada produtora de biofilme) e/ou FoPB (forte produtora de biofilme) foram cultivados em 10 ml de TSB diluído por 48 h a 30°C, sendo 100 μ l acrescidos nos poços da placa, que previamente havia sido adicionada de 100 μ l do extrato vegetal e

100 µl de meio de cultura nos controles. Após 48 h de incubação a 30°C, as placas foram submetidas à coloração com cristal violeta, acima descrita. Para a interpretação dos resultados as cepas foram classificadas da seguinte forma: $D.O. \leq D.O.c$ = não produtora de biofilme, $D.O.c < D.O. \leq (2 \times D.O.c)$ = fraca produtora de biofilme, $(2 \times D.O.c) < D.O. \leq (4 \times D.O.c)$ = moderada produtora de biofilme e $(4 \times D.O.c) < D.O.$ = forte produtora de biofilme. Todos os testes foram realizados em triplicata e a os resultados foram calculados (STEPANOVIC et al., 2000).

4.9 Análise Estatística

Os dados referentes ao Bioensaio da atividade antimicrobiana *in vitro* foram analisados adotando o modelo de regressão logística múltipla com interação, empregando-se SAS (versão 9.3) procedure logistic e o método de seleção de variáveis “passo atrás” (backward). Utilizou-se o teste qui-quadrado de Wald para verificar a significância dos parâmetros do modelo utilizado. Os 60 isolados de *Salmonella* spp.; Fonte/Origem das Salmonellas (1- Ovino, 2- Caprino e 3- ATCC); Extratos com atividade (1- *M. tenuiflora*, 2- *P. moniliformes*, 3- *A. cearenses*), as concentrações e a interação destes foram utilizados como parâmetros.

A análise de variância dos isolados quanto a produção de biofilme foi realizada através do procedure npar1way, opção anova do SAS. Para o biofilme consolidado foi realizada a análise de variância de classificação hierárquica, empregando-se o procedure glm do SAS.

5 RESULTADOS

5.1 Bioensaio da Atividade Antibacteriana *in vitro*

Os extratos de *M. tenuiflora* (Jurema-preta) e *P. moniliformes* (Angico-de-bezerro) em estudo apresentaram atividade antimicrobiana em 100% (n=60/60) dos isolados testados. Já o extrato de *A. cearensis* (Amburana) apresentou a menor atividade antimicrobiana 6,6% (4/60) entre os extratos que tiveram atividade, sendo que desses isolados sensíveis três eram provenientes de caprinos e um de ovino. Os extratos de *N. variegata* (Caroá), *H. martiana* (Jatobá), *S. gardneriana* (Pereiro-de-tinta) independente da concentração testada, não apresentaram atividade antimicrobiana sobre os isolados de *Salmonella* spp. utilizados no presente estudo.

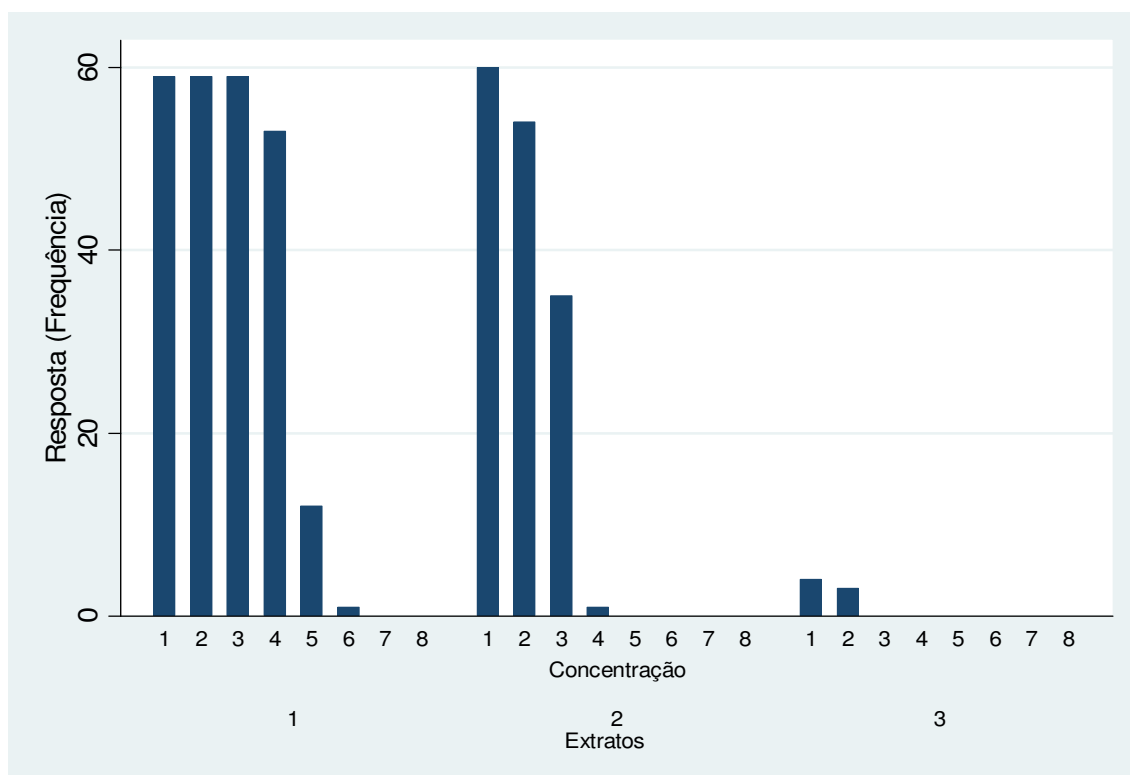


Figura 7 – Frequência de ação antimicrobiana de acordo com o extrato e concentrações utilizadas, (1): 12.500 µg/mL; (2): 6.250 µg/mL; (3): 3.125 µg/mL; (4): 1.562,5 µg/mL; (5): 781,3 µg/mL; (6): 390,6 µg/mL; (7): 195,3 µg/mL e (8): 97,6 µg/mL e os extratos: 1 - *M. tenuiflora* (Jurema-preta), 2- *P. moniliformes* (Angico-de-bezerro) e 3- *A. cearenses* (Amburana).

5.1.2 Bioensaio da Atividade Antibacteriana *in vitro* - Modelo de Regressão Logística Múltipla (Backward)

Na Tabela 1, observa-se a significância dos coeficientes ($p < 0,05$), após aplicação do modelo de regressão logística múltipla (backward), com efeitos individuais e efeitos de interação das variáveis.

Tabela 1- Análises das Estimativas de Máxima Verossimilhança

Parâmetros	gl	Estimativa dos Coeficientes	Erro padrão	Qui-quadrado de Wald	Prob > Qui-quadrado
Constante/Intercepto	1	-0,1770	1,0470	0,0286	0,8658
Isolado(X_1)	1	-0,1007	0,0252	15,9753	< 0,0001
Fonte(X_2)	1	1,5926	0,7617	4,3717	0,0365
Extratos(X_3)	1	-4,7115	0,8164	33,3016	<0,0001
Concentração(X_4)	1	0,00535	0,000628	72,7825	<0,0001
Isolado x Concentração($X_1 * X_4$)	1	0,000114	0,000017	42,3951	<0,0001
Fonte x Concentração($X_2 * X_4$)	1	-0,00147	0,000446	10,8189	0,0010
Extratos x Concentração($X_3 * X_4$)	1	-0,00148	0,000226	42,8549	<0,0001

gl: grau de liberdade

A significância individual dos coeficientes de regressão foi testada empregando a estatística de qui-quadrado de Wald (Tabela 1). De acordo com a Tabela 1 foram significativos os parâmetros: isolado, fonte, extratos, concentração e as interações: isolado x concentração, fonte x concentração e extratos x concentração ($p < 0,05$). O teste para a constante ($p > 0,05$) sugere que um modelo alternativo sem o intercepto pode ser aplicado aos dados.

5.1.2.1 Análise da Significância Individual

Em relação aos isolados de *Salmonella* spp. e fonte/origem das salmonelas, houve resposta diferenciada para cada um destes, influenciando na atividade antimicrobiana. Assim como houve resposta diferenciada para cada um dos extratos e as concentrações em estudo, influenciando diretamente a atividade antimicrobiana.

5.1.2.2 Análise da Significância Interação

A interação das variáveis: isolado x concentração, fonte x concentração, extrato x concentração, influenciaram conjuntamente na resposta diferenciada da atividade antimicrobiana.

5.1.3 Bioensaio da Atividade Antibacteriana *in vitro* - Método de regressão logística múltipla de efeitos individuais e interação entre as variáveis

Quando consideramos apenas o modelo logístico com efeitos individuais e de interação entre as variáveis: extrato e concentração, observou-se a significância dos coeficientes ($p < 0,001$), após aplicação do método de regressão múltipla, conforme representado na Tabela 2.

Tabela 2 - Análises das Estimativas de Máxima Verossimilhança para regressão logística múltipla de efeitos individuais e interação entre as variáveis

Parâmetros	gl	Estimativa dos Coeficientes	Erro padrão	Qui-quadrado de Wald	Prob > Qui-quadrado
Constante/Intercepto	1	-0,8463	0,7193	1,3844	0,2394
Extratos (X_3)	1	-2,8776	0,6291	20,9264	<0,0001
Concentração (X_4)	1	0,00390	0,000423	85,0173	<0,0001
Extratos x Concentração ($X_3 * X_4$)	1	-0,00087	0,000205	18,2051	<0,0001

gl: grau de liberdade

5.1.3.1 Análise Gráfica das Interações

A figura 8 representa as curvas de probabilidades de ação para os extratos vegetais 1, 2 e 3, em função das concentrações, quando considera-se o modelo logístico com efeitos individuais e de interação entre as variáveis, extrato e concentração. Observou-se que o extrato 1 (*M. tenuiflora*), tem maior probabilidade estimada de ação em concentrações menores, seguidos dos extratos 2 (*P. moniliformes*) e 3 (*A. cearenses*), o que sugere melhor ação antimicrobiana do extrato de *M. tenuiflora* em relação aos demais. O extrato 1 (*M. tenuiflora*) atinge a sua probabilidade estimada máxima de ação à partir da concentração 3.125 µg/mL, o extrato 2 (*P. moniliformes*) à partir de 6.250 µg/mL e o extrato 3 (*A. cearenses*) à partir de 12.500 µg/mL.

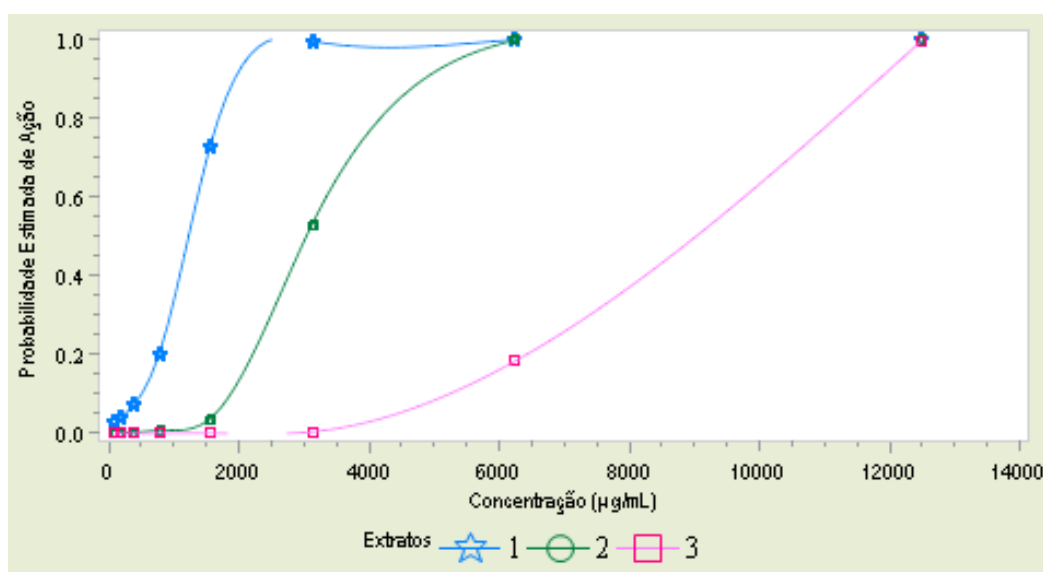


Figura 8 – Probabilidade de ação antimicrobiana dos extratos 1- *M. tenuiflora* (Jurema-preta), 2- *P. moniliformes* (Angico-de-bezerro), 3- *A. cearenses* (Amburana), em função das concentrações testadas.

A figura 9 representa as curvas de probabilidades de ação para as fontes 1, 2 e 3, em função das concentrações. Foi possível verificar que a probabilidade estimada de ação são aproximadamente iguais para as três fontes estudadas.

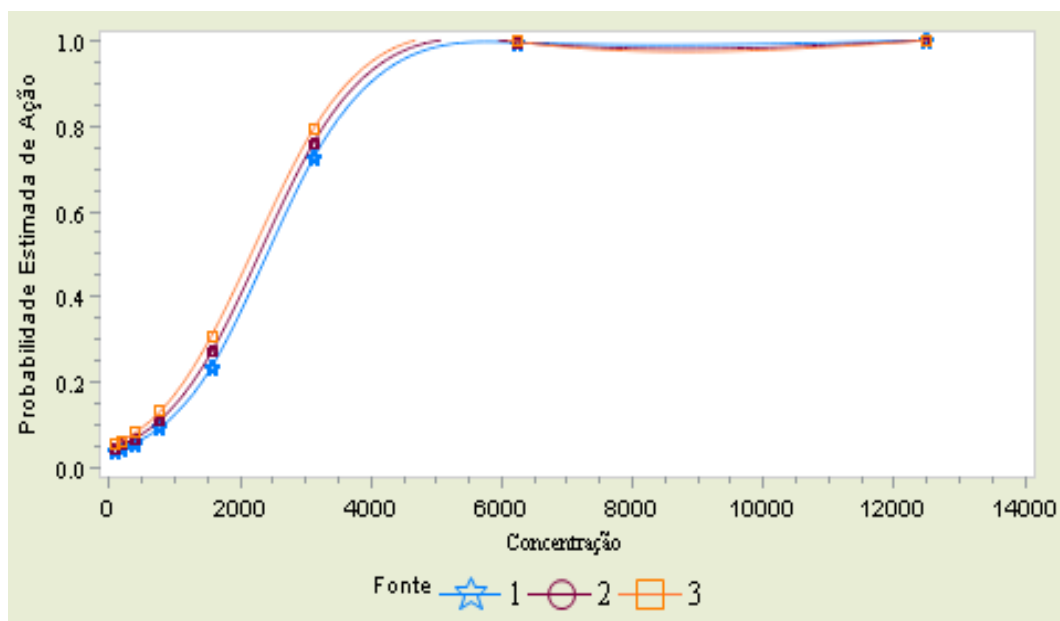


Figura 9 – Probabilidade de ação antimicrobiana em função das concentrações testadas no estudo de acordo com a fonte/origem dos isolados. (1): Ovino, (2): Caprino e (3) Bactéria de referência – ATCC.

5.2 Quantificação de Biofilme para *Salmonella* spp.

Os resultados da quantificação do biofilme para *Salmonella* spp. nas superfícies plásticas das microplacas revelaram que todos os isolados testados produziram biofilme no meio TSB diluído (1/10-TSB). As bactérias classificadas em NPB apresentaram $D.O \leq 0,055$; FPB $0,55 < D.O \leq 0,11$; MPB $0,11 < D.O \leq 0,22$; FoPB $> 0,22$. Na Tabela 3, observa-se a classificação dos isolados para a produção de biofilme.

Tabela 3 - Número de isolados de *Salmonella* spp. e suas classificações de acordo com a produção de biofilme.

Classificação	Nº de Isolados	Percentual (%)
Fraca Produção de Biofilme (FPB)	50	81,97
Moderada Produção de Biofilme (MPB)	11	18,03
Forte Produção de Biofilme (FoPB)	-	-
Não Produtor de Biofilme (NPB)	-	-
Total	61	100,00

Os 60 isolados de *Salmonella* e a ATCC foram classificadas em dois grupos: Fraca Produção de Biofilme (FPB) e Moderada Produção de Biofilme (MPB). De acordo com a fonte /origem, 50 isolados foram classificados com FPB, 28 de origem caprina, 21 ovina e 01 ATCC. Os 11 isolados classificados com MPB, 09 eram de origem ovina e 02 caprina. A análise de variância, na Tabela 4, demonstra diferença significativa entre bactérias, Prob > F (< 0,0001), concluindo que as bactérias diferem quanto à produção de Biofilme (Fraca Produção de Biofilme e Moderada Produção de Biofilme), mas não houve diferença entre as repetições.

Tabela 4 - Análise de variância dos isolados quanto à produção de biofilme.

Fonte de Variação	gl	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F	Prob > F
Entre Bactérias	60	0,109335	0,001822	12,3421	< 0,0001
Dentro de Bactérias (Repetições)	122	0,018013	0,000148		

gl: grau de liberdade

5.2.1 Interação do Extrato com o Biofilme em Formação

Os extratos de *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) e *Pityrocarpa moniliformis* (Angico-de-bezerro) apresentaram ação sobre o Biofilme em Formação nos 11 isolados de *Salmonella* com Moderada Produção de Biofilme, diminuindo a medida da densidade óptica, sendo estes isolados reclassificados em fraco e não produtores de biofilme.

A figura 10, representa a comparação dos extratos de 1-*Mimosa tenuiflora* e 2- *Pityrocarpa moniliformis*, em que se observou que o extrato 1 apresentou maior número de isolados reclassificados como Não Produtores de Biofilme, possuindo uma melhor ação anti-biofilme em relação ao extrato 2. O presente estudo demonstrou a capacidade dos extratos de *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) e *Pityrocarpa moniliformis* (Angico-de-bezerro) em interagir com o biofilme, diminuindo assim sua formação.

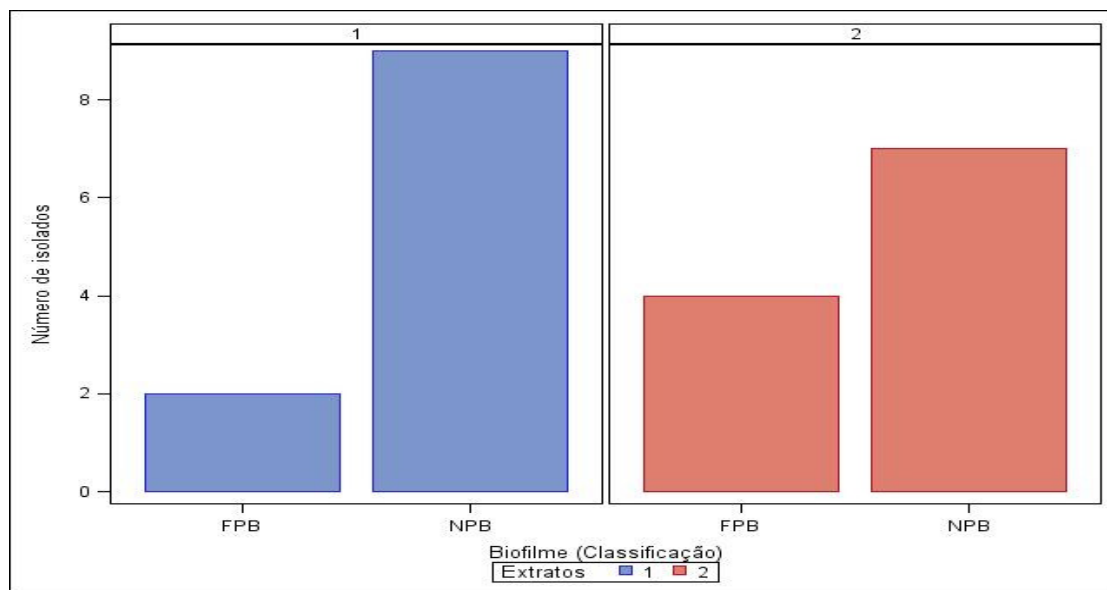


Figura 10 – Reclassificação dos isolados após tratamento com os extratos (1- *M. tenuiflora*, 2- *P. moniliformes*) sobre o Biofilme em Formação. (FPB) Fraca Produção de Biofilme e (NPB) Não Produtora de Biofilme.

5.2.2 Interação do Extrato com o Biofilme Consolidado

Os extratos de *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) e *Pityrocarpa moniliformis* (Angico-de-bezerro) não tiveram ação sobre o biofilme consolidado, pois não houve diferença significativa entre as densidades ópticas no tempo dentro de extratos, quando foi empregado o modelo de análise de variância de classificação hierárquica, conforme resultados que podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 - Análise de variância de classificação hierárquica (biofilme consolidado).

Fonte de Variação	gl	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F	Prob > F
Extrato	1	1,41462368	1,41462368	109,55	< 0,0001
Tempo	1	0,00664541	0,00664541	0,51	0,4746
Tempo (Extrato)	1	0,02399841	0,02399841	1,86	0,1754

gl: grau de liberdade

6 DISCUSSÃO

6.1 Bioensaio da Atividade Antibacteriana *in vitro*

Vários estudos têm demonstrado que as plantas da Caatinga são uma rica fonte de compostos de notável atividade antimicrobiana (DA SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2012). Assim, como os extratos das plantas *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) e *Pityrocarpa moniliformis* (Angico-de-bezerra) e *A. cearensis* (Amburana) que apresentaram atividade antimicrobiana sobre os isolados de *Salmonella* spp. provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco.

O extrato etanólico da jurema-preta (*M. tenuiflora*) apresentou a melhor atividade antimicrobiana quando avaliada no presente estudo. Trabalhos realizados por grupos de pesquisa mexicanos sugerem que muitas das atividades biológicas de *M. tenuiflora* se devem pela existência de compostos como os esteróides, terpenóides, alcalóides, flavonóides, taninos e outros compostos fenólicos (RIVERA-ARCE et al., 2007). Estes dados são promissores e incentivam novas pesquisas sobre os aspectos fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos de *M. tenuiflora*, com o objetivo de padronizar a sua utilização racional na terapia antimicrobiana de infecções por *Salmonella* spp.

Estudos fitoquímicos da plantas de *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) tem atraído bastante interesse, principalmente devido à presença de seus alcalóides e taninos (RIVERA-ARCE et al., 2007). Segundo Meckes-Lozoya et al. 1990; os taninos são, provavelmente, os principais compostos responsáveis pela maior parte da atividade antimicrobiana. Padilha, (2006); verificou a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) o qual apresentou potencial atividade sobre linhagens hospitalares de *Staphylococcus aureus*. Entretanto, o extrato de *Mimosa tenuiflora* a 10% apresentou atividade bactericida significativa sobre as linhagens estudadas por ele.

Figueiredo et al., (2013), indicaram que os extratos etanólicos de *Amburana cearensis* e *Anadenanthera macrocarpa* contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de referência e multirresistentes são uma fonte

alternativa natural com ação antibacteriana. Esta ação é justificada devido à presença de várias substâncias antibacterianas, que podem ser responsáveis pelos efeitos modulatórios que foram observados, indicando a possibilidade de utilização de produtos combinados com aminoglicosídeos para aumentar o potencial antimicrobiano das drogas contra micro-organismos multirresistentes.

Da Silva et al., em 2013, avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato das folhas e as frações de *P. moniliformis* contra os seguintes micro-organismos: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA02), *Micrococcus luteus* (UFPEDA100), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 414), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA416) e algumas estirpes de *S. aureus* (UFPEDA 660, UFPEDA 663, UFPEDA 676, UFPEDA 687, UFPEDA 712, UFPEDA 733) e observaram que o extrato hidroalcolico bruto inibiu apenas bactérias Gram-positivas. Outras frações deste extrato apresentaram atividade contra todos os microrganismos testados, com exceção de *E. coli*. Para *Salmonella enteritidis* as concentrações inibitórias foram de 12,5 mg/ml (acetato de etilo, ciclo-hexano e as frações de n-butanol) e 25 mg/ml (fração aquosa). Em outro estudo realizado por como SÁ et al., (2011), foi avaliado o extrato de *A. cearensis*, observaram atividade antimicrobiana sobre *E. coli* (166.7µg/mL), *Salmonella* spp. (145.8µg/mL) e *S. aureus* (145.8µg/mL).

Na literatura não foram encontrados relatos, sobre a utilização da *Simira gardneriana*, na medicina popular, nem trabalhos que avaliem a possível atividade antimicrobiana do extrato desta espécie. No entanto, no presente trabalho os extratos de *S. gardneriana*, *N. variegata*, *H. martiana*, não apresentaram atividade antimicrobiana sobre os isolados de *Salmonella* spp. pesquisados. Segundo VLIETINCK et al., (1995), RABE et al., (1997), LIN et al. (1999) e KELMANSON et al., (2000), muitas plantas com atividade antimicrobiana que já foram estudadas são ativas apenas contra cepas de bactérias Gram-positivas. URZUA et al., (1998) sugeriram que a membrana externa das bactérias Gram-negativas poderia agir como uma barreira contra as substâncias ativas presentes nos extratos de plantas. No entanto, vários autores encontraram extratos vegetais com atividade tanto para bactérias Gram-positivas como para as negativas (KHAN et al., 2009; KUETE et al.,

2010; AZIZ et al., 2011; STEFANOVIC e COMIC, 2012). O que foi verificado por Oliveira-Júnior et al., (2012), os quais demonstraram que o extrato etanólico de *N. variegata* apresentou atividade antibacteriana sobre a maior parte dos micro-organismos testados, especialmente para as cepas Gram-positivas: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, como também, atividade antimicrobiana sobre estirpes Gram-negativas: *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri* e principalmente, *Klebsiella pneumoniae*, sendo os flavonóides presentes nos extratos os possíveis responsáveis pela atividade antibacteriana apresentada na pesquisa (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2012).

Diferentemente do observado em nosso estudo, Almeida et al., 2012, demonstraram que o extrato etanólico de *N. variegata* apresentou atividade bactericida sobre *Salmonella enterica* (ATCC 10708) com CBM de 3.120 µg/mL, como também para outros micro-organismos, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Shigella flexneri* (ATCC 12022) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), sendo sugerido que os flavonóides presentes nos extratos podem ser responsáveis pela atividade antibacteriana apresentada. Os diferentes padrões de resistência observados em outros trabalhos pelas cepas dos micro-organismos, podem estar relacionadas com a origem das cepas e características inerentes ao gênero em estudo, assim como a composição química de algumas preparações vegetais influenciadas pela técnica da colheita, partes escolhidas, crescimento no ambiente, ciclo vegetativo, condições do solo e a sazonalidade. Estas diferenças nas técnicas empregadas para investigação da ação dos compostos, podem dificultar a comparação entre os estudos já realizados (SIVROUPOULOU et al., 1995; OSTROSKY et al., 2008; BOUADBELLI et al., 2012).

As concentrações de 500 µg/mL e 250 µg/mL de acordo com critérios sugeridos por Holetz et al., (2002) seriam de moderada atividade antimicrobiana. Fabry et al., (1998) e Sartoratto et al., (2004), consideraram critérios menos rigorosos, sendo que os extratos nas concentrações estudadas em nosso trabalho teriam uma forte atividade antimicrobiana. Evidencia-se, dessa maneira, a necessidade de estudos mais avançados, visando padronizar

a concentração aceitável da atividade antimicrobiana de extratos vegetais com potencial de aproveitamento para fitoterápicos ou para pesquisa de novas drogas antimicrobianas. Já que utilizamos concentrações finais máximas de 12.500 µg/mL e mínimas de 97,6 µg/mL.

6.2 Quantificação de Biofilme para *Salmonella* spp. e Interação do Extrato com o Biofilme em Formação e Consolidado

Todos os isolados de *Salmonella* spp. avaliados em nosso estudo produziram Biofilme, sendo classificados em dois grupos: Fraca Produção de Biofilme (FPB) 81,97% e Moderada Produção de Biofilme (MPB) 18,03%. Esta formação de biofilmes e à adesão bacteriana não dependem apenas da fisiologia do micro-organismo, da expressão de fatores de virulência, do estado fisiológico das células bacterianas no momento da análise, mas também da natureza do substrato, como as características físico-químicas, a área e o material da superfície (FLACH et al., (2005); MACEDO, 2006; MEDONLINE, (2008).

Dentre os outros fatores que influenciam a formação de biofilme, a composição do meio de cultura também é bastante importante (DEWANTI e WONG, 1995; HOOD e ZOTTOLA, 1997; GERSTEL e ROMLING 2001; STEPANOVIC et al. 2003), mas ainda pouco compreendida (DONLAN, 2002). Hood e Zottola (1997), avaliaram a formação de biofilme bacteriano para cinco diferentes espécies e verificaram que para cada microrganismo testado o meio de cultura induziu diferentes produções de biofilme. Segundo Stepanovic et al. 2004, o meio TSB Diluído (1/10-TSB) utilizado no nosso trabalho também foi o meio mais eficaz na produção de biofilme testado em cepas de *Salmonella* spp. Este meio de cultura possui poucos nutrientes, o que pode gerar um ambiente hostil para a sobrevivência destas bactérias, estimulando a produção de biofilme por elas. Geralmente, *Salmonella typhimurium* produz mais biofilme em meios com limitada quantidade de nutrientes, diferentemente da *L. monocytogenes* que intensifica sua produção em meios mais ricos (HOOD e ZOTTOLA (1997). Stepanovic, et al., (2004), verificaram que independentemente da composição do meio de cultura, a produção de Biofilme

pelas cepas de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* foram classificadas apenas como moderadas ou fracas produtoras de biofilme, assim como os resultados obtidos neste estudo.

Os extratos de *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) e *Pityrocarpa moniliformis* (Angico-de-bezerro) tiveram ação sobre o biofilme em formação. A atividade anti-biofilme de óleos essenciais e do carvacrol sobre o biofilme de *Salmonella Typhimurim* foi demonstrado por Soni et al. (2013), sendo esta capacidade dependente da concentração do agente antimicrobiano utilizado. Entretanto os extratos testados não apresentaram ação sobre o biofilme consolidado, o que pode ser justificado pela forte adesão gerada pelas bactérias à superfície, dificultando a remoção de biofilmes já constituídos (MEDONLINE, 2008).

A composição destas comunidades em biofilme oferece mais proteção aos micro-organismos com estilo de vida sésil, que resistem mais aos agentes empregados nos procedimentos de higienização, podendo ser até mil vezes mais resistentes que as células planctônicas (DRENKARD, 2003). A rede de EPS seria uma das grandes responsáveis por conferir esta proteção, agindo como barreira física, impedindo que os agentes sanitizantes cheguem a seus sítios de ação, como à membrana externa em bactérias Gram-negativas, por exemplo. O EPS é também capaz de adsorver cátions, metais e toxinas e conferir proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação. Conhecer as condições que propiciam a sua formação e as suas fragilidades é fundamental para que estratégias de controle, mais econômicas e eficazes, sejam direcionadas para a eliminação da introdução destes micro-organismos na cadeia alimentar (HERRERA et al., 2007).

7 CONCLUSÕES

Os extratos de *Amburana cearenses* (Amburana) e principalmente *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) e *Pityrocarpa moniliformis* (Angico-de-bezerro) apresentaram atividade antimicrobiana sobre os isolados de *Salmonella* spp. obtidos de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco, podendo ser uma alternativa terapêutica.

Os extratos de *M. tenuiflora*, *P. moniliformes* podem ter importantes aplicações para implementação de estratégias como agentes de suporte aos antimicrobianos e ação anti-biofilme em formação, sendo alternativas promissoras para combater micro-organismos patogênicos, particularmente *Salmonella* spp.

São necessários outros estudos para a verificação do isolamento, identificação, toxicidade de compostos ativos responsáveis pela atividade antimicrobiana das plantas e aprimorar a técnica de verificação da produção de biofilme por *Salmonella* spp. A compreensão do mecanismo de sinergismo é fundamental, para o uso com sucesso, das plantas medicinais no tratamento de infecções causadas por bactérias.

8 REFERÊNCIAS

AGRA, M.F; FREITAS, P.F. ; BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal Pharmacognosy**, v.17, n.1, 114-140, mar.2007.

ALVES, H.M. **Plantas como fonte de fitofármacos**. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola. n 3, p. 01-06. 2001. Disponível em: <<http://sbqensino.foco.fae.ufmg.br>>. Acesso em: 16 fev. 2013.

ALBUQUERQUE, U.P. et al. Caatinga revisited: ecology and conservation of an important seasonal dry forest. **The Scientific World Journal**, n.1, p.1-18, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415163/>>. Acesso em: fev.2013.

ALMEIDA, CFCBR. et al. Comparative study of the antimicrobial activity of native and exotic plants from the Caatinga and Atlantic Forest selected through an ethnobotanical survey. **Pharmaceutical Biology**. v.50, n.2, p.201–220, fev.2012.

ALMEIDA, JRGS. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n.10, p. 4489-4494, 2012.

ANDRADE-LIMA, D. **Plantas da Caatinga**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1989. 243p.

ALVSEIKE, O; SKJERVE, E. Prevalence of a *Salmonella* subspecies diarizonae in Norwegian sheep herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 52, n.3-4, p.277-285, 2002.

ARNOLD, J.W.; YATES, I.E. Interventions for control of *Salmonella*: clearance of microbial growth from rubber picker fingers. **Poultry Science**, v. 88, n. 6, p. 1292-1298, Junho 2009.

AZIZ ABD, S.M. et al. Screening of selected Malaysian plants against several food borne pathogen bacteria. **International Food Research Journal**, v.18, n.3, p.1195-1201, 2011.

AZÊREDO, G. A. **Qualidade fisiológica de sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth.** 2009.121f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

BARBOSA, M. R. V.; PEIXOTO, A.L. A new species of *Simira* (Rubiaceae, Rondeletieae) from Northeastern Brazil. **Novon**, v.10, n.2, p.110-112, 2000. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/3393006>>. Acesso em: jan.2013.

BARZA, M. Potential mechanisms of increased disease in humans from antimicrobial resistance in food animals. **Clinical Infectious Diseases**, n.34, p.123–125, 2002. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/content/34/Supplement_3/S123.full.pdf+html>. Acesso em: fev.2013.

BELLOU, L. et al. Diagnosis by culture and PCR of *Salmonella Abortusovis* infection under clinical conditions in aborting sheep in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v.138, n.3- 4, p.373-377, set.2009.

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

BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal, p.692-699. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. (Eds), **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2002. 752p.

BEZERRA A. M. E., K. M. CANUTO, AND E. R. SILVEIRA. Estudo fitoquímico de espécimes jovens de *Amburana cearensis* A. C. Smith. In. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 29, 2005. Águas de Lindóia,SP: SBQ, 2005.

BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**, 2008. 80 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.

BONKE, R. et. al. High prevalence of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* in tonsils of sheep at slaughter. **Food Research International**, v. 45, p. 880–884, 2012.

BOUABDELLI, F. et al. Antimicrobial activity of 22 plants used in urolithiasis medicine in Western Algeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, supl. 1, p. 530-535, 2012.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste especialmente do Ceará**. 3.ed. Fortaleza, CE: Imprensa Oficial, 1976. p. 219.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dados Epidemiológicos – DTA**: período de 2000 a 2011. 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_periodo_2000_2011_site.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2013.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Análise Epidemiológica de Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, 2008. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/DTA.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº26/2009**. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/produtos-veterinarios/legislacao>>. Acesso em: mai.2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Caprinos e ovinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>>. Acesso em: 24 set. 2013.

BRAVO, B.; SAUVAIN, M. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v.50, n.1, p. 71-74, 1999.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 94, p.223 – 253, 2004.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CANUTO, K.M.; SILVEIRA, E.R. Chemical constituents of trunk bark of *Amburana cearensis* (A.C. Smith). **Química Nova**, v.29, p.1-3, 2006.

CAPELLETTI, Raquel Vannucci. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

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

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Newport United States: January-April 2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 51, n.25, p. 545-548, jun.2002. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5125a1.htm>>. Acesso em: jan.2013.

COLLINSON, S.K. et al. Salmonella enteritidis agfBAC operon encoding thin aggregative fimbriae. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.3, p.662–667, 1996.

CORREIA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, 1984. p. 266-267.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M100, S16 - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth Informational supplement**. Wayne, PA (USA): CLSI, 2006. Disponível em: <<http://isoforlab.com/phocadownload/csl/M100-S16.pdf>>. Acesso em: jan.2013.

DANTAS, A.F.M. et al. Malformações congênitas em ruminantes no semiárido do Nordeste Brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.10, p.807-815, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v30n10/a02v30n10.pdf>>. Acesso em: fev.2013.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.847–867, 2000.

DEWANTI, R.; WONG, A.C. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p.147–164, 1995.

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

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.9, p.881–890, 2002.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and infection**, v. 5, n. 3, p.1213-1219, 2003.

DUNNE, W.M. Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p.155–166, 2002.

EDRINGTON, T.S. et al. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* isolated from feedlot lambs. **Journal of food protection**, v.72, n.8, p.1713-1717, 2009.

EGINTON, P.J. et al. Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. **Letters in applied microbiology**, v.27, n.2, p.101-105, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9750331>>. Acesso em: dez. 2012.

ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extracts for bacteria. **Planta Médica**, v.64, n.8, p.711- 713, 1998.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO RIO GRANDE DO NORTE. **Manejo sanitário de caprinos e ovinos**. Natal, RN: EMPARN, 2006.

FABRY, W.; OKEMO, P.O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n.1, p.79-84, feb.1998.

FIGUEIREDO, F. G. et al. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, v. 2013, Article ID 640682. 5p. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/640682/>. Acesso em: jan.2013.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p.291-296, 2005.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Extratos Vegetais**. 2010. Disponível em: <<http://www.revistafi.com/materias/120.pdf>> Acesso em: 12 ago. 2013.

FULLER, R. Probiotics in man and animals: a review. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-78, 1989.

GARDNER, D.R.; RIET-CORREA, F.; PANTER K.E. Alkaloid profiles of *Mimosa tenuiflora* and associated methods of analysis. In: RIET-CORREA, F. et al (Eds). **Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related toxins**. Wallingford, UK: CAB International, 2011. p. 600-605.

GAZZANEO, L.R.S; LUCENA, R.F.P.; ALBUQUERQUE, U.P. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v.1, n.9, p.1-8, nov.2005.

GERSTEL, U.; ROMLING, U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. **Environmental Microbiology**, v.3, n.10, p.638–648, 2001.

GOTTLIEB, O. New and underutilized plants in the Americas: Solution to problems of inventory through systematics. **Interciência**, v. 6, n. 1, p. 22-29, 1981.

GOULD, I.M. Coping with antibiotic resistance: the impending crisis. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.36, Suppl.3, p.1–2, 2010.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em Veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 276p.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003 – 2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v.161, n.1, p. 26-29, jan./feb. 2010.

HABRUN, B. et al. An outbreak of *Salmonella Abortusovis* abortions in sheep in south Croatia. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, v.53, n.6, p.286-290, 2006.

HANCOCK, R.E.; NIJNIK, A.; PHILPOTT, D.J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. **Nature reviews Microbiology**, v.10, p.243–254, 2012.

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

HERRERA, J. J. R. et al. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 585-591, 2007.

HILTON-TAYLOR C. **The IUCN Red List of threatened Species**. Cambridge, UK: IUCN, 2000.

HOLAH, J.T. et al. A conductance based surface disinfectant test for food hygiene. **Letters in applied microbiology**, v. 11, p.255-260, 1990.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOLT, J.G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 787, 1994.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.145–153, 1997.

HURRELL, E. et al. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other Enterobacteriaceae. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, p.227-231, 2009.

JACK, E. J. *Salmonella abortusovis*: an atypical *Salmonella*. **Veterinary Record**, v.82, p.558–561, 1968.

JACK, E. J. *Salmonella* abortion in sheep. **Veterinary Annual**, v.12, p.57–63, 1971.

- JOSEPH, B. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.367-372, 2001.
- KELMANSON, J.E.; JAGER, A.K.; VAN STADEN, J. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 241–246. 2000.
- KHAN, R. et al. Antimicrobial Activity of Five Herbal Extracts Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains of Bacteria and Fungus of Clinical Origin. **Molecules**, v.14, p. 586-597, 2009.
- KUETE, V. et al. Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 536-542, 2010.
- KUSILUKA, L.; KAMBARAG, D. **Diseases of small ruminants: a handbook**. In Common Diseases of sheep and goats in Sub-Saharan Africa. Roslin: VETAID: Overseas Development Administration Animal Health Program, 1996.
- LAPA, A.J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade, 2002. p.183-199.
- LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, n.3, p.229-233, 2006.
- LEAL, L. K. A. M. et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine**, v.4, n. 3, p.221–227, 1997.
- LEAL, L. K. et al. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytotherapy Research**, v.17, n.4, p.335–340, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.1139/pdf>>. Acesso em: ago.2013.
- LECHEVALIER, M. W.; CAWTHON, C. D.; LEE, R. G. Factor promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.3, p.649-654, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202520/pdf/aem00108-0033.pdf> Acesso em: ago.2013.
- LIMA, M.R.F. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, n.1-2, p.137- 147, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.10.026>>. Acesso em: set. 2013.

LIN, J. et al. Preliminary screening of some traditional zulu medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n. 267-274, 1999. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00130-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00130-0)>. Acesso em:

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5.ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2002. v.1, 368p.

LOZOYA, X. et al. Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (Willd) poir (tepescohuite) I - Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. **Archivos de Investigación Médica**, v. 20, n.1, p.87-93, jan./mar.1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2764672>>. Acesso em: ago.13.

LUCCHESI, Eliane Gama. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

MACEDO, Jorge Antônio Barros. **Biofilmes Bacterianos**: uma preocupação para a indústria de alimentos. 18 de julho de 2006. Disponível em: <http://www.milknet.com.br/?pg=artigos_tecnicos&id=7&local=1>. Acesso em 10 de setembro de 2013.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.398-444.

MAFFEI, M.E; GERTSCH, J.; APPENDINO, G. Plant volatiles: Production function and pharmacology. **Natural product reports**, v.28, n.8, p.1359-1380, aug. 2011.

MAHBOUBI, A, et al. Evaluation of antibacterial activity of three Iranian medicinal plants. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, p.2048-2052, mar.2012. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/article/article1380711585_Mahboubi%20et%20al.pdf>. Acesso em: jun.2013.

MAIA, G. N. **Caatinga**: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo, SP: Leitura & Arte, 2004. p.237-246.

MARSAIOLI, A.J; LEITÃO-FILHO, H.F; CAMPELLO, J.P. Diterpenes in the bark of *Hymenaea coubaril*. **Phytochemistry**, v.14, n.8, p.1882-1883, 1975. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85324-6](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(75)85324-6). Acesso em: jun.2013.

MECKES-LOZOYA, M. et al. Efecto producido por la fracción de alcaloides de *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite) sobre el reflejo peristáltico del ileón del cobayo. **Archivos de Investigación Médica**, v.21, p.171-174, 1990.

MEDEIROS J.M. et al. Mortalidade perinatal em caprinos no semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.25, n.4, p.201-206, out./dez.2005. Disponível em: <http://www.pvb.com.br/pdf_artigos/03-01-2006_10-53Vet289.pdf>. Acesso em: set.2013.

MEDONLINE. Medicina on-line. Biofilme: um velho problema, uma nova batalha. 2008. **Revista Virtual de Medicina**. Disponível em <www.medonline.com.br>. Acesso em 7 de setembro de 2013.

MICHELIN, D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n.4, p. 316-320, oct./dec. 2005.

MILNES, A. S. et al. Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic, *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during. **Epidemiology and Infection**, v.136, n.6, p.739-751, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2870870/>. Acesso em: jun.2013.

MOLLA, B. et al. Class 1 integrons and resistance gene cassettes among multidrug resistant *Salmonella* serovars isolated from slaughter animals and foods of animal origin in Ethiopia. **Acta Tropical**, v.103, n.2, p.142-149, jun.2007.

MORETRO, T. et al. Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, n.3, p.1005-1012, mar.2009.

MOSTELLER, T. M.; BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 34-41, 1993.

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathogens**, v.4, n.11, nov. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2581603/>. Acesso em: jun.2013.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS); COSTA, S.F (trad) – **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbio**: norma Aprovada. 6ed. Brasília, DF: ANVISA, 2003. (NCCLS Document M7-A6, v. 23, n. 2). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/aud/manuals/clsi/clsi_OPASM7_A6.pdf>. Acesso em: jan.2013.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** v.75, n.3, p.311-335, 2012. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np200906s>>. Acesso em: mar.2013.

NÓBREGA JÚNIOR J.E. et al. Mortalidade perinatal de cordeiros no semiárido da Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.**, v.25, n.3, p.171-178, abr./jun.2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v25n3/a08v25n3.pdf>. Acesso em: mar.2013.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of medical microbiology**, v.56, pt.4, p.519–523, apr.2007.

NOVAIS, T.S. et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.13, supl.2 p.05-08, 2003.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. G. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research**, v. 4, n.10, p.4489-4494, 2012.

OLIVEIRA, S. J. **Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária**. 3.ed. Canoas, RS: ULBRA, 2012. p.121-127.

OLIVEIRA, M.R. et al. Estudo das condições de cultivo da Algaroba e Jurema preta e determinação do poder calorífico. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v.14, p.93-104, 1999.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PADILHA IQM. **Atividade Antimicrobiana *in vitro* e Cinética Bactericida do Extrato de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Jurema-preta) sobre Linhagens de *Staphylococcus aureus* Multirresistentes**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 2006.

PALERMO-NETO, J. Uso de antimicrobianos em suinocultura e desenvolvimento de resistência bacteriana: uma análise de risco. **Porkworld: Animalworld**, Set, 2011.

PANTER, K.E. et al. The effects of poisonous plants on embryonic and fetal development in livestock, In: COLEGATE, S.M.; DORLING, P.R. (Eds). **Plant Associated Toxins**. Wallingford, UK: CAB International, 1994. P. 325-332.

PANTER K.E. et al. Toxic and teratogenic piperidine alkaloids from *Lupinus*, *Conium* and *Nicotiana* species. In: GARLAND, T.; BARR, A.C. (Eds), **Toxic Plants and other Natural Toxicants**. Wallingford, UK: CAB International, 1998. p.345-350.

PAPHITOU, N.I. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. **Inter. J. Anti. Agent.**, v. 425, suppl.1, p.525-528, jun.2013.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.04.007>>. Acesso em: ago.2013.

PATEL, J.; SHARMA, M. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, p. 41 e 47, 2010.

PEREIRA, F.R.L.; QUIRINO, Z.G.M. Fenologia e biologia floral de *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) na caatinga paraibana. **Rodriguésia**, v.59, n.4, p.835-844, 2008. Disponível em: <http://rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/rodrig59_4/012%28008-07%29.pdf>. Acesso em: mar.2013.

PEREIRA, O.B.O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme**. 2001. 221f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2001.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004.

PRADO, D. E. **A critical evaluation of the floristic links between Chaco and Caatingas vegetation in South America**, 1991. Ph.D. thesis, University of St. Andrews, St. Andrews, Scotland.

PROUTY, A.M.; GUNN, J.S. Comparative analysis of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium biofilm formation in gallstones and on glass. **Infection and Immunity**, v.71, n.12, p.7154-7158, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308894/pdf/0432.pdf>. Acesso em: abr.2013.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: UEFS, 2009. 467p.

QUINN, P.J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1.ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005.

RABE, T.; VAN STADEN, J. Antimicrobial activity os South African Plants Used for Medicinal Purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p.81-87, 1997.

RABSCH, W.; TSCHAPE, H.; BAUMLER, A.J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 237–247, 2001.

RADOSTITS, O.M. et al (Eds). Diseases associated with *Salmonella* species. In: _____. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10^o ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. p.896-921.

RADULOVIC, N.S. et al. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. **Current medicinal chemistry**, v. 20,n.7, p.932-952, 2013.

RENSHENG, X.; YE, Y.; WEIMIN, Z. (Eds). **Introduction to natural products Chemistry**. New York, EUA: CRC Press, 2011. p.169- 175.

RIBEIRO, R. D. **Hymenaea**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: jan.2013.

RIVERA-ARCE, E. et al. Pharmacognostical studies of the plant drug *Mimosae tenuiflorae* cortex. **Journal Ethnopharmacology**, v. 113: 400-408, 2007.

RUSHTON, J. **The economics of animal health and production**. Cambridge, MA: CABI International; 2009. 380p. Disponível em: <http://www.blogtiengviet.net/media/users/tamthanh27/tailieu/cbaebook/animalhealth.pdf>. Acesso em: fev.2013.

SÁ, M.C.A. et al. Antimicrobial activity of Caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 2/3, p. 62-66, 2011.

SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural product reports**, v.27, n.2, p.238–254, feb.2010.

SANDBERG, M.; ALVSEIKE, O.; SKJERVE, E. The prevalence and dynamics of *Salmonella enterica* IIIb 61:k:1,5,(7) in sheep flocks in Norway. **Preventive Veterinary Medicine**. v.52, n.3/4,p. 267–275, 2002.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.4, p.275–280, 2004.

SAS/STAT Procedure Logistic: versão 9.3, SAS System for Windows. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc. 2002-2010c.

SCHWARZ, S. et al. Assessing the susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 601-604, 2010.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.1, jan. 2011.

SHARMA, A.K. et al. Experimental *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium infection in Indian goats: clinical, serological, bacteriological and pathological studies. **Small Ruminant Research**, v.42, n.2, p.125-134, 2001.

SILVA, A.G. Antimicrobial activity of medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil. **Curr. Top. Phytochem.**, v.11, p.81-94, 2012.

SILVA, C.L.; QUEIROZ, A.J.M.; FIGUEIREDO, R.M.F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.8, n.2/3, p.260-265, 2004.

SILVA, J. P. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente à *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, supl.1, p.136-141, 2010.

SILVA, L.C.N. et al. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Natural product research**, v.27, n.16, 2013, epub sep 2012. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22974409>>. Acesso em 2013.

SILVA, L.C.N. et al. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and chemical toxicology**, v.49, p.2222-2228, 2011.

SILVA, M.V. et al. Antimicrobial Activity of *Pityrocarpa moniliformis* leaves and its Capacity to Enhance the Activity of four Antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.7, n.28, p.2067-2072, jul. 2013.

SILVEIRA, D.G. et al. Micropropagation and in vitro conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber produced bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Londrina, v.52, n.4, p.923-932, 2009.

SILVEIRA D. G. et al. Resposta germinativa de sementes de Caroá (*Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez.). **Ciências Agrotécnicas**, v. 35, n. 5, p.948 -955, 2011.

SIMÕES, M.; PEREIRA, M.O.; VIEIRA, M.J. Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms formed under different flow regimes. **Water Science and Technology**, v.47, n.5, p.217-223, 2003.

SIMÕES, M.; VIEIRA, M.J. Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide. In: International conference processes in biofilms Fundamentals to applications, 2009. **Proceedings...** Davis, CA, USA, 2009, p.58-62.

SIQUEIRA FILHO, José Alves de et al (Ed.). **Guia de Campo de Árvores das Caatingas**. Petrolina, PE: Franciscana, 2009. 64p. (Volume I).

SIQUEIRA FILHO, José Alves de et al (Org.). **Guia de Campo de Árvores das Caatingas**. Petrolina, PE: Progressiva, 2013. 67 p. (Volume II).

SIVROUPOULOU, A. et al. Antimicrobial activity of mint essential oils. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 2384-2388, 1995.

SOLANO, C. et al. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**, v.43, p.793–808, 2002.

SONI, K.A. et al. Inhibition and inactivation of *Salmonella typhimurium* biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 2, p. 205-212, 2013.

STEPANOVIC, S. et al. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, v. 20, p.339–343, 2003.

STEPANOVIC, S. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, 428–432, 2004.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, n. 40, p.175–179, 2000.

STEFANOVIĆ, O.; COMIE, L. Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.2 n.1, p.01-05, 2012.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews of Microbiology**, v.56, p.187–209, 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dados epidemiológicos – DTA**: período de 2000 a 2011. Brasília: MS/SVS, 2011. Disponível em: <http://www.eteavare.com.br/arquivos/20_2177.pdf>. Acesso em: jan.2013.

TINDALL, B.J. et al. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p.521–524, 2005.

TOUTAIN, P.L.; BOUSQUET-MELOU A. The consequences of generic marketing on antibiotic consumption and the spread of microbial resistance: the need for new antibiotics. **J. Vet. Pharmacol. Ther.** v.36, n.5, p.420-424, 2013.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 25, p. 807-815, 2003. Disponível em: <http://www.thaiscience.info/journals/Article/Biofilms%20and%20the%20food%20industry.pdf>. Acesso em: jun.2013.

TRENTIN, D.S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **J. Ethnopharmacol**, v.137, p.327-335, 2011.

URZUA, A. et al. Antimicrobial study of the resinous exudate and of Diterpenoids Isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 31- 47, 1998.

UZZAU, S.; BOSSI, L.; FIGUEROA-BOSSI, N. Differential accumulation of Salmonella [Cu, Zn] superoxide dismutases SodCI and SodCII in intracellular bacteria: correlation with their relative contribution to pathogenicity. **Mol Microbiol**, v. 46, n.1, p.147-156, 2002.

UZZAU, S. et al. Salmonella enterica serovar-host specificity does not correlate with the magnitude of intestinal invasion in sheep. **Infect Immun**, v.69, n.5, p.3092-3099, 2001.

VLIETINCK, A.J. et al. Mvukiyumwami J Screening of a Hundred Rwandese Medicinal Plants for Antimicrobial and Antiviral properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, n. 31-47, 1995.

VUUREN S,VILJOEN A (2011). Plant-Based Antimicrobial Studies – Methods and Approaches to Study the Interaction between Natural Products. **Plant Med.**, v.77, p.1168–1182, 2011.

WALKER, J. T.; ROGERS, J.; KEEVIL, C. W. An investigation of the efficacy of a bromine containing biocide on aquatic consortium of planktonic and biofilm microorganisms including legionella pneumophilia. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 8, n.1, p. 47-54, 1994.

WELCH K.D. et.al. Dose-response evaluation of *Veratrum californicum* in sheep. In: RIET CORREA, F. et al (Eds), **Poisoning by Plants, Mycotoxins and related Toxins**. Cambridge, MA: CAB International, v.37, p.243-250, maio 2011.

WIEST, J.M. et al. Inibição e inativação in vitro de *Salmonella* spp com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n. 1, p. 119-127, 2009.

WOLDEMARIAM, E. et al. Prevalence and distribution of Salmonella apparently healthy slaughtered sheep and goats in Debre Zeit, Ethiopia. **Small Ruminant Research**, v.58, n.1, p.19-24, abr. 2005. Disponível em: <[http://www.smallruminantresearch.com/article/S0921-4488\(04\)00229-9/pdf](http://www.smallruminantresearch.com/article/S0921-4488(04)00229-9/pdf)>. Acesso em: jun.2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Foodborne Disease Surveillance: Antimicrobial resistance**. 2009. Homepage. Disponível em: <http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/en/> Acesso em: 27 fev. 2012.

XAVIER, L.P. **O caroá**. 2.ed. Natal: EMPARN, 1982. 270p. (EMPARN. Documentos, 7. ESAM. Coleção Mossoroense, 247).



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

Jamille Cristina Pereira Cordeiro

**Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e
formação de biofilme pelos isolados de *Salmonella*
spp. provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São
Francisco**

Petrolina - PE
2014

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

Jamille Cristina Pereira Cordeiro

**Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e
formação de biofilme pelos isolados de *Salmonella*
spp. provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São
Francisco**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco, UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Petrolina – PE
2014

C794a	<p>Cordeiro, Jamille Cristina Pereira Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e formação de biofilme pelos isolados de <i>Salmonella</i> spp. provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco /Jamille Cristina Pereira Cordeiro. -- Petrolina, 2014. xi; 70f.: il. 29 cm.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina, 2014. Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa.</p> <p>1. Plantas Medicinais. 2. Alternativas antimicrobianas. 3. Isolados Bacterianos. 4. Plantas da Caatinga I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.</p> <p style="text-align: center;">CDD 632.32</p>
-------	---

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

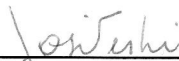
Jamille Cristina Pereira Cordeiro

**Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais e
Formação de Biofilme pelos isolados de *Salmonella*
spp. provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São
Francisco**

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



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



Dra. Josir Laine Aparecida Veschi
Embrapa Semiárido



Profª. Dra. Mércia Rodrigues Barros
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Petrolina, 24 de março de 2014.

Dedico ao meu maior Mestre, conselheiro,
amigo e minha inspiração diária,
meu pai: Joaquim Pereira Neto.
Você é o mentor desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado, guiando meus passos pelos melhores caminhos e me dando sabedoria e paciência para transpor os obstáculos.

Ao Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa, pela orientação, confiança, compreensão, apoio, ensinamentos e todo investimento intelectual.

A Maria da Conceição “Ceixa”, pelo apoio com palavras confortantes, otimistas, auxílio nas dúvidas e acima de tudo pela amizade.

Aos meus pais, Joaquim e Cida pelo amor incondicional, compreensão e incentivo aos meus sonhos e ideais.

A minha irmã, Amanda pela ajuda fundamental neste trabalho e companhia até altas horas no laboratório.

A René, meu companheiro, pela compreensão, por me ouvir nos momentos difíceis e me dar apoio e amor sempre. Te amo !

A René Neto, meu filho amado, pelo carinho e amor verdadeiro. Você é a razão das minhas lutas, conquistas e a maior alegria em nossas vidas. Te amo muito.

Aos meus familiares, pelo carinho, a família Costa, aos meus avós Luiz e Maria Odete “Vó Morena” pelas orações, a família Cordeiro, em especial a Dona Alice *in memorian*, e a família Pereira, ao meu avô Antônio Pereira “Pereirinha” *in memorian*.

Aos amigos e professores, José Alves e Jaciane Campelo, pela colaboração, palavra amiga, incentivo e pelas belas imagens que vieram a engrandecer esta dissertação.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Univasf: Carina, Carol, Evandro, Gisele, Isamara, Izabela, Jennifer, Jusciene, Mariana, Naedja, Naiane, Renata, Renilde, Ruan (pelas risadas), Samilly, Samira, Thais, Uirá, Valdenice, Werônica, Wilton, em especial a Rafael Libório pelo apoio durante o mestrado.

Aos estagiários e aos bolsistas de iniciação científica júnior, pela colaboração.

Aos colegas da pós-graduação, em especial a Maíra e Grace.

A Milka Carvalho de Azevedo, pelos isolados de *Salmonella* e atenção.

Aos professores, Jackson Guedes e Xirley Nunes pela concessão dos extratos vegetais.

Aos professores da pós-graduação em Ciência Animal, pelos conhecimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pela oportunidade. A Rosangela Fonseca "Rosinha", pela recepção calorosa, disposição, ajuda e seu bom humor.

À CAPES pela concessão da bolsa de pós-graduação, em nome do Prof. Lêucio Câmara Alves da UFRPE.

Aos funcionários do *Campus* de Ciências Agrárias da UNIVASF.

A todos, muito obrigada!

“O homem não teria alcançado o possível, se inúmeras vezes
não tivesse tentado **atingir o impossível**”

Max Weber

RESUMO

A atividade antimicrobiana de plantas medicinais frente a isolados de *Salmonella* spp. tem sido bastante pesquisada, com o intuito de caracterizar as plantas como alternativa na terapia, devido principalmente ao surgimento de cepas bacterianas resistentes a vários antibióticos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de (Caroá) *Neoglaziovia variegata*; (Amburana) *Amburana cearensis*; (Jatobá) *Hymenaea martiana*; (Jurema-preta) *Mimosa tenuiflora*; (Angico-de-bezerro) *Pityrocarpa moniliformis* e (Pereiro-de-tinta) *Simira gardneriana* e quantificar a formação de biofilme frente a isolados de *Salmonella* spp. obtidos de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco. Foram utilizados 60 isolados bacterianos de *Salmonella* spp., sendo que destes 30 eram provenientes de fezes de caprinos e 30 de ovinos. A ação antibacteriana foi avaliada através da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos alcoólicos sobre as cepas bacterianas, sendo utilizado o método de diluição em microplacas. A determinação da formação do biofilme foi realizada utilizando o cristal violeta e com base na densidade óptica produzida pelos biofilmes, as estirpes bacterianas foram classificadas. Os extratos de *N. variegata*, *H. martiana*, *S. gardneriana* independente da concentração, não inibiram o crescimento dos isolados de *Salmonella* spp. utilizados no presente estudo. O extrato de *A. cearensis* apresentou ação inibitória nas concentrações de 12.500 µg/mL e 6.250 µg/mL em quatro isolados, três provenientes de caprinos e um de ovino. O extrato de *M. tenuiflora* apresentou ação antimicrobiana em todos os 60 isolados de *Salmonella* com valor de CBM: 781,3 µg/mL. O extrato de *P. moniliformis* também apresentou ação antimicrobiana em todos os isolados estudados, com CBM: 1.562,5 µg/mL. Os extratos de *A. cearensis* e *M. tenuiflora* e *P. moniliformis* possuíram atividade antimicrobiana, enquanto que os extratos de *N. variegata* e *H. martiana* não apresentaram ação antimicrobiana sobre as bactérias pesquisadas. Os isolados também foram classificados em dois grupos: Fraca Produção de Biofilme (FPB) e Moderada Produção de Biofilme (MPB). Os 11 isolados de *Salmonella* spp. com Moderada Produção de Biofilme tratados com os extratos de *Mimosa tenuiflora* e *Pityrocarpa moniliformis* apresentaram redução no Biofilme em formação, diminuição na medida de densidade óptica, sendo reclassificados em fraco e não produtores de biofilme. Estes achados indicam o potencial de plantas do bioma Caatinga no controle de patógenos como *Salmonella* spp. obtidos de caprinos e ovinos, o que representa um reflexo positivo sobre a produção animal no Vale do São Francisco e Saúde Pública.

Palavras-chave: Plantas Medicinais. Alternativas Antimicrobianas. Isolados Bacterianos.

ABSTRACT

The antimicrobial activity of medicinal plants against isolates of *Salmonella* spp. has been extensively investigated in order to characterize the plants as an alternative therapy, mainly due to the emergence of multiple antibiotic resistant bacterial strains. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of the extracts (Caroá) *Neoglaziovia variegata*; (Amburana) *Amburana cearensis*; (Jatobá) *Hymenaea martiana*; (Jurema-preta) *Mimosa tenuiflora*; (Angico-de-bezerro) *Pityrocarpa moniliformis* and (Pereiro-de-tinta) *Simira gardneriana* and quantify biofilm formation against *Salmonella* isolates obtained from goats and sheep Valley San Francisco. A total of 60 bacterial isolates of *Salmonella* spp., and of these 30 were from feces of goats and 30 sheep. The antibacterial activity was evaluated by the minimum bactericidal concentration (MBC) of the ethanolic extracts of the bacterial strains, by using the microplate dilution method. The determination of biofilm formation was performed using the crystal violet, based on O.D produced by the biofilms, the bacterial strains were classified. Extracts of *N. variegata*, *H. Martiana*, *S. gardneriana* independent of concentration, did not inhibit the growth of *Salmonella* isolates surveyed. The extract of *A. cearensis* showed inhibitory activity at concentrations of 12.500 mg/ mL and 6.250 mg / mL for 4 isolates, 3 from goats and 1 from sheep. The extract of *M. tenuiflora* showed antimicrobial action in all 60 *Salmonella* isolates with MBC value: 781.3 mg/ mL. The extract of *P. moniliformes* also showed antimicrobial activity in all isolates studied, with MBC: 1,562.5 g / mL. The extracts of *A. cearensis* e *M. tenuiflora* e *P. moniliformes* showed antimicrobial activity, while extracts of *N. variegata* e *H. martiana* does not have an antimicrobial action against the bacteria studied. The 60 *Salmonella* were classified into two groups: Weak Production of Biofilm and Moderate Production of Biofilm. The 11 *Salmonella* isolates with Moderate Production of Biofilm treated with the extracts of *Mimosa tenuiflora* and *Pityrocarpa moniliformis* showed action on Biofilm formation, decrease the measure of optical density, being reclassified as weak and biofilm non-producers. These findings indicate the potential of plants of Caatinga to control pathogens such as *Salmonella* spp. obtained from goats and sheep, which is a positive reflection on animal production in the São Francisco Valley and Public Health.

Keywords: Medicinal Plants. Alternative Antimicrobial. Bacterial Isolates.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - *Hymenaea martiana* Hayne – Jatobá..... p.27
- Figura 2** - *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. Amburana..... p.28
- Figura 3** - *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez – Caroá p.29
- Figura 4** - *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. – Jurema-preta..... p.31
- Figura 5** - *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH.) LUCKOW & R. W. JOBSON – Angico de bezerro..... p.33
- Figura 6** - *Simira gardneriana* M.R.V. Barbosa & Peixoto – Pereiro-de-Tinta p.34
- Figura 7** - Frequência de ação antimicrobiana de acordo com o extrato e concentrações utilizadas, (1): 12.500 µg/mL; (2): 6.250 µg/mL; (3): 3.125 µg/mL; (4): 1.562,5 µg/mL; (5): 781,3 µg/mL; (6): 390,6 µg/mL; (7): 195,3 µg/mL e (8): 97,6 µg/mL e os extratos: 1 - *M. tenuiflora* (Jurema-preta), 2- *P. moniliformes* (Angico-de-bezerro) e 3- *A. cearenses* (Amburana).....p. 42
- Figura 8** - Probabilidade de ação antimicrobiana dos extratos 1- *M. tenuiflora* (Jurema-preta), 2- *P. moniliformes* (Angico-de-bezerro), 3- *A. cearenses* (Amburana), em função das concentrações testadas.....p. 45
- Figura 9** - Probabilidade de ação antimicrobiana em função das concentrações testadas no estudo de acordo com a fonte/origem dos isolados. (1): Ovino, (2): Caprino e (3) Bactéria de referência – ATCC..... p. 46
- Figura 10** - Reclassificação dos isolados após tratamento com os extratos (1- *M. tenuiflora*, 2- *P. moniliformes*) sobre o Biofilme em Formação. (FPB) Fraca Produção de Biofilme e (NPB) Não Produtora de Biofilme.....p. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análises das Estimativas de Máxima Verossimilhança..... p.43

Tabela 2: Análises das Estimativas de Máxima Verossimilhança para regressão logística múltipla de efeitos individuais e interação entre as variáveis p.44

Tabela 3: Número de isolados de *Salmonella* spp. e suas classificações de acordo com a produção de biofilme..... p.46

Tabela 4: Análise de variância dos isolados quanto a produção de biofilme..... p.47

Tabela 5: Análise de variância de classificação hierárquica (biofilme consolidado)..... p.48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BV/BPLS	Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose
CBM	Contagem Bactericida Mínima
CIM	Contagem Inibitória Mínima
DCLS	Deoxicolato Citrato Lactose Sacarose
D.O	Densidade Óptica
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
FoPB	Forte Produção de Biofilme
FPB	Fraca Produção de Biofilme
MH	Mueller-Hinton
MPB	Moderada Produção de Biofilme
NPB	Não Produtora de Biofilme
PROB	Probabilidade
pH	Potencial Hidrogeniônico
RV	Rappaport- Vassiliadis
SS	Salmonella-Shigella
TSA	Triptona Soja Ágar
TSB	Peptona Caseína Soja
XLD	Xilose Lisina Deoxicolato

LISTA DE SÍMBOLOS

g	grama
h	Hora
m	Metro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μg	micrograma
μl	microlitro

SUMÁRIO

	RESUMO	08
	ABSTRACT.....	09
	LISTA DE FIGURAS.....	10
	LISTA DE TABELAS.....	11
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
	LISTA DE SIMBOLOS.....	13
1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Gênero <i>Salmonella</i>	18
2.2	Salmonelose em Pequenos Ruminantes.....	19
2.3	Formação de Biofilme por <i>Salmonella</i> spp.....	21
2.4	Resistência aos Antimicrobianos.....	23
2.5	Plantas Medicinais - Antimicrobianos Alternativos.....	24
2.6	<i>Hymenaea martiana</i> Hayne - Jatobá.....	26
2.7	<i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C. Sm. – Amburana.....	27
2.8	<i>Neoglaziovia variegata</i> (Arruda) Mez – Caroá.....	29
2.9	<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir. – Jurema-preta.....	30
2.10	<i>Pityrocarpa moniliformis</i> (BENTH.) LUCKOW & R. W. JOBSON – Angico-de-bezerro.....	32
2.11	<i>Simira gardneriana</i> M.R.V. Barbosa & Peixoto – Pereiro-de-Tinta.....	33
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo Geral.....	35
3.2	Objetivos Específicos.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	Local de Estudo.....	36
4.2	Isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	36

4.3	Material Vegetal.....	36
4.4	Extratos Vegetais.....	37
4.5	Verificação da Qualidade Microbiológica dos Extratos.....	37
4.6	Bioensaio da Atividade Antibacteriana <i>in vitro</i>	38
4.7	Quantificação de Biofilme para <i>Salmonella</i> spp.....	39
4.8	Interação do Extrato com o Biofilme Consolidado.....	40
4.8.1	Interação do Extrato com o Biofilme em Formação.....	40
4.9	Análise Estatística.....	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Bioensaio da Atividade Antibacteriana <i>in vitro</i>	42
5.1.2	Bioensaio da Atividade Antibacteriana <i>in vitro</i> - Método de Regressão Múltipla (Backward).....	43
5.1.2. 1	Análise da Significância Individual.....	43
5.1.2. 2	Análise da Significância Interação.....	44
5.1.3	Bioensaio da Atividade Antibacteriana <i>in vitro</i> - Método de regressão logística múltipla de efeitos individuais e interação entre as variáveis.....	44
5.1.3 .1	Análise Gráfica das Interações.....	45
5.2	Quantificação de Biofilme para <i>Salmonella</i> spp.....	46
6.2. 1	Interação do Extrato com o Biofilme em Formação.....	47
5.2. 2	Interação do Extrato com o Biofilme Consolidado.....	48
6	DISCUSSÃO.....	49
6.1	Bioensaio da Atividade Antibacteriana <i>in vitro</i>	49
6.2	Quantificação de Biofilme para <i>Salmonella</i> spp. e Interação do Extrato com o Biofilme em Formação e Consolidado.....	52
7	CONCLUSÃO.....	54
8	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

A criação de caprinos e ovinos vêm se destacando no cenário do agronegócio brasileiro. São estimados 14 milhões de animais, os quais estão distribuídos em 436 mil estabelecimentos agropecuários. Na região Nordeste encontra-se a maior parte do rebanho caprino, compreendendo os estados da Bahia, Pernambuco, Piauí e Ceará. A ovinocultura tem maior representatividade nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2013).

As doenças de origem infecciosa e/ou parasitária constituem um sério entrave ao desenvolvimento da caprino-ovinocultura, pelas perdas na produção animal, com grande repercussão econômica. Nesse contexto, surgem as enfermidades causadas por bactérias, que representam uma ameaça ao desenvolvimento da caprino-ovinocultura brasileira (EMPARN, 2006).

O uso indiscriminado das drogas antimicrobianas na produção animal é comum, trazendo importantes impactos ao meio ambiente e a saúde humana (GOULD et al., 2010). Nos últimos anos, a resistência dos micro-organismos patogênicos a múltiplos fármacos tem aumentado devido uso indiscriminado de antimicrobianos em animais, como promotores de crescimento e no tratamento de doenças infecciosas (PAPHITOU, 2013; TOUTAIN e BOUSQUET-MELOU, 2013). Estas ações podem contribuir para o aumento da resistência aos antimicrobianos em seres humanos, bem como a presença destes resíduos na carne e derivados (FULLER, 1989).

O surgimento de micro-organismos resistentes a antimicrobianos demonstra que o tratamento dos animais não deve se basear no uso de antimicrobianos sem reflexão crítica. A multirresistência às drogas antimicrobianas em *Salmonella* spp. é um assunto de grande interesse a comunidade científica, visto seu potencial de transmissão aos seres humanos pelos alimentos (MOLLA et al., 2007). A formação de biofilme pelos micro-organismos é uma estratégia que contribui para reduzir a susceptibilidade aos antibióticos e desinfetantes, tornando a sua eliminação um grande desafio (MULCAHY, CHARRON-MAZENOD e LEWENZA, 2008; SIMÕES e VIEIRA, 2009).

Devido à crescente resistência microbiana aos fármacos, a busca de novos agentes antimicrobianos a partir de plantas é intensa (RADULOVIC et al., 2013), principalmente devido aos menores custos de pesquisa, provavelmente por apresentar menor risco de efeitos colaterais e um grande potencial de efeito sinérgico (SALEEM et al., 2010; VUUREN e VILJOEN, 2011).

Essa situação tem estimulado cada vez mais os pesquisadores, que buscam novos compostos em diferentes fontes. Os vegetais por terem potencial antimicrobiano e uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos químicos, tem se tornando um importante objeto de estudo científico com relação às suas variadas propriedades medicinais (NOVAIS et al., 2003). O interesse na diversidade molecular das plantas tem estimulado a busca pelo conhecimento do seu metabolismo secundário, o qual é responsável pela síntese de grande parte dos compostos vegetais com atividade biológica, bem como seus derivados que tem sido alvo de investigação a respeito de suas propriedades medicinais, aromáticas e curativas (ALVES, 2001).

A região Nordeste do Brasil abriga em seu ecossistema, uma grande biodiversidade, com um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas não encontradas em outras regiões do globo. Desta forma, diante do potencial botânico da Caatinga e da necessidade de se encontrar novos compostos capazes de controlar a ação de micro-organismos, buscou-se realizar um trabalho que viabilize um maior conhecimento das espécies existentes na região. Tendo em vista as infecções por *Salmonella* em pequenos ruminantes, a preocupação com a resistência aos antimicrobianos e a formação de biofilmes, por estas bactérias, torna-se de grande importância a realização deste estudo que vise avaliar a possível ação antimicrobiana dos extratos vegetais da Caatinga, (Caroá) *Neoglaziovia variegata*; (Amburana) *Amburana cearenses*; (Jatobá) *Hymenaea martiana*; (Jurema-preta) *Mimosa tenuiflora*; (Angico-de-bezerro) *Pityrocarpa moniliformis* e (Pereiro-de-tinta) *Simira gardneriana* sobre *Salmonella* spp.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2. 1 Gênero *Salmonella*

Salmonella é um gênero da família Enterobacteriaceae, definido como bastonetes gram-negativos, não esporogênicos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies, *Salmonella bongori* e *S. enterica*, sendo que a última inclui seis subespécies, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. enterica*, *S. houtenae*, *S. indica* e *S. salamae* (TINDALL et al., 2005). Existem no total 2.610 diferentes sorovares de *Salmonella*, das quais 1.547 pertencem ao grupo *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Essas bactérias estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser encontradas na água, frutas, grãos, flores, árvores e no trato gastrointestinal do homem e de vários mamíferos, além de répteis, aves e insetos (HOLT et al., 1994; CDC, 2002).

As colônias do gênero *Salmonella* em ágar sangue medem 1 a 3 mm após incubadas durante 24 horas a 37°C, variando muito na forma, podendo ser lisas, circulares, convexas e achatadas. Não são hemolíticas. Os meios seletivos de enriquecimento mais usados são caldo Selenito-cistina, que contém cistina para estimular o crescimento das Salmonelas; caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), que contém verde malaquita, cloreto de magnésio e um pH ligeiramente reduzido como fator seletivo; e o caldo Tetracionato Muller-Kauffman, contendo verde brilhante, tetracionato e bile. Já os meios seletivos sólidos mais usados são ágar Xilose Lisina Deoxicolato (XLD), ágar SS (Salmonella-Shigella), ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BV/BPLS), e o ágar Deoxicolato Citrato Lactose Sacarose (DCLS). No ágar MacConkey, as colônias se apresentam incolores, pois não fermentam a lactose, em 24 horas de incubação a 37°C (OLIVEIRA, 2012).

Em estudos realizados na Inglaterra, País de Gales e Austrália, a salmonelose é considerada como a principal doença transmitida por alimentos juntamente com a infecção pelo gênero *Campylobacter*. Nos Estados Unidos estima-se que o gênero *Salmonella* seja responsável por 11% (1,0 milhão) dos casos de doenças transmitidas por alimentos notificados, além de 35% dos

casos que resultam em hospitalização e 28% dos óbitos em decorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos - DTAs (SCALLAN et al., 2011).

No Brasil, segundo dados epidemiológicos da ANVISA o sorovar *S. enteritidis* possui a maior taxa de prevalência nos surtos de salmonelose em humanos (BRASIL, 2011), sendo o mesmo reportado pelo “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) em Atlanta e pelo Centro de Referência “Robert Koch Institute” na Alemanha (RABSCH et al., 2001).

O agente etiológico mais prevalente em surtos alimentares são *Salmonella* spp. seguido de *Staphylococcus aureus*. As regiões aonde mais ocorrem os surtos são a região sul e sudeste do Brasil com maior notificação de surtos alimentares, a região sul com 42,1%, sudeste com 37,3% e nordeste com 12%, no período de 2000 a 2011 (BRASIL, 2011). *Salmonella* é o principal agente identificado em DTAs, responsável por 19,16% dos casos entre 2000 a 2011, com 1660 casos confirmados (SVS, 2011). Em humanos as doenças mais comuns causadas por salmonelas são a febre tifóide e as gastroenterites (MADIGAN et al., 2010).

2. 2 Salmonelose em Pequenos Ruminantes

As infecções pelo gênero *Salmonella* em animais de produção estão associadas a uma grande variedade de manifestações clínicas entéricas e extra-entericas (RADOSTITS et al., 2007), com sinais clínicos e severidade variável, dependendo da faixa etária dos animais e principalmente pelos sorotipos envolvidos (UZZAU et al., 2001). Os sorovares *Abortusovis*, *Dublin* e *Typhimurium*, que estão associados com a doença em ovelhas (JACK , 1971).

Os caprinos e ovinos podem apresentar a salmonelose na forma subclínica ou latente, sendo apenas portadores de salmonelas (WOLDEMARIAN et al., 2005; MILNES et al., 2008; BONKE et al., 2012). Porém, fatores como estresse, transporte, superlotação, prenhez, temperatura ambiental extrema, privação de água podem ativar a doença para a forma clínica (QUINN et al., 2005), principalmente quando estão associadas a infecções intercorrentes e doenças secundárias e influenciadas pelo número de salmonelas ingeridas, da virulência do sorotipo e da suscetibilidade do hospedeiro, podendo levar a altas taxas de mortalidade em ovelhas,

associadas a retenção da placenta (UZZAU, BOSSI, FIGUEROA-BOSSI, 2002). A mortalidade dos animais decorrente de infecções por *Salmonella* geram grandes perdas econômicas, sendo o aborto um dos principais problemas na produção de pequenos ruminantes (RUSHTON, 2009).

Não existe um padrão de sinais clínicos característicos em rebanhos infectados por *Salmonella* spp. (SANDBERG et al., 2002). Porém, na salmonelose entérica aguda, comum em ovelhas adultas, é frequentemente observado nos animais: febre, anorexia, depressão e diarreia, enquanto que a septicemia é comum em animais jovens (SHARMA, et al., 2001; KUSILUKA, KAMBARAG, 1996).

O sorotipo *Abortusovis* pode levar à morte fetal, metrite, retenção de placenta, peritonite, sendo que as ovelhas infectadas podem apresentar febre, anorexia e depressão antes do aborto. Os sorotipos *Typhimurium* e *Dublin* também foram relatados, como causa de aborto, porém menos frequentes que os relatos por *Salmonella Abortusovis* (UZZAU et al., 2001; HABRUN, et al., 2006; JACK, 1968).

Os recém-nascidos morrem muitas vezes dentro de horas após o nascimento. Os cordeiros que sobrevivem por algumas semanas, podem manifestar poliartrite, pneumonia e diarreia severa. A infecção por *Salmonella Abortusovis* em ovelhas não prenhes e em carneiros é predominantemente assintomática, porém a sintomatologia venérea tem sido descrita, em alguns casos (UZZAU, BOSSI, FIGUEROA-BOSSI, 2002).

A prevalência de *Salmonella* entre pequenos ruminantes pode variar consideravelmente dependendo dos sorotipos, rebanhos e regiões geográficas. Surtos de *S. Abortusovis* em ovelhas foram relatados, na Suíça, em que as infecções pelo sorotipo *Abortusovis* contribuíram com até 70% de perdas no pós-parto entre 2003 e 2007 (BELLOY, 2009).

S. diarizonae é o agente causador da disenteria do inverno, uma doença comum em ovelhas, que também está associada à abortos e animais natimortos. A prevalência deste sorotipo em rebanhos ovinos da Noruega tem sido estimada em aproximadamente 12%, com a prevalência dentro do rebanho de 0-45% quando as amostras foram coletadas no matadouro e o estresse pode ter contribuído para o aumento da prevalência observada

(ALVSEIKE; SKJERVE, 2002). Segundo Edrington et al. (2009) a contaminação ambiental por *Salmonella* spp. é bastante elevada em fazendas. Estes autores relataram isolamento de *Salmonella* em 50% das amostras de lã, mas somente 7% nas amostras fecais coletadas de ovinos confinados nos EUA, indicando um importante papel de reservatórios ambientais.

2. 3 Formação de Biofilme por *Salmonella* spp.

O conhecimento sobre os biofilmes tem avançado, assim como as pesquisas que vêm sendo realizadas em muitas áreas relacionadas com a ecologia microbiana. A microbiologia moderna estuda os principais mecanismos fisiológicos e de controle entre as formas microbianas sésseis (biofilme) e planctônicas (livres) (CAPELLETI, 2006).

O biofilme microbiano é definido como uma associação de células bacterianas e fúngicas, fixadas às superfícies, bióticas ou abióticas, inclusas em uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas (LUCCHESI, 2006). Os biofilmes são constituídos tipicamente por água, micro-organismos, substâncias poliméricas extracelulares (EPS, *Extracellular Polymeric Substances*), substâncias dissolvidas, adsorvidas e partículas retidas (PEREIRA, 2001). Sendo as fímbrias e celulose os principais componentes da matriz em biofilmes de *Salmonella* spp. (COLLINSON et al., 1996).

A capacidade de um micro-organismo isolado em aderir ou não a uma superfície, formar ou se manter em biofilme está relacionada com o seu fenótipo e genótipo. Alguns aparatos celulares, quando presentes, como pili, flagelos e fímbrias, algumas proteínas da superfície, assim como sistemas *quorum sensing*, garantem um incontestável diferencial à bactéria, em nível de aderência e formação do biofilme (STOODLEY et al., 2002; BOARI, 2008).

Para ocorrer o desenvolvimento do biofilme, deve haver uma interação entre as células bacterianas, a superfície a qual elas vão se aderir e a composição do meio circundante (DAVEY e O'TOOLE, 2000; DONLAN, 2002; DUNNE, 2002; STOODLEY et al., 2002). As salmonelas conseguem formar biofilmes em várias superfícies abióticas, como plástico, borracha, cimento, vidro e aço inoxidável (JOSEPH et al., 2001; SOLANO et al., 2002; PROUTY e

GUNN, 2003; ARNOLD e YATES, 2009; HURRELL et al., 2009; MORETRO et al., 2009).

Diversos microrganismos podem participar de processos de adesão e gerar problemas de saúde pública e/ou de ordem econômica como: *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus sp.*, *Enterococcus faecium*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Alcaligenes* e *Flavobacterium* (CAIXETA, 2008; CAPELLETTI, 2006; LUCCHESI, 2006).

A formação do biofilme é uma estratégia dos micro-organismos para sua sobrevivência em ambientes com condições adversas (TRACHOO, 2003), podendo provocar uma alteração fenotípica de células planctônicas (vida livre) para a forma sésil. Células que crescem em biofilme expressam propriedades distintas das células planctônicas, uma destas é o aumento da resistência aos agentes antimicrobianos e biocidas (LECHEVALIER; CAWTHON; LEE, 1988; HOLAH et al., 1990; MOSTELLER; BISHOP, 1993; WALKER; ROGERS; KEEVIL, 1994; EGINTON et al., 1998; TRACHOO, 2003).

Esta resistência é, em parte, atribuída à matriz polimérica, pois parece funcionar como uma barreira protetora contra fatores agressivos externos, como os biocidas (PEREIRA, 2001). A elevada resistência de biofilmes bacterianos, pode ser explicada pela difusão limitada de agentes antimicrobianos por meio da matriz do biofilme, interações de agentes antimicrobianos com a matriz (células e polímeros), resistência mediada por enzimas, adaptação genética, níveis de atividade metabólica dentro do biofilme, e outros fatores inter-relacionados, como as barreiras de difusão, ultraestrutura da parede celular e atividade metabólica diferencial (CAIXETA, 2008).

Tal resistência gera um impacto negativo em várias atividades, podendo ocasionar perdas significativas nestas (SIMÕES, PEREIRA e VIEIRA, 2003). A formação da matriz pode atuar como um substrato para outros micro-organismos menos propensos a formação de biofilme, aumentando a probabilidade da sobrevivência destes e sua disseminação (LAPIDOT, ROMLING e YARON, 2006). A formação do biofilme pelas células bacterianas,

oferece tolerância ao estresse, contribuindo para reduzir a susceptibilidade aos antibióticos e desinfetantes, tornando a sua eliminação um grande desafio (MULCAHY, CHARRON-MAZENOD e LEWENZA, 2008; SIMÕES e VIEIRA, 2009).

2. 4 Resistência aos Antimicrobianos

Um número crescente de agentes infecciosos está se tornando cada vez mais resistentes aos compostos antimicrobianos comerciais (HANCOCK, NIJNIK, PHILPOTT et al. 2012). A necessidade de desenvolver novos medicamentos exige estratégias variadas, entre elas, a bioprospecção de metabólitos secundários produzidos por plantas medicinais (DIONISI; LOZADA; OLIVERA 2012; BENKO-ISEPPON e CROVELLA 2010).

Os antibióticos vegetais possuem uma estrutura química que difere daquela dos antibióticos sintéticos, podendo regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas (MICHELIN et al., 2005). O uso de antimicrobianos naturais, como temperos, condimentos e extratos vegetais, tende a ser uma alternativa interessante (SILVA et al., 2010).

A resistência antimicrobiana é uma questão importante, tanto na produção animal quanto na saúde pública (BARZA, 2002), o que também é relatado pela *World Health Organization*, 2009. Na Medicina Veterinária a utilização dos antimicrobianos tem como objetivo manter ou melhorar a saúde dos animais. Porém, em animais saudáveis é comum, o uso profilático de antimicrobianos, com o intuito de evitar alguma infecção que possa acarretar perdas na produtividade (PALERMO-NETO, 2011).

Os antimicrobianos também são utilizados como aditivo zootécnico melhorador de desempenho (promotor de crescimento), levando a um aumento da eficiência alimentar (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE; 2010). De acordo com a Instrução Normativa nº 26/2009, os antimicrobianos indicados como promotores de crescimento devem apresentar eficácia e segurança comprovada na quantidade e espécies alvo, para as quais o produto é indicado

(BRASIL, 2009a). Entretanto, a subdosagem de antimicrobianos usados como promotores de crescimento podem aumentar a chance de seleção de cepas resistentes de bactérias e levar ao surgimento de outras cepas multirresistentes (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE; 2010; SCHWARZ et al., 2010).

2. 5 Plantas Medicinais - Antimicrobianos Alternativos

Com o aumento da resistência bacteriana às múltiplas drogas antimicrobianas surge a preocupação e a procura de novas alternativas terapêuticas, como fonte importante para obtenção destes medicamentos. A atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais foi comprovada em vários estudos realizados em países que possuem uma flora diversificada (NOVAIS et al., 2003).

De acordo com a *World Health Organization*, os remédios extraídos de plantas são utilizados por 80% da população mundial, em especial nas áreas rurais dos países em desenvolvimento ou em locais em que a população não tem acesso ou condições de adquirir medicamentos. No Brasil, um número significativo de plantas é usado na forma de extratos brutos para o tratamento de infecções comuns embora, poucas evidências científicas sejam relatadas comprovando a eficácia desse tratamento (LIMA et al., 2006).

A estrutura química dos antibióticos vegetais diferem daqueles derivados de micro-organismos, podendo regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas (MICHELIN et al., 2005). As plantas são capazes de produzir diferentes substâncias tóxicas em grandes quantidades, aparentemente para sua defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. Muitas dessas substâncias são responsáveis pelas suas propriedades medicinais e aromáticas que são utilizadas na medicina popular e despertam interesse científico pelas suas atividades biológicas. No entanto, plantas utilizadas como medicamentos são xenobióticos e como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos até que se prove o contrário (LAPA et al., 2002).

O metabolismo das plantas é dividido em primário (ou de macromoléculas - proteínas, lipídios e carboidratos) que são amplamente distribuídos nos organismos vivos, e secundário (ou de micromoléculas - tais como, alcalóides, terpenóides e flavonóides) de ocorrência restrita, embora estes sejam essenciais para os organismos que os produzem (PERES, 2004; HASSANPOUR et al., 2011; RENSHENG e WEININ, 2011).

Os metabólitos secundários têm importantes funções ecológicas para as plantas, e são frequentemente associados a mecanismos de defesa contra agentes externos, como por exemplo, pragas, radiação solar, predação por micro-organismos, insetos, herbívoros e outros causadores de estresse. Para os seres humanos, estes compostos são importantes, por apresentarem várias propriedades terapêuticas: calmante, antiviral, contraceptivo, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e inseticida que são utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, químicas, alimentos e de cosméticos (GOTTLIEB, 1981; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010; MAFFEI; GERTSCH; APPENDINO, et al., 2011;. CARTAXO et al., 2010).

O uso de antimicrobianos naturais, como extratos vegetais tende a ser uma alternativa interessante para reduzir ou eliminar patógenos transmitidos por alimentos, possibilitando uma combinação com métodos já existentes (BURT, 2004; SILVA et al., 2010). Além disso, devido ao aumento de cepas bacterianas resistentes, houve um aumento no número de publicações sobre atividade antibacteriana de extrato de plantas (ELOFF, 1998).

Trabalhos realizados por Wiest et al., (2009) sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente a isolados de *Salmonella* spp., constataram dentre os extratos aquosos, alcoólicos/hidroalcoólicos de 86 plantas, em estudo, 58% apresentaram alguma inibição ou inativação sobre *Salmonella* spp.

2. 6 *Hymenaea martiana* Hayne – Jatobá

Hymenaea martiana Hayne, conhecida popularmente como Jatobá, Jataí e Jitaí, é uma árvore conhecida na região Nordeste do Brasil, típica dos biomas Cerrado e Caatinga, ocorre nos estados da Bahia, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Piauí, Goiás e Mato Grosso do Sul e no Distrito Federal (SIQUEIRA FILHO et al., 2009; RIBEIRO, 2010). As espécies do gênero *Hymenaea* também ocorrem na Floresta Amazônica, Floresta Atlântica e Pantanal (RIBEIRO, 2010). O gênero engloba 14 espécies, destas 12 ocorrem no Brasil, *Hymenaea aurea* Y.T. Lee & Langenh., *H. courbaril* L., *H. eriogyne* Benth., *H. intermedia* Ducke, *H. maranhensis* Y.T.Lee & Langenh., *H. martiana* Hayne, *H. oblongifolia* Huber, *H. parvifolia* Huber, *H. reticulata* Ducke, *H. rubriflora* Ducke, *H. stigonocarpa* Mart. ex Hayne e *H. velutina* Ducke (RIBEIRO, 2010).

As plantas do gênero *Hymenaea* são utilizadas na medicina tradicional brasileira para o tratamento de processos inflamatórios, infecções bacterianas, reumatismo e anemia (GAZZANEO, 2005; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007). Esta árvore é indicada para recuperação de áreas degradadas e arborização de jardins, parques e rodovias, sua madeira é utilizada na construção civil, carpintaria, marcenaria e no artesanato (SIQUEIRA-FILHO et al., 2009).

Esta planta é caracterizada por apresentar tronco com exsudado resinoso, podendo ser reconhecida por conter folhas bifolioladas, flores grandes com pétalas e frutos robustos, lenhosos e indeiscentes (QUEIROZ, 2009). O tronco exsuda uma resina, a qual é utilizada localmente na medicina popular para o tratamento de feridas, bronquite e distúrbios estomacais. Atividades biológicas de extratos desta espécie têm sido relatados. Em estudos anteriores observaram atividade anti-inflamatória relacionada com extrato hidroalcoólico obtido a partir da casca do Jatobá (MARSAIOLI; LEITÃO-FILHO; CAMPELLO, 1975).



Figura 1 – *Hymenaea martiana* Hayne – Jatobá
(Foto: J.A. Siqueira-Filho)

2. 7 *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. – Amburana

A *Amburana cearensis* (Alemão) AC Smith, pertence à família Fabaceae, conhecida como Cumaru, Amburana ou Amburana-de-cheiro, é uma árvore que atinge 10-12 m de altura (ANDRADE-LIMA, 1989). É encontrada no Brasil, nos estados de Pernambuco, Bahia, Sergipe, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo,

São Paulo, Minas Gerais, Distrito Federal e em outros países como Paraguai, Peru, Argentina e Bolívia (SIQUEIRA-FILHO et al., 2009).

Tem sido explorada para fabricação de móveis, esculturas e marcenaria, sendo listada como uma espécie ameaçada de extinção (HILTON-TAYLOR, 2000). Devido às suas propriedades medicamentosas, a casca e as sementes são utilizadas para o tratamento de tosse, asma, bronquite e coqueluche (BEZERRA; CANUTO; SILVEIRA; 2005). As sementes também são utilizadas para facilitar a digestão, tratar enxaquecas, cólicas e derrames. Suas folhas e frutos são palatáveis aos caprinos (SIQUEIRA-FILHO et al., 2009).



Figura 2 – *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. – Amburana
(Foto: J.A. Siqueira-Filho)

Estudos demonstraram atividade antiespasmódica, anti-inflamatória, antitussígena, bronco-dilatadora e analgésica do extrato hidroalcoólico (BRAGA, 1976; CORREA, 1984; LEAL, 1997; LEAL et al., 2003). A partir do tronco da casca de *A. cearensis* vários compostos foram isolados, incluindo cumarinas, flavonóides e os glicosídeos de fenol (CANUTO e SILVEIRA, 2006; BRAVO e SAUVAIN, 1999).

2. 8 *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez – Caroá



Figura 3 – *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez – Caroá
(Foto: J.A. Siqueira-Filho)

Neoglaziovia variegata pertence à família Bromeliaceae, subfamília Bromelioideae, é popularmente conhecida no Brasil como "Caroá". Esta espécie pode ser geralmente encontrada em regiões semiáridas do Nordeste do Brasil (PEREIRA; QUIRINO, 2008).

As sementes de *N. variegata* são difíceis de serem encontradas, devido ao hábito alimentar de alguns animais e pássaros que consomem as bagas verdes e principalmente, as maduras (XAVIER, 1982), dificultando assim a coleta na época ideal da maturação dos frutos (SILVEIRA et al., 2009).

O Caroá constitui uma das matérias-primas mais utilizadas para o artesanato na região semiárida do Brasil, gerando emprego e renda para muitas famílias. As folhas são usadas na extração de fibras para fabricação de cordas, chapéus, bolsas, tapetes, redes, redes de pesca e tecidos (SILVEIRA et al., 2011). No entanto, esta espécie tem sido coletada diretamente na Caatinga de forma extrativista, sem qualquer sistematização de cultivo, por isto praticamente desapareceu em algumas regiões (SILVEIRA et al., 2009).

2. 9 *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. – Jurema-preta

A jurema-preta é uma planta arbustiva encontrada em larga escala na Caatinga, é disseminada nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (OLIVEIRA et al., 1999).

Na medicina popular a casca do caule é a principal parte da planta utilizada no tratamento de diversas enfermidades como queimaduras e inflamações. No México, onde também é muito conhecida popularmente por “tepescohuite”, a *Mimosa tenuiflora* tem sido muito estudada quanto ao seu potencial terapêutico. Trabalhos realizados no México avaliando as propriedades antimicrobianas do caule de *M. tenuiflora* demonstraram a ação inibitória dos extratos aquoso e etanólico contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos dermatófitos (LOZOYA et al., 1989).

Devido à sua importância como forrageira no semiárido nordestino, estudos sobre a *Mimosa tenuiflora* têm sido mais direcionados para seu valor nutricional bem como ao seu caráter tóxico, fatores que interferem diretamente na produtividade animal. No nordeste do Brasil, a ingestão de *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta) tem sido associada a malformações congênitas, incluindo anomalias ósseas craniofaciais, malformações oculares em ovinos, caprinos e bovinos (MEDEIROS et al., 2005, NÓBREGA JÚNIOR et al., 2005, DANTAS et al., 2010). Casos espontâneos de anomalias congênitas também

são descritos em ovinos criados extensivamente no semiárido associados ao consumo de *M. tenuiflora* (DANTAS et al., 2010).

O efeito teratogênico é dose-dependente e a incidência, o tipo e a severidade da malformação dependem da composição do princípio ativo, do estágio da gestação em que ocorre a ingestão e da quantidade do teratôgeno ingerido (PANTER et al., 1998, WELCH et al., 2011). A ingestão de altas doses destes princípios ativos pode causar toxicidade materna resultando em morte embrionária ou fetal (PANTER et al., 1994; BERNARDI 2002; WELCH et al., 2011). O princípio ativo da *M. tenuiflora* é, ainda desconhecido, mas alguns autores relatam que os alcalóides derivados da triptamina já foram isolados em folhas e sementes (GARDNER et al., 2011).



Figura 4 – *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. – Jurema-preta
(Foto: J.A. Siqueira-Filho)

Dentre as espécies forrageiras destacam-se a jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret), e a jurema-branca (*Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke) abundantes na Caatinga e muito apreciadas como alimento por ovinos, caprinos e bovinos, principalmente na estação seca quando não há pastagens para sua alimentação. Porém, seu uso pelas populações locais vai além do seu

valor forrageiro, sendo utilizada também como madeira, carvão e usada na medicina caseira em tratamentos de queimaduras, acne, problemas de pele e ainda pelo seu potencial antimicrobiano, analgésico, regenerador de células, antitérmico e adstringente peitoral (MAIA, 2004).

2. 10 *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH.) LUCKOW & R. W. JOBSON – Angico-de-bezerro

Pityrocarpa moniliformis (= *Piptadenia moniliformis*) Benth (Leguminosae - Mimosoideae) é uma planta lenhosa do Nordeste do Brasil conhecida popularmente como Catanduva, Catanduba, Rama-de-bezerro (PI), Muquém, Angico-de-bezerro, Surucucu (BA), Quipembé (PE) (LORENZI, 2002; AZÊREDO, 2009). É frequentemente encontrada nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia e particularmente frequente no Vale do Rio São Francisco e em florestas secas na região de Sucre (Venezuela) (LORENZI, 2002; SILVA et al., 2012; TRENTIN et al., 2011).

O angico-de-bezerro é uma espécie pioneira, rústica e de rápido crescimento, indicada para reflorestamentos heterogêneos com fins preservacionistas. Devido ao pequeno porte que esta árvore atinge, sua madeira é utilizada em pequenas obras de construção civil, marcenaria leve, lenha e carvão (LORENZI, 2002). A apicultura da região Nordeste do Brasil tem como fonte as flores de plantas nativas, sendo esta espécie uma planta melífera de destaque e potencial. Suas flores são apreciadas pelas abelhas, fornecendo mel de excelente qualidade. Esta espécie também apresenta propriedades medicinais e fornece forragem para a caprinocultura e bovinocultura (SILVA et al., 2004).

Alguns pesquisadores mostraram que esta planta é uma fonte de compostos ativos com atividade antimicrobiana, antibacteriana, anti-biofilme e antioxidante (SILVA et al, 2011, 2012; TRENTIN et al, 2011). O elevado potencial da *Pityrocarpa moniliformis* está na sua grande diversidade de estrutura e propriedades físico-químicas (NEWMAN e CRAGG, 2012).



Figura 5 – *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH.) LUCKOW & R. W. JOBSON – Angico-de-bezerro (Foto: J.A. Siqueira-Filho)

2.11 *Simira gardneriana* M.R.V. Barbosa & Peixoto – Pereiro-de-Tinta

Simira gadneriana (Rubiaceae, Rondeletieae) é uma árvore pequena, que atinge de 4 - 7 m de altura. Ocorre em áreas com terreno arenoso e precipitação anual de 500-700 mm (BARBOSA & PEIXOTO, 2000; SIQUEIRA-FILHO et al., 2013).

Simira gardneriana M. R. Barbosa & A. L. Peixoto, havia sido previamente listada como endêmica para a Caatinga e mapeada em Prado (1991) sob *Simira* sp. Pode ser encontrada nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Piauí, em que é conhecida como Pereiro-de-Tinta ou Pereiro-Vermelho (SIQUEIRA-FILHO et al., 2013).

A madeira de *Simira gardneriana* é usada na construção civil e na produção de cercas. Durante a estação seca, pode ser utilizada como forragem para alimentação animal (BARBOSA & PEIXOTO, 2000).

Esta espécie está ameaçada de extinção e encontra-se presente na lista de espécies da Flora Brasileira, na categoria dados deficientes (SIQUEIRA-FILHO et al., 2013).



Figura 6 – *Simira gardneriana* M.R.V. Barbosa & Peixoto – Pereiro-de-Tinta
(Foto: J.A. Siqueira-Filho)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais de plantas da Caatinga frente a *Salmonella* spp. isoladas de fezes de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez (Caroá); *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. (Amburana); *Hymenaea martiana* Hayne (Jatobá); *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Jurema-preta); *Simira gardneriana* M.R.V. Barbosa & Peixoto (Pereiro-de-tinta); *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH.) LUCKOW & R. W. JOBSON (Angico-de-bezerro) frente às cepas de *Salmonella* spp. proveniente de fezes de caprinos e ovinos.

Quantificar a formação de biofilme pelos isolados de *Salmonella* spp.

Verificar a interação dos extratos vegetais com o biofilme em formação e consolidado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Estudo

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco, localizado no Campus de Ciências Agrárias, Rodovia BR 407, 12 Lote 543 - Projeto de Irrigação - Nilo Coelho - S/N C1 - Petrolina/PE - CEP: 56300-000.

4.2 Isolados de *Salmonella* spp.

Para as avaliações antimicrobianas foram utilizadas uma cepa bacteriana de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC): 14023 e sessenta isolados de *Salmonella* spp., 30 provenientes de caprinos e 30 de ovinos de raças diferentes. Estes isolados foram mantidos em ágar *Tryptone Soya Broth* (TSB) e incubados a 37°C por 24 h. Os animais eram provenientes de 12 propriedades e do Abatedouro Municipal de Petrolina (Latitude S09°23'55"; Longitude W40°30'03"), localizada na região do Submédio São Francisco, estado de Pernambuco. As amostras provenientes do abatedouro pertenciam a animais oriundos dos municípios de Dormentes-PE e Casa Nova-BA. Antes da coleta os animais foram avaliados clinicamente quanto a presença de sinais clínicos de diarreia, foram coletadas apenas amostras de animais assintomáticos.

4.3 Material Vegetal

O material vegetal para obtenção dos extratos vegetais foram cedidos pelo biólogo José Alves de Siqueira Filho. As plantas foram coletadas na cidade de Petrolina, Estado de Pernambuco, Brasil, no período de 2011 - 2012. As amostras foram identificadas por um botânico do Centro de Recuperação de Áreas Degradadas da Caatinga (CRAD) e as exsiccatas foram codificadas e depositadas no Herbário do Vale do São Francisco (HVASF) da Universidade Federal do Vale São Francisco.

4.4 Extratos Vegetais

Os extratos vegetais das seis plantas utilizadas no experimento, foram cedidos gentilmente pelos professores farmacêuticos Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida e Xirley Pereira Nunes, do Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais da Univasf. Estes extratos foram obtidos por dessecação em estufa com circulação forçada, com temperatura média de 40^oC, durante três dias, seguido de processamento em moinho, para obtenção de um material vegetal seco e pulverizado, o qual foi submetido à maceração exaustiva com etanol 95% em um recipiente de aço inoxidável. Após várias extrações, com intervalos de 72 horas, obteve-se o completo esgotamento do material vegetal. A solução extrativa passou então pela destilação do solvente, obtendo-se os seguintes extratos etanólicos bruto (EEB):

- 1- *Hymenaea martiana* Hayne (Jatobá): Extrato etanólico bruto da casca (EEB);
- 2- *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. (Amburana): Extrato etanólico bruto da casca (EEB);
- 3- *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez (Caroá): Extrato etanólico bruto das flores;
- 4- *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Jurema-preta) Extrato etanólico bruto da casca (EEB);
- 5- *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH.) LUCKOW & R. W. JOBSON (Angico-de-bezerra): Extrato etanólico bruto das folhas (EEB);
- 6- *Simira gardneriana* M.R.V. Barbosa & Peixoto (Pereiro-de-Tinta): Extrato etanólico bruto das folhas (EEB).

4.5 Verificação da Qualidade Microbiológica dos Extratos

Os extratos foram avaliados quanto à contaminação bacteriana e fúngica previamente aos testes antimicrobianos. Sendo que para determinação da presença de bactérias foi realizada semeadura em meio ágar triptona de soja

(TSA - trypticase soy agar) com incubação em estufa bacteriológica por 24 h a 35 °C. Para a determinação dos fungos foi utilizado o meio ágar Sabouraud com incubação à temperatura ambiente por cinco dias. Após a incubação observou-se o aparecimento ou não de colônias nos meios de cultura, o que indicaria contaminação bacteriana ou fúngica.

4. 6 Bioensaio da Atividade Antibacteriana *in vitro*

Para os bioensaios da atividade antibacteriana foram utilizadas os 60 isolados de *Salmonella* spp. e a ATCC 14023, disponíveis no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco. Utilizou-se como meio de cultura o caldo Mueller-Hinton (MH). O preparo do inóculo bacteriano foi realizado de acordo com a metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbio: Norma Aprovada – Sexta Edição (Normas do CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*) (NCCLS, 2003). A atividade antimicrobiana foi determinada por meio da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de *N. variegata*; *A. cearensis*; *H. martiana*; *M. tenuiflora*; *P. moniliformis* e *S. gardneriana* sobre as cepas bacterianas. Foi adicionado 1,25g do extrato etanólico a 50 mL de água destilada, obtendo-se uma solução de concentração de 25 mg/mL. A metodologia empregada foi a Microdiluição em Placa, baseando-se no protocolo M7-A7 do CLSI (CLSI, 2006), que consistiu na distribuição de 200 µL de caldo Muller-Hinton (MH) em placas de microtitulação. Em seguida foram adicionados 200 µL da solução estoque do extrato no primeiro poço, com posterior homogeneização, seguido de diluições seriadas, a fim de se obter as oito (08) concentrações finais: (1): 12.500 µg/mL; (2): 6.250 µg/mL; (3): 3.125 µg/mL; (4): 1.562,5 µg/mL; (5): 781,3 µg/mL; (6): 390,6 µg/mL; (7): 195,3 µg/mL e (8): 97,6 µg/mL. Na preparação do inóculo, colônias desenvolvidas em Ágar MH, foram utilizadas para obtenção de uma suspensão bacteriana com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland, resultando em uma suspensão contendo aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ células/mL. Esta solução foi então diluída (1:10) para obter o inóculo com

concentração de 10^7 células/mL. Quando cada poço da microplaca recebeu o inóculo, a concentração final ficou entre 5×10^5 e $7,5 \times 10^5$ células/mL (NCCLS, 2003). Desta suspensão, 10 μ L foram inoculados 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, foi retirada uma alíquota de 10 μ l, semeando-a na superfície de ágar MH e incubando por 24 h a 37 °C. A CBM é a menor concentração de um agente antimicrobiano que é capaz de causar danos irreversíveis à célula microbiana, impedindo o crescimento do micro-organismo (MAHBOUBI et al., 2012). Assim, a concentração bactericida mínima (CBM) foi definida como sendo a menor concentração do extrato etanólico em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Como controle positivo, foram utilizados poços contendo apenas bactérias e meio de cultura e como controle negativo poços contendo apenas meio de cultura. A coloração dos extratos dificulta a visualização da turvação na microplaca, por isto não foi realizada a concentração inibitória mínima (CIM), sendo considerados apenas os resultados da concentração bactericida mínima (CBM).

4. 7 Quantificação de Biofilme para *Salmonella* spp.

Cada isolado de *Salmonella* foi incubado overnight em TSB. Em seguida, do TSB diluído 1:10 foi retirado 200 μ l, adicionado em microplacas e incubados a 30°C durante 48h. Como controle negativo foram utilizados poços contendo apenas meio de cultura e como controle positivo a ATCC 14023. A determinação da formação do biofilme em placas de microdiluição foi realizada utilizando a coloração cristal violeta conforme descrito por Patel e Sharma (2010). Após 48h de incubação em microplaca, 200 μ l da cultura foi completamente removido por aspiração, e o poço foi lavado cinco vezes com água destilada estéril. As placas foram deixadas secar em temperatura ambiente durante 45 minutos, em seguida os poços foram corados com 200 μ l com solução de cristal violeta (0,41% de corante w/v) à temperatura ambiente durante 45 min. A solução de cristal violeta foi completamente removida por aspiração e os poços foram lavados cinco vezes com água destilada estéril. Depois de permitir que os poços fossem secos durante 45 min, 200 μ l de etanol

a 95% foi adicionado a cada poço, para dissolver o corante cristal violeta. A formação do biofilme no poço foi medida usando a densidade óptica (D.O.) de 600 nm (D.O. 600) utilizando um leitor de microplacas modelo EXPERT PLUS-UV. Com base na D.O. produzida pelos biofilmes, as estirpes bacterianas foram classificadas nas seguintes categorias: não produtora de biofilme, fraca, moderada ou forte produtoras de biofilme, como previamente descrito por (STEPANOVIC et al., 2000). A densidade óptica de corte (D.O.c) foi definida como três desvios padrão acima da média D.O. do controle negativo. As cepas foram classificadas da seguinte forma: $D.O. \leq D.O.c$ = não produtora de biofilme (NPB), $D.O.c < D.O. \leq (2 \times D.O.c)$ = fraca produtora de biofilme (FPB), $(2 \times D.O.c) < D.O. \leq (4 \times D.O.c)$ = moderada produtora de biofilme (MPB) e $(4 \times D.O.c) < D.O.$ = forte produtora de biofilme (FoPB). Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram calculados.

4.8 Interação do Extrato com o Biofilme Consolidado

A formação de biofilme em microplacas foi obtida a partir da incubação de 100 µl da suspensão bacteriana dos isolados de *Salmonella* que foram classificados com MPB (moderada produtora de biofilme) e/ou FoPB (forte produtora de biofilme) por 48 h a 30 °C. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com água destilada, para a remoção de células planctônicas, e então acrescidos de 100 µl do extrato (0,5 CBM), que apresentou a melhor ação bactericida no experimento, como descrito por Nostro et al., 2007, com algumas modificações. A densidade óptica (DO) foi determinada imediatamente após a adição do extrato (0 h) e (24 h) depois.

4.8.1 Interação do Extrato com o Biofilme em Formação

De acordo com os resultados obtidos da CBM, a concentração de 0,5 CBM foi utilizada sobre o biofilme em formação. Este ensaio foi realizado em microplacas. Os inóculos bacterianos classificados com MPB (moderada produtora de biofilme) e/ou FoPB (forte produtora de biofilme) foram cultivados em 10 ml de TSB diluído por 48 h a 30°C, sendo 100 µl acrescidos nos poços da placa, que previamente havia sido adicionada de 100 µl do extrato vegetal e

100 µl de meio de cultura nos controles. Após 48 h de incubação a 30°C, as placas foram submetidas à coloração com cristal violeta, acima descrita. Para a interpretação dos resultados as cepas foram classificadas da seguinte forma: $D.O. \leq D.O.c$ = não produtora de biofilme, $D.O.c < D.O. \leq (2 \times D.O.c)$ = fraca produtora de biofilme, $(2 \times D.O.c) < D.O. \leq (4 \times D.O.c)$ = moderada produtora de biofilme e $(4 \times D.O.c) < D.O.$ = forte produtora de biofilme. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram calculados (STEPANOVIC et al., 2000).

4.9 Análise Estatística

Os dados referentes ao Bioensaio da atividade antimicrobiana *in vitro* foram analisados adotando o modelo de regressão logística múltipla com interação, empregando-se SAS (versão 9.3) procedure logistic e o método de seleção de variáveis “passo atrás” (backward). Utilizou-se o teste qui-quadrado de Wald para verificar a significância dos parâmetros do modelo utilizado. Os 60 isolados de *Salmonella* spp.; Fonte/Origem das Salmonellas (1- Ovino, 2- Caprino e 3- ATCC); Extratos com atividade (1- *M. tenuiflora*, 2- *P. moniliformes*, 3- *A. cearenses*), as concentrações e a interação destes foram utilizados como parâmetros.

A análise de variância dos isolados quanto a produção de biofilme foi realizada através do procedure npar1way, opção anova do SAS. Para o biofilme consolidado foi realizada a análise de variância de classificação hierárquica, empregando-se o procedure glm do SAS.

5 RESULTADOS

5.1 Bioensaio da Atividade Antibacteriana *in vitro*

Os extratos de *M. tenuiflora* (Jurema-preta) e *P. moniliformes* (Angico-de-bezerro) em estudo apresentaram atividade antimicrobiana em 100% (n=60/60) dos isolados testados. Já o extrato de *A. cearensis* (Amburana) apresentou a menor atividade antimicrobiana 6,6% (4/60) entre os extratos que tiveram atividade, sendo que desses isolados sensíveis três eram provenientes de caprinos e um de ovino. Os extratos de *N. variegata* (Caroá), *H. martiana* (Jatobá), *S. gardneriana* (Pereiro-de-tinta) independente da concentração testada, não apresentaram atividade antimicrobiana sobre os isolados de *Salmonella* spp. utilizados no presente estudo.

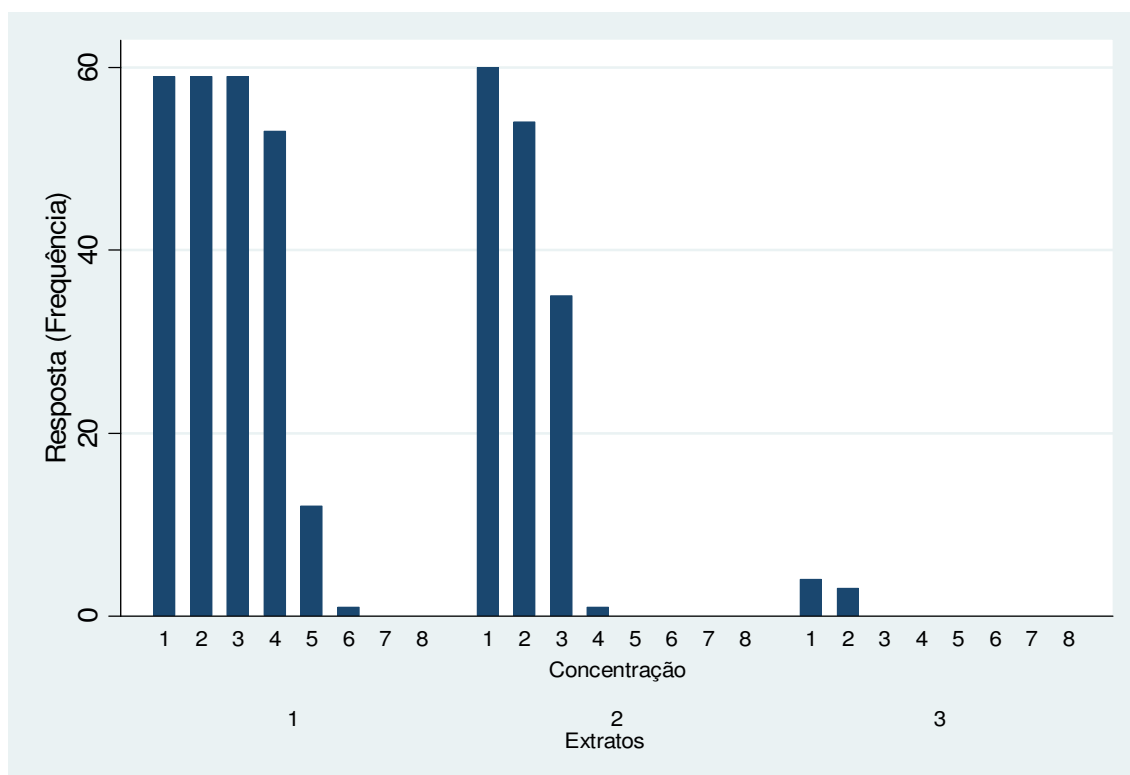


Figura 7 – Frequência de ação antimicrobiana de acordo com o extrato e concentrações utilizadas, (1): 12.500 µg/mL; (2): 6.250 µg/mL; (3): 3.125 µg/mL; (4): 1.562,5 µg/mL; (5): 781,3 µg/mL; (6): 390,6 µg/mL; (7): 195,3 µg/mL e (8): 97,6 µg/mL e os extratos: 1 - *M. tenuiflora* (Jurema-preta), 2- *P. moniliformes* (Angico-de-bezerro) e 3- *A. cearenses* (Amburana).

5.1.2 Bioensaio da Atividade Antibacteriana *in vitro* - Modelo de Regressão Logística Múltipla (Backward)

Na Tabela 1, observa-se a significância dos coeficientes ($p < 0,05$), após aplicação do modelo de regressão logística múltipla (backward), com efeitos individuais e efeitos de interação das variáveis.

Tabela 1- Análises das Estimativas de Máxima Verossimilhança

Parâmetros	gl	Estimativa dos Coeficientes	Erro padrão	Qui-quadrado de Wald	Prob > Qui-quadrado
Constante/Intercepto	1	-0,1770	1,0470	0,0286	0,8658
Isolado(X_1)	1	-0,1007	0,0252	15,9753	< 0,0001
Fonte(X_2)	1	1,5926	0,7617	4,3717	0,0365
Extratos(X_3)	1	-4,7115	0,8164	33,3016	<0,0001
Concentração(X_4)	1	0,00535	0,000628	72,7825	<0,0001
Isolado x Concentração($X_1 * X_4$)	1	0,000114	0,000017	42,3951	<0,0001
Fonte x Concentração($X_2 * X_4$)	1	-0,00147	0,000446	10,8189	0,0010
Extratos x Concentração($X_3 * X_4$)	1	-0,00148	0,000226	42,8549	<0,0001

gl: grau de liberdade

A significância individual dos coeficientes de regressão foi testada empregando a estatística de qui-quadrado de Wald (Tabela 1). De acordo com a Tabela 1 foram significativos os parâmetros: isolado, fonte, extratos, concentração e as interações: isolado x concentração, fonte x concentração e extratos x concentração ($p < 0,05$). O teste para a constante ($p > 0,05$) sugere que um modelo alternativo sem o intercepto pode ser aplicado aos dados.

5.1.2.1 Análise da Significância Individual

Em relação aos isolados de *Salmonella* spp. e fonte/origem das salmonelas, houve resposta diferenciada para cada um destes, influenciando na atividade antimicrobiana. Assim como houve resposta diferenciada para cada um dos extratos e as concentrações em estudo, influenciando diretamente a atividade antimicrobiana.

5.1.2.2 Análise da Significância Interação

A interação das variáveis: isolado x concentração, fonte x concentração, extrato x concentração, influenciaram conjuntamente na resposta diferenciada da atividade antimicrobiana.

5.1.3 Bioensaio da Atividade Antibacteriana *in vitro* - Método de regressão logística múltipla de efeitos individuais e interação entre as variáveis

Quando consideramos apenas o modelo logístico com efeitos individuais e de interação entre as variáveis: extrato e concentração, observou-se a significância dos coeficientes ($p < 0,001$), após aplicação do método de regressão múltipla, conforme representado na Tabela 2.

Tabela 2 - Análises das Estimativas de Máxima Verossimilhança para regressão logística múltipla de efeitos individuais e interação entre as variáveis

Parâmetros	gl	Estimativa dos Coeficientes	Erro padrão	Qui-quadrado de Wald	Prob > Qui-quadrado
Constante/Intercepto	1	-0,8463	0,7193	1,3844	0,2394
Extratos (X_3)	1	-2,8776	0,6291	20,9264	<0,0001
Concentração (X_4)	1	0,00390	0,000423	85,0173	<0,0001
Extratos x Concentração ($X_3 * X_4$)	1	-0,00087	0,000205	18,2051	<0,0001

gl: grau de liberdade

5.1.3.1 Análise Gráfica das Interações

A figura 8 representa as curvas de probabilidades de ação para os extratos vegetais 1, 2 e 3, em função das concentrações, quando considera-se o modelo logístico com efeitos individuais e de interação entre as variáveis, extrato e concentração. Observou-se que o extrato 1 (*M. tenuiflora*), tem maior probabilidade estimada de ação em concentrações menores, seguidos dos extratos 2 (*P. moniliformes*) e 3 (*A. cearenses*), o que sugere melhor ação antimicrobiana do extrato de *M. tenuiflora* em relação aos demais. O extrato 1 (*M. tenuiflora*) atinge a sua probabilidade estimada máxima de ação à partir da concentração 3.125 µg/mL, o extrato 2 (*P. moniliformes*) à partir de 6.250 µg/mL e o extrato 3 (*A. cearenses*) à partir de 12.500 µg/mL.

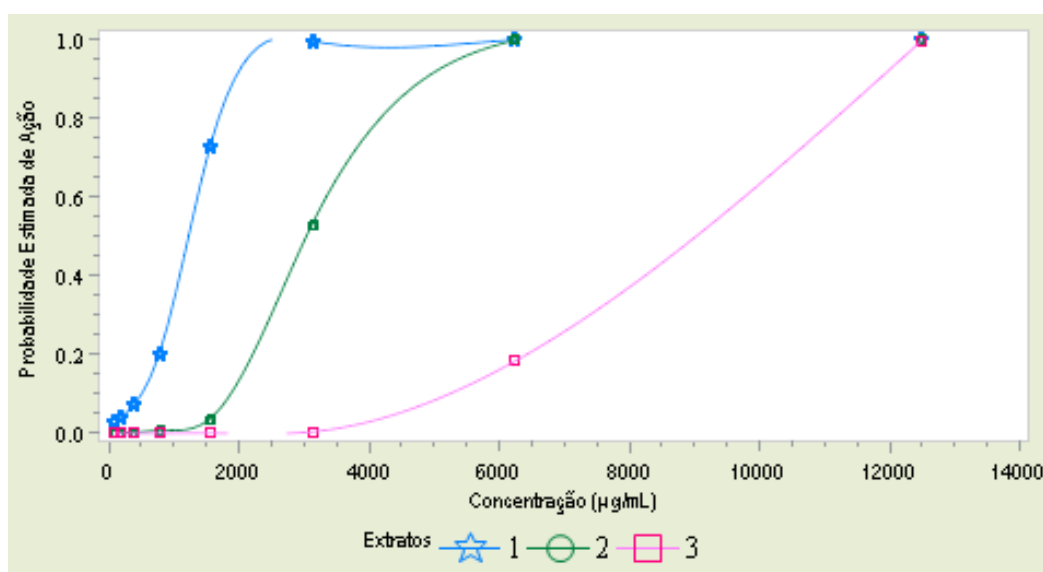


Figura 8 – Probabilidade de ação antimicrobiana dos extratos 1- *M. tenuiflora* (Jurema-preta), 2- *P. moniliformes* (Angico-de-bezerro), 3- *A. cearenses* (Amburana), em função das concentrações testadas.

A figura 9 representa as curvas de probabilidades de ação para as fontes 1, 2 e 3, em função das concentrações. Foi possível verificar que a probabilidade estimada de ação são aproximadamente iguais para as três fontes estudadas.

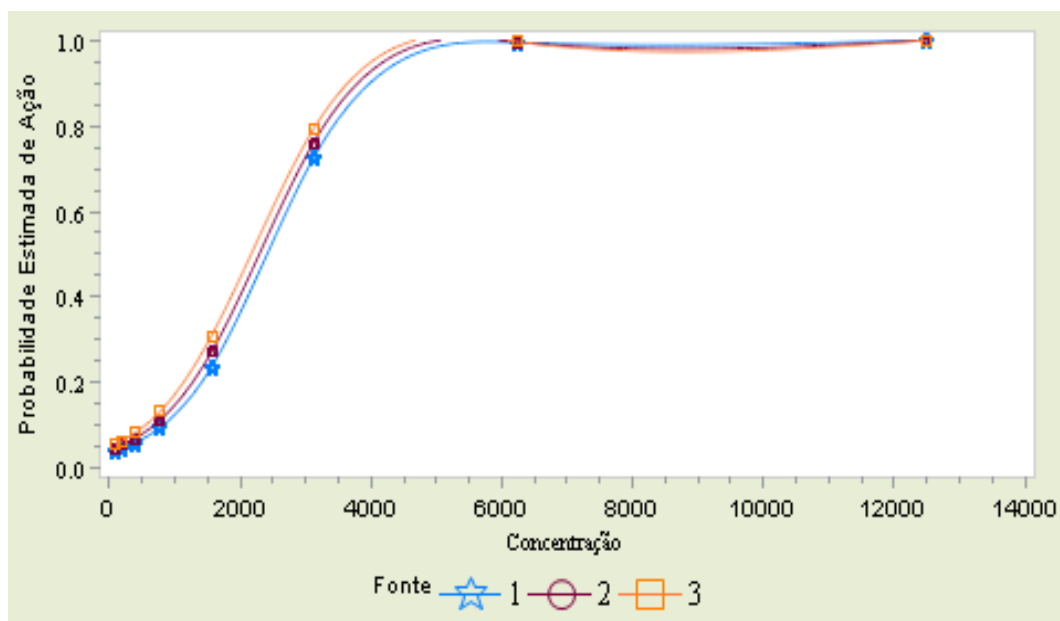


Figura 9 – Probabilidade de ação antimicrobiana em função das concentrações testadas no estudo de acordo com a fonte/origem dos isolados. (1): Ovino, (2): Caprino e (3) Bactéria de referência – ATCC.

5.2 Quantificação de Biofilme para *Salmonella* spp.

Os resultados da quantificação do biofilme para *Salmonella* spp. nas superfícies plásticas das microplacas revelaram que todos os isolados testados produziram biofilme no meio TSB diluído (1/10-TSB). As bactérias classificadas em NPB apresentaram $D.O \leq 0,055$; FPB $0,55 < D.O \leq 0,11$; MPB $0,11 < D.O \leq 0,22$; FoPB $> 0,22$. Na Tabela 3, observa-se a classificação dos isolados para a produção de biofilme.

Tabela 3 - Número de isolados de *Salmonella* spp. e suas classificações de acordo com a produção de biofilme.

Classificação	Nº de Isolados	Percentual (%)
Fraca Produção de Biofilme (FPB)	50	81,97
Moderada Produção de Biofilme (MPB)	11	18,03
Forte Produção de Biofilme (FoPB)	-	-
Não Produtor de Biofilme (NPB)	-	-
Total	61	100,00

Os 60 isolados de *Salmonella* e a ATCC foram classificadas em dois grupos: Fraca Produção de Biofilme (FPB) e Moderada Produção de Biofilme (MPB). De acordo com a fonte /origem, 50 isolados foram classificados com FPB, 28 de origem caprina, 21 ovina e 01 ATCC. Os 11 isolados classificados com MPB, 09 eram de origem ovina e 02 caprina. A análise de variância, na Tabela 4, demonstra diferença significativa entre bactérias, Prob > F (< 0,0001), concluindo que as bactérias diferem quanto à produção de Biofilme (Fraca Produção de Biofilme e Moderada Produção de Biofilme), mas não houve diferença entre as repetições.

Tabela 4 - Análise de variância dos isolados quanto à produção de biofilme.

Fonte de Variação	gl	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F	Prob > F
Entre Bactérias	60	0,109335	0,001822	12,3421	< 0,0001
Dentro de Bactérias (Repetições)	122	0,018013	0,000148		

gl: grau de liberdade

5.2.1 Interação do Extrato com o Biofilme em Formação

Os extratos de *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) e *Pityrocarpa moniliformis* (Angico-de-bezerro) apresentaram ação sobre o Biofilme em Formação nos 11 isolados de *Salmonella* com Moderada Produção de Biofilme, diminuindo a medida da densidade óptica, sendo estes isolados reclassificados em fraco e não produtores de biofilme.

A figura 10, representa a comparação dos extratos de 1-*Mimosa tenuiflora* e 2- *Pityrocarpa moniliformis*, em que se observou que o extrato 1 apresentou maior número de isolados reclassificados como Não Produtores de Biofilme, possuindo uma melhor ação anti-biofilme em relação ao extrato 2. O presente estudo demonstrou a capacidade dos extratos de *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) e *Pityrocarpa moniliformis* (Angico-de-bezerro) em interagir com o biofilme, diminuindo assim sua formação.

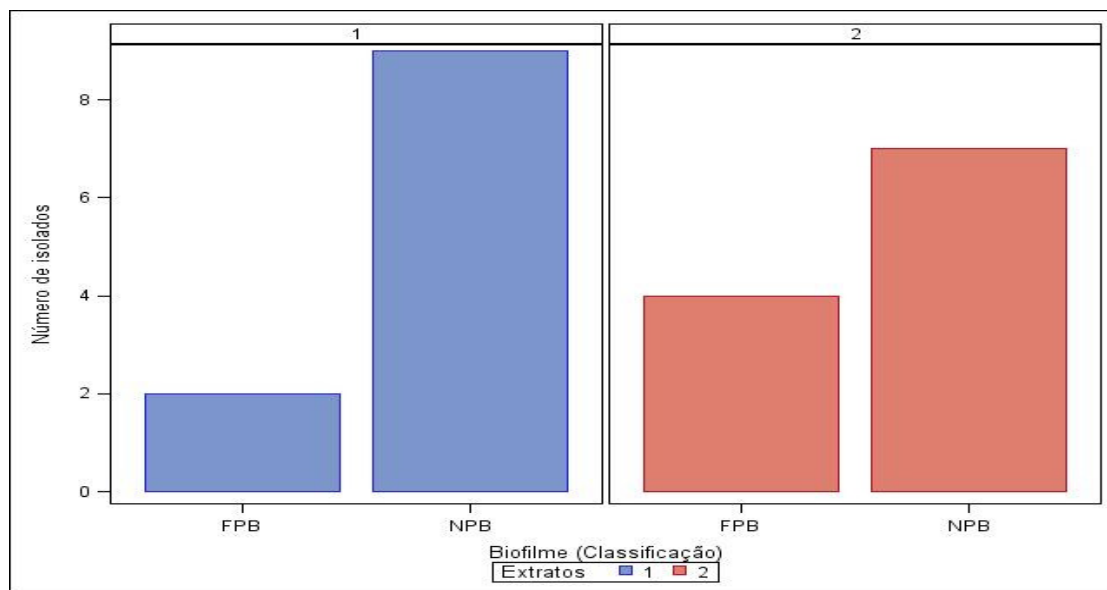


Figura 10 – Reclassificação dos isolados após tratamento com os extratos (1- *M. tenuiflora*, 2- *P. moniliformes*) sobre o Biofilme em Formação. (FPB) Fraca Produção de Biofilme e (NPB) Não Produtora de Biofilme.

5.2.2 Interação do Extrato com o Biofilme Consolidado

Os extratos de *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) e *Pityrocarpa moniliformis* (Angico-de-bezerro) não tiveram ação sobre o biofilme consolidado, pois não houve diferença significativa entre as densidades ópticas no tempo dentro de extratos, quando foi empregado o modelo de análise de variância de classificação hierárquica, conforme resultados que podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 - Análise de variância de classificação hierárquica (biofilme consolidado).

Fonte de Variação	gl	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F	Prob > F
Extrato	1	1,41462368	1,41462368	109,55	< 0,0001
Tempo	1	0,00664541	0,00664541	0,51	0,4746
Tempo (Extrato)	1	0,02399841	0,02399841	1,86	0,1754

gl: grau de liberdade

6 DISCUSSÃO

6.1 Bioensaio da Atividade Antibacteriana *in vitro*

Vários estudos têm demonstrado que as plantas da Caatinga são uma rica fonte de compostos de notável atividade antimicrobiana (DA SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2012). Assim, como os extratos das plantas *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) e *Pityrocarpa moniliformis* (Angico-de-bezerra) e *A. cearensis* (Amburana) que apresentaram atividade antimicrobiana sobre os isolados de *Salmonella* spp. provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco.

O extrato etanólico da jurema-preta (*M. tenuiflora*) apresentou a melhor atividade antimicrobiana quando avaliada no presente estudo. Trabalhos realizados por grupos de pesquisa mexicanos sugerem que muitas das atividades biológicas de *M. tenuiflora* se devem pela existência de compostos como os esteróides, terpenóides, alcalóides, flavonóides, taninos e outros compostos fenólicos (RIVERA-ARCE et al., 2007). Estes dados são promissores e incentivam novas pesquisas sobre os aspectos fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos de *M. tenuiflora*, com o objetivo de padronizar a sua utilização racional na terapia antimicrobiana de infecções por *Salmonella* spp.

Estudos fitoquímicos da plantas de *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) tem atraído bastante interesse, principalmente devido à presença de seus alcalóides e taninos (RIVERA-ARCE et al., 2007). Segundo Meckes-Lozoya et al. 1990; os taninos são, provavelmente, os principais compostos responsáveis pela maior parte da atividade antimicrobiana. Padilha, (2006); verificou a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) o qual apresentou potencial atividade sobre linhagens hospitalares de *Staphylococcus aureus*. Entretanto, o extrato de *Mimosa tenuiflora* a 10% apresentou atividade bactericida significativa sobre as linhagens estudadas por ele.

Figueiredo et al., (2013), indicaram que os extratos etanólicos de *Amburana cearensis* e *Anadenanthera macrocarpa* contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de referência e multirresistentes são uma fonte

alternativa natural com ação antibacteriana. Esta ação é justificada devido à presença de várias substâncias antibacterianas, que podem ser responsáveis pelos efeitos modulatórios que foram observados, indicando a possibilidade de utilização de produtos combinados com aminoglicosídeos para aumentar o potencial antimicrobiano das drogas contra micro-organismos multirresistentes.

Da Silva et al., em 2013, avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato das folhas e as frações de *P. moniliformis* contra os seguintes micro-organismos: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA02), *Micrococcus luteus* (UFPEDA100), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 414), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA416) e algumas estirpes de *S. aureus* (UFPEDA 660, UFPEDA 663, UFPEDA 676, UFPEDA 687, UFPEDA 712, UFPEDA 733) e observaram que o extrato hidroalcolico bruto inibiu apenas bactérias Gram-positivas. Outras frações deste extrato apresentaram atividade contra todos os microrganismos testados, com exceção de *E. coli*. Para *Salmonella enteritidis* as concentrações inibitórias foram de 12,5 mg/ml (acetato de etilo, ciclo-hexano e as frações de n-butanol) e 25 mg/ml (fração aquosa). Em outro estudo realizado por como SÁ et al., (2011), foi avaliado o extrato de *A. cearensis*, observaram atividade antimicrobiana sobre *E. coli* (166.7µg/mL), *Salmonella* spp. (145.8µg/mL) e *S. aureus* (145.8µg/mL).

Na literatura não foram encontrados relatos, sobre a utilização da *Simira gardneriana*, na medicina popular, nem trabalhos que avaliem a possível atividade antimicrobiana do extrato desta espécie. No entanto, no presente trabalho os extratos de *S. gardneriana*, *N. variegata*, *H. martiana*, não apresentaram atividade antimicrobiana sobre os isolados de *Salmonella* spp. pesquisados. Segundo VLIETINCK et al., (1995), RABE et al., (1997), LIN et al. (1999) e KELMANSON et al., (2000), muitas plantas com atividade antimicrobiana que já foram estudadas são ativas apenas contra cepas de bactérias Gram-positivas. URZUA et al., (1998) sugeriram que a membrana externa das bactérias Gram-negativas poderia agir como uma barreira contra as substâncias ativas presentes nos extratos de plantas. No entanto, vários autores encontraram extratos vegetais com atividade tanto para bactérias Gram-positivas como para as negativas (KHAN et al., 2009; KUETE et al.,

2010; AZIZ et al., 2011; STEFANOVIC e COMIC, 2012). O que foi verificado por Oliveira-Júnior et al., (2012), os quais demonstraram que o extrato etanólico de *N. variegata* apresentou atividade antibacteriana sobre a maior parte dos micro-organismos testados, especialmente para as cepas Gram-positivas: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, como também, atividade antimicrobiana sobre estirpes Gram-negativas: *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri* e principalmente, *Klebsiella pneumoniae*, sendo os flavonóides presentes nos extratos os possíveis responsáveis pela atividade antibacteriana apresentada na pesquisa (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2012).

Diferentemente do observado em nosso estudo, Almeida et al., 2012, demonstraram que o extrato etanólico de *N. variegata* apresentou atividade bactericida sobre *Salmonella enterica* (ATCC 10708) com CBM de 3.120 µg/mL, como também para outros micro-organismos, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Shigella flexneri* (ATCC 12022) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), sendo sugerido que os flavonóides presentes nos extratos podem ser responsáveis pela atividade antibacteriana apresentada. Os diferentes padrões de resistência observados em outros trabalhos pelas cepas dos micro-organismos, podem estar relacionadas com a origem das cepas e características inerentes ao gênero em estudo, assim como a composição química de algumas preparações vegetais influenciadas pela técnica da colheita, partes escolhidas, crescimento no ambiente, ciclo vegetativo, condições do solo e a sazonalidade. Estas diferenças nas técnicas empregadas para investigação da ação dos compostos, podem dificultar a comparação entre os estudos já realizados (SIVROUPOULOU et al., 1995; OSTROSKY et al., 2008; BOUADBELLI et al., 2012).

As concentrações de 500 µg/mL e 250 µg/mL de acordo com critérios sugeridos por Holetz et al., (2002) seriam de moderada atividade antimicrobiana. Fabry et al., (1998) e Sartoratto et al., (2004), consideraram critérios menos rigorosos, sendo que os extratos nas concentrações estudadas em nosso trabalho teriam uma forte atividade antimicrobiana. Evidencia-se, dessa maneira, a necessidade de estudos mais avançados, visando padronizar

a concentração aceitável da atividade antimicrobiana de extratos vegetais com potencial de aproveitamento para fitoterápicos ou para pesquisa de novas drogas antimicrobianas. Já que utilizamos concentrações finais máximas de 12.500 µg/mL e mínimas de 97,6 µg/mL.

6.2 Quantificação de Biofilme para *Salmonella* spp. e Interação do Extrato com o Biofilme em Formação e Consolidado

Todos os isolados de *Salmonella* spp. avaliados em nosso estudo produziram Biofilme, sendo classificados em dois grupos: Fraca Produção de Biofilme (FPB) 81,97% e Moderada Produção de Biofilme (MPB) 18,03%. Esta formação de biofilmes e à adesão bacteriana não dependem apenas da fisiologia do micro-organismo, da expressão de fatores de virulência, do estado fisiológico das células bacterianas no momento da análise, mas também da natureza do substrato, como as características físico-químicas, a área e o material da superfície (FLACH et al., (2005); MACEDO, 2006; MEDONLINE, (2008).

Dentre os outros fatores que influenciam a formação de biofilme, a composição do meio de cultura também é bastante importante (DEWANTI e WONG, 1995; HOOD e ZOTTOLA, 1997; GERSTEL e ROMLING 2001; STEPANOVIC et al. 2003), mas ainda pouco compreendida (DONLAN, 2002). Hood e Zottola (1997), avaliaram a formação de biofilme bacteriano para cinco diferentes espécies e verificaram que para cada microrganismo testado o meio de cultura induziu diferentes produções de biofilme. Segundo Stepanovic et al. 2004, o meio TSB Diluído (1/10-TSB) utilizado no nosso trabalho também foi o meio mais eficaz na produção de biofilme testado em cepas de *Salmonella* spp. Este meio de cultura possui poucos nutrientes, o que pode gerar um ambiente hostil para a sobrevivência destas bactérias, estimulando a produção de biofilme por elas. Geralmente, *Salmonella typhimurium* produz mais biofilme em meios com limitada quantidade de nutrientes, diferentemente da *L. monocytogenes* que intensifica sua produção em meios mais ricos (HOOD e ZOTTOLA (1997). Stepanovic, et al., (2004), verificaram que independentemente da composição do meio de cultura, a produção de Biofilme

pelas cepas de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* foram classificadas apenas como moderadas ou fracas produtoras de biofilme, assim como os resultados obtidos neste estudo.

Os extratos de *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) e *Pityrocarpa moniliformis* (Angico-de-bezerro) tiveram ação sobre o biofilme em formação. A atividade anti-biofilme de óleos essenciais e do carvacrol sobre o biofilme de *Salmonella Typhimurim* foi demonstrado por Soni et al. (2013), sendo esta capacidade dependente da concentração do agente antimicrobiano utilizado. Entretanto os extratos testados não apresentaram ação sobre o biofilme consolidado, o que pode ser justificado pela forte adesão gerada pelas bactérias à superfície, dificultando a remoção de biofilmes já constituídos (MEDONLINE, 2008).

A composição destas comunidades em biofilme oferece mais proteção aos micro-organismos com estilo de vida sésil, que resistem mais aos agentes empregados nos procedimentos de higienização, podendo ser até mil vezes mais resistentes que as células planctônicas (DRENKARD, 2003). A rede de EPS seria uma das grandes responsáveis por conferir esta proteção, agindo como barreira física, impedindo que os agentes sanitizantes cheguem a seus sítios de ação, como à membrana externa em bactérias Gram-negativas, por exemplo. O EPS é também capaz de adsorver cátions, metais e toxinas e conferir proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação. Conhecer as condições que propiciam a sua formação e as suas fragilidades é fundamental para que estratégias de controle, mais econômicas e eficazes, sejam direcionadas para a eliminação da introdução destes micro-organismos na cadeia alimentar (HERRERA et al., 2007).

7 CONCLUSÕES

Os extratos de *Amburana cearenses* (Amburana) e principalmente *Mimosa tenuiflora* (Jurema-preta) e *Pityrocarpa moniliformis* (Angico-de-bezerro) apresentaram atividade antimicrobiana sobre os isolados de *Salmonella* spp. obtidos de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco, podendo ser uma alternativa terapêutica.

Os extratos de *M. tenuiflora*, *P. moniliformes* podem ter importantes aplicações para implementação de estratégias como agentes de suporte aos antimicrobianos e ação anti-biofilme em formação, sendo alternativas promissoras para combater micro-organismos patogênicos, particularmente *Salmonella* spp.

São necessários outros estudos para a verificação do isolamento, identificação, toxicidade de compostos ativos responsáveis pela atividade antimicrobiana das plantas e aprimorar a técnica de verificação da produção de biofilme por *Salmonella* spp. A compreensão do mecanismo de sinergismo é fundamental, para o uso com sucesso, das plantas medicinais no tratamento de infecções causadas por bactérias.

8 REFERÊNCIAS

AGRA, M.F; FREITAS, P.F. ; BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal Pharmacognosy**, v.17, n.1, 114-140, mar.2007.

ALVES, H.M. **Plantas como fonte de fitofármacos**. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola. n 3, p. 01-06. 2001. Disponível em: <<http://sbqensino.foco.fae.ufmg.br>>. Acesso em: 16 fev. 2013.

ALBUQUERQUE, U.P. et al. Caatinga revisited: ecology and conservation of an important seasonal dry forest. **The Scientific World Journal**, n.1, p.1-18, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415163/>>. Acesso em: fev.2013.

ALMEIDA, CFCBR. et al. Comparative study of the antimicrobial activity of native and exotic plants from the Caatinga and Atlantic Forest selected through an ethnobotanical survey. **Pharmaceutical Biology**. v.50, n.2, p.201–220, fev.2012.

ALMEIDA, JRGS. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n.10, p. 4489-4494, 2012.

ANDRADE-LIMA, D. **Plantas da Caatinga**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1989. 243p.

ALVSEIKE, O; SKJERVE, E. Prevalence of a *Salmonella* subspecies diarizonae in Norwegian sheep herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 52, n.3-4, p.277-285, 2002.

ARNOLD, J.W.; YATES, I.E. Interventions for control of *Salmonella*: clearance of microbial growth from rubber picker fingers. **Poultry Science**, v. 88, n. 6, p. 1292-1298, Junho 2009.

AZIZ ABD, S.M. et al. Screening of selected Malaysian plants against several food borne pathogen bacteria. **International Food Research Journal**, v.18, n.3, p.1195-1201, 2011.

AZÊREDO, G. A. **Qualidade fisiológica de sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth.** 2009.121f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

BARBOSA, M. R. V.; PEIXOTO, A.L. A new species of *Simira* (Rubiaceae, Rondeletieae) from Northeastern Brazil. **Novon**, v.10, n.2, p.110-112, 2000. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/3393006>>. Acesso em: jan.2013.

BARZA, M. Potential mechanisms of increased disease in humans from antimicrobial resistance in food animals. **Clinical Infectious Diseases**, n.34, p.123–125, 2002. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/content/34/Supplement_3/S123.full.pdf+html>. Acesso em: fev.2013.

BELLOU, L. et al. Diagnosis by culture and PCR of *Salmonella Abortusovis* infection under clinical conditions in aborting sheep in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v.138, n.3- 4, p.373-377, set.2009.

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

BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal, p.692-699. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. (Eds), **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2002. 752p.

BEZERRA A. M. E., K. M. CANUTO, AND E. R. SILVEIRA. Estudo fitoquímico de espécimes jovens de *Amburana cearensis* A. C. Smith. In. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 29, 2005. Águas de Lindóia,SP: SBQ, 2005.

BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**, 2008. 80 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.

BONKE, R. et. al. High prevalence of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* in tonsils of sheep at slaughter. **Food Research International**, v. 45, p. 880–884, 2012.

BOUABDELLI, F. et al. Antimicrobial activity of 22 plants used in urolithiasis medicine in Western Algeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, supl. 1, p. 530-535, 2012.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste especialmente do Ceará**. 3.ed. Fortaleza, CE: Imprensa Oficial, 1976. p. 219.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dados Epidemiológicos – DTA**: período de 2000 a 2011. 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_periodo_2000_2011_site.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2013.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Análise Epidemiológica de Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, 2008. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/DTA.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº26/2009**. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/produtos-veterinarios/legislacao>>. Acesso em: mai.2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Caprinos e ovinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>>. Acesso em: 24 set. 2013.

BRAVO, B.; SAUVAIN, M. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v.50, n.1, p. 71-74, 1999.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 94, p.223 – 253, 2004.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CANUTO, K.M.; SILVEIRA, E.R. Chemical constituents of trunk bark of *Amburana cearensis* (A.C. Smith). **Química Nova**, v.29, p.1-3, 2006.

CAPELLETTI, Raquel Vannucci. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

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

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Newport United States: January-April 2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 51, n.25, p. 545-548, jun.2002. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5125a1.htm>>. Acesso em: jan.2013.

COLLINSON, S.K. et al. Salmonella enteritidis agfBAC operon encoding thin aggregative fimbriae. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.3, p.662–667, 1996.

CORREIA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, 1984. p. 266-267.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M100, S16 - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth Informational supplement**. Wayne, PA (USA): CLSI, 2006. Disponível em: <<http://isoforlab.com/phocadownload/csl/M100-S16.pdf>>. Acesso em: jan.2013.

DANTAS, A.F.M. et al. Malformações congênitas em ruminantes no semiárido do Nordeste Brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.10, p.807-815, 2010. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v30n10/a02v30n10.pdf>>. Acesso em: fev.2013.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.847–867, 2000.

DEWANTI, R.; WONG, A.C. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p.147–164, 1995.

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

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.9, p.881–890, 2002.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and infection**, v. 5, n. 3, p.1213-1219, 2003.

DUNNE, W.M. Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p.155–166, 2002.

EDRINGTON, T.S. et al. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* isolated from feedlot lambs. **Journal of food protection**, v.72, n.8, p.1713-1717, 2009.

EGINTON, P.J. et al. Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. **Letters in applied microbiology**, v.27, n.2, p.101-105, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9750331>>. Acesso em: dez. 2012.

ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extracts for bacteria. **Planta Médica**, v.64, n.8, p.711- 713, 1998.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO RIO GRANDE DO NORTE. **Manejo sanitário de caprinos e ovinos**. Natal, RN: EMPARN, 2006.

FABRY, W.; OKEMO, P.O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n.1, p.79-84, feb.1998.

FIGUEIREDO, F. G. et al. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, v. 2013, Article ID 640682. 5p. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/640682/>. Acesso em: jan.2013.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p.291-296, 2005.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Extratos Vegetais**. 2010. Disponível em: <<http://www.revistafi.com/materias/120.pdf>> Acesso em: 12 ago. 2013.

FULLER, R. Probiotics in man and animals: a review. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-78, 1989.

GARDNER, D.R.; RIET-CORREA, F.; PANTER K.E. Alkaloid profiles of *Mimosa tenuiflora* and associated methods of analysis. In: RIET-CORREA, F. et al (Eds). **Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related toxins**. Wallingford, UK: CAB International, 2011. p. 600-605.

GAZZANEO, L.R.S; LUCENA, R.F.P.; ALBUQUERQUE, U.P. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v.1, n.9, p.1-8, nov.2005.

GERSTEL, U.; ROMLING, U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. **Environmental Microbiology**, v.3, n.10, p.638–648, 2001.

GOTTLIEB, O. New and underutilized plants in the Americas: Solution to problems of inventory through systematics. **Interciência**, v. 6, n. 1, p. 22-29, 1981.

GOULD, I.M. Coping with antibiotic resistance: the impending crisis. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.36, Suppl.3, p.1–2, 2010.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em Veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 276p.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003 – 2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v.161, n.1, p. 26-29, jan./feb. 2010.

HABRUN, B. et al. An outbreak of *Salmonella Abortusovis* abortions in sheep in south Croatia. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, v.53, n.6, p.286-290, 2006.

HANCOCK, R.E.; NIJNIK, A.; PHILPOTT, D.J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. **Nature reviews Microbiology**, v.10, p.243–254, 2012.

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

HERRERA, J. J. R. et al. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 585-591, 2007.

HILTON-TAYLOR C. **The IUCN Red List of threatened Species**. Cambridge, UK: IUCN, 2000.

HOLAH, J.T. et al. A conductance based surface disinfectant test for food hygiene. **Letters in applied microbiology**, v. 11, p.255-260, 1990.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOLT, J.G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 787, 1994.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.145–153, 1997.

HURRELL, E. et al. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other Enterobacteriaceae. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, p.227-231, 2009.

JACK, E. J. *Salmonella abortusovis*: an atypical *Salmonella*. **Veterinary Record**, v.82, p.558–561, 1968.

JACK, E. J. *Salmonella* abortion in sheep. **Veterinary Annual**, v.12, p.57–63, 1971.

- JOSEPH, B. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.367-372, 2001.
- KELMANSON, J.E.; JAGER, A.K.; VAN STADEN, J. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 241–246. 2000.
- KHAN, R. et al. Antimicrobial Activity of Five Herbal Extracts Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains of Bacteria and Fungus of Clinical Origin. **Molecules**, v.14, p. 586-597, 2009.
- KUETE, V. et al. Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 536-542, 2010.
- KUSILUKA, L.; KAMBARAG, D. **Diseases of small ruminants: a handbook**. In Common Diseases of sheep and goats in Sub-Saharan Africa. Roslin: VETAID: Overseas Development Administration Animal Health Program, 1996.
- LAPA, A.J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade, 2002. p.183-199.
- LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, n.3, p.229-233, 2006.
- LEAL, L. K. A. M. et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine**, v.4, n. 3, p.221–227, 1997.
- LEAL, L. K. et al. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytotherapy Research**, v.17, n.4, p.335–340, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.1139/pdf>>. Acesso em: ago.2013.
- LECHEVALIER, M. W.; CAWTHON, C. D.; LEE, R. G. Factor promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.3, p.649-654, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202520/pdf/aem00108-0033.pdf> Acesso em: ago.2013.
- LIMA, M.R.F. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, n.1-2, p.137- 147, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.10.026>>. Acesso em: set. 2013.

LIN, J. et al. Preliminary screening of some traditional zulu medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n. 267-274, 1999. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00130-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00130-0)>. Acesso em:

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5.ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2002. v.1, 368p.

LOZOYA, X. et al. Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (Willd) poir (tepescohuite) I - Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. **Archivos de Investigación Médica**, v. 20, n.1, p.87-93, jan./mar.1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2764672>>. Acesso em: ago.13.

LUCCHESI, Eliane Gama. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

MACEDO, Jorge Antônio Barros. **Biofilmes Bacterianos**: uma preocupação para a indústria de alimentos. 18 de julho de 2006. Disponível em: <http://www.milknet.com.br/?pg=artigos_tecnicos&id=7&local=1>. Acesso em 10 de setembro de 2013.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.398-444.

MAFFEI, M.E; GERTSCH, J.; APPENDINO, G. Plant volatiles: Production function and pharmacology. **Natural product reports**, v.28, n.8, p.1359-1380, aug. 2011.

MAHBOUBI, A, et al. Evaluation of antibacterial activity of three Iranian medicinal plants. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, p.2048-2052, mar.2012. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/article/article1380711585_Mahboubi%20et%20al.pdf>. Acesso em: jun.2013.

MAIA, G. N. **Caatinga**: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo, SP: Leitura & Arte, 2004. p.237-246.

MARSAIOLI, A.J; LEITÃO-FILHO, H.F; CAMPELLO, J.P. Diterpenes in the bark of *Hymenea coubaril*. **Phytochemistry**, v.14, n.8, p.1882-1883, 1975. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85324-6](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(75)85324-6). Acesso em: jun.2013.

MECKES-LOZOYA, M. et al. Efecto producido por la fracción de alcaloides de *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite) sobre el reflejo peristáltico del ileón del cobayo. **Archivos de Investigación Médica**, v.21, p.171-174, 1990.

MEDEIROS J.M. et al. Mortalidade perinatal em caprinos no semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.25, n.4, p.201-206, out./dez.2005. Disponível em: <http://www.pvb.com.br/pdf_artigos/03-01-2006_10-53Vet289.pdf>. Acesso em: set.2013.

MEDONLINE. Medicina on-line. Biofilme: um velho problema, uma nova batalha. 2008. **Revista Virtual de Medicina**. Disponível em <www.medonline.com.br>. Acesso em 7 de setembro de 2013.

MICHELIN, D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n.4, p. 316-320, oct./dec. 2005.

MILNES, A. S. et al. Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic, *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during. **Epidemiology and Infection**, v.136, n.6, p.739-751, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2870870/>. Acesso em: jun.2013.

MOLLA, B. et al. Class 1 integrons and resistance gene cassettes among multidrug resistant *Salmonella* serovars isolated from slaughter animals and foods of animal origin in Ethiopia. **Acta Tropical**, v.103, n.2, p.142-149, jun.2007.

MORETRO, T. et al. Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, n.3, p.1005-1012, mar.2009.

MOSTELLER, T. M.; BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 34-41, 1993.

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathogens**, v.4, n.11, nov. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2581603/>. Acesso em: jun.2013.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS); COSTA, S.F (trad) – **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbio**: norma Aprovada. 6ed. Brasília, DF: ANVISA, 2003. (NCCLS Document M7-A6, v. 23, n. 2). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/aud/manuals/clsi/clsi_OPASM7_A6.pdf>. Acesso em: jan.2013.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** v.75, n.3, p.311-335, 2012. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np200906s>>. Acesso em: mar.2013.

NÓBREGA JÚNIOR J.E. et al. Mortalidade perinatal de cordeiros no semiárido da Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.**, v.25, n.3, p.171-178, abr./jun.2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v25n3/a08v25n3.pdf>. Acesso em: mar.2013.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of medical microbiology**, v.56, pt.4, p.519–523, apr.2007.

NOVAIS, T.S. et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.13, supl.2 p.05-08, 2003.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. G. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research**, v. 4, n.10, p.4489-4494, 2012.

OLIVEIRA, S. J. **Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária**. 3.ed. Canoas, RS: ULBRA, 2012. p.121-127.

OLIVEIRA, M.R. et al. Estudo das condições de cultivo da Algaroba e Jurema preta e determinação do poder calorífico. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v.14, p.93-104, 1999.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PADILHA IQM. **Atividade Antimicrobiana *in vitro* e Cinética Bactericida do Extrato de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Jurema-preta) sobre Linhagens de *Staphylococcus aureus* Multirresistentes**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 2006.

PALERMO-NETO, J. Uso de antimicrobianos em suinocultura e desenvolvimento de resistência bacteriana: uma análise de risco. **Porkworld: Animalworld**, Set, 2011.

PANTER, K.E. et al. The effects of poisonous plants on embryonic and fetal development in livestock, In: COLEGATE, S.M.; DORLING, P.R. (Eds). **Plant Associated Toxins**. Wallingford, UK: CAB International, 1994. P. 325-332.

PANTER K.E. et al. Toxic and teratogenic piperidine alkaloids from *Lupinus*, *Conium* and *Nicotiana* species. In: GARLAND, T.; BARR, A.C. (Eds), **Toxic Plants and other Natural Toxicants**. Wallingford, UK: CAB International, 1998. p.345-350.

PAPHITOU, N.I. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. **Inter. J. Anti. Agent.**, v. 425, suppl.1, p.525-528, jun.2013.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.04.007>>. Acesso em: ago.2013.

PATEL, J.; SHARMA, M. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, p. 41 e 47, 2010.

PEREIRA, F.R.L.; QUIRINO, Z.G.M. Fenologia e biologia floral de *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) na caatinga paraibana. **Rodriguésia**, v.59, n.4, p.835-844, 2008. Disponível em: <http://rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/rodrig59_4/012%28008-07%29.pdf>. Acesso em: mar.2013.

PEREIRA, O.B.O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme**. 2001. 221f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2001.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004.

PRADO, D. E. **A critical evaluation of the floristic links between Chaco and Caatingas vegetation in South America**, 1991. Ph.D. thesis, University of St. Andrews, St. Andrews, Scotland.

PROUTY, A.M.; GUNN, J.S. Comparative analysis of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium biofilm formation in gallstones and on glass. **Infection and Immunity**, v.71, n.12, p.7154-7158, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308894/pdf/0432.pdf>. Acesso em: abr.2013.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: UEFS, 2009. 467p.

QUINN, P.J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1.ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005.

RABE, T.; VAN STADEN, J. Antimicrobial activity os South African Plants Used for Medicinal Purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p.81-87, 1997.

RABSCH, W.; TSCHAPE, H.; BAUMLER, A.J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 237–247, 2001.

RADOSTITS, O.M. et al (Eds). Diseases associated with *Salmonella* species. In: _____. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10^o ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. p.896-921.

RADULOVIC, N.S. et al. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. **Current medicinal chemistry**, v. 20,n.7, p.932-952, 2013.

RENSHENG, X.; YE, Y.; WEIMIN, Z. (Eds). **Introduction to natural products Chemistry**. New York, EUA: CRC Press, 2011. p.169- 175.

RIBEIRO, R. D. **Hymenaea**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: jan.2013.

RIVERA-ARCE, E. et al. Pharmacognostical studies of the plant drug *Mimosae tenuiflorae* cortex. **Journal Ethnopharmacology**, v. 113: 400-408, 2007.

RUSHTON, J. **The economics of animal health and production**. Cambridge, MA: CABI International; 2009. 380p. Disponível em: <http://www.blogtiengviet.net/media/users/tamthanh27/tailieu/cbaebook/animalhealth.pdf>. Acesso em: fev.2013.

SÁ, M.C.A. et al. Antimicrobial activity of Caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 2/3, p. 62-66, 2011.

SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural product reports**, v.27, n.2, p.238–254, feb.2010.

SANDBERG, M.; ALVSEIKE, O.; SKJERVE, E. The prevalence and dynamics of *Salmonella enterica* IIIb 61:k:1,5,(7) in sheep flocks in Norway. **Preventive Veterinary Medicine**. v.52, n.3/4,p. 267–275, 2002.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.4, p.275–280, 2004.

SAS/STAT Procedure Logistic: versão 9.3, SAS System for Windows. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc. 2002-2010c.

SCHWARZ, S. et al. Assessing the susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 601-604, 2010.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.1, jan. 2011.

SHARMA, A.K. et al. Experimental *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium infection in Indian goats: clinical, serological, bacteriological and pathological studies. **Small Ruminant Research**, v.42, n.2, p.125-134, 2001.

SILVA, A.G. Antimicrobial activity of medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil. **Curr. Top. Phytochem.**, v.11, p.81-94, 2012.

SILVA, C.L.; QUEIROZ, A.J.M.; FIGUEIREDO, R.M.F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.8, n.2/3, p.260-265, 2004.

SILVA, J. P. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente à *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, supl.1, p.136-141, 2010.

SILVA, L.C.N. et al. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Natural product research**, v.27, n.16, 2013, epub sep 2012. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22974409>>. Acesso em 2013.

SILVA, L.C.N. et al. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and chemical toxicology**, v.49, p.2222-2228, 2011.

SILVA, M.V. et al. Antimicrobial Activity of *Pityrocarpa moniliformis* leaves and its Capacity to Enhance the Activity of four Antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.7, n.28, p.2067-2072, jul. 2013.

SILVEIRA, D.G. et al. Micropropagation and in vitro conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber produced bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Londrina, v.52, n.4, p.923-932, 2009.

SILVEIRA D. G. et al. Resposta germinativa de sementes de Caroá (*Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez.). **Ciências Agrotécnicas**, v. 35, n. 5, p.948 -955, 2011.

SIMÕES, M.; PEREIRA, M.O.; VIEIRA, M.J. Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms formed under different flow regimes. **Water Science and Technology**, v.47, n.5, p.217-223, 2003.

SIMÕES, M.; VIEIRA, M.J. Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide. In: International conference processes in biofilms Fundamentals to applications, 2009. **Proceedings...** Davis, CA, USA, 2009, p.58-62.

SIQUEIRA FILHO, José Alves de et al (Ed.). **Guia de Campo de Árvores das Caatingas**. Petrolina, PE: Franciscana, 2009. 64p. (Volume I).

SIQUEIRA FILHO, José Alves de et al (Org.). **Guia de Campo de Árvores das Caatingas**. Petrolina, PE: Progressiva, 2013. 67 p. (Volume II).

SIVROUPOULOU, A. et al. Antimicrobial activity of mint essential oils. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 2384-2388, 1995.

SOLANO, C. et al. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**, v.43, p.793–808, 2002.

SONI, K.A. et al. Inhibition and inactivation of *Salmonella typhimurium* biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 2, p. 205-212, 2013.

STEPANOVIC, S. et al. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, v. 20, p.339–343, 2003.

STEPANOVIC, S. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, 428–432, 2004.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, n. 40, p.175–179, 2000.

STEFANOVIĆ, O.; COMIE, L. Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.2 n.1, p.01-05, 2012.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews of Microbiology**, v.56, p.187–209, 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dados epidemiológicos – DTA**: período de 2000 a 2011. Brasília: MS/SVS, 2011. Disponível em: <http://www.eteavare.com.br/arquivos/20_2177.pdf>. Acesso em: jan.2013.

TINDALL, B.J. et al. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p.521–524, 2005.

TOUTAIN, P.L.; BOUSQUET-MELOU A. The consequences of generic marketing on antibiotic consumption and the spread of microbial resistance: the need for new antibiotics. **J. Vet. Pharmacol. Ther.** v.36, n.5, p.420-424, 2013.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**, v. 25, p. 807-815, 2003. Disponível em: <http://www.thaiscience.info/journals/Article/Biofilms%20and%20the%20food%20industry.pdf>. Acesso em: jun.2013.

TRENTIN, D.S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **J. Ethnopharmacol**, v.137, p.327-335, 2011.

URZUA, A. et al. Antimicrobial study of the resinous exudate and of Diterpenoids Isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 31- 47, 1998.

UZZAU, S.; BOSSI, L.; FIGUEROA-BOSSI, N. Differential accumulation of Salmonella [Cu, Zn] superoxide dismutases SodCI and SodCII in intracellular bacteria: correlation with their relative contribution to pathogenicity. **Mol Microbiol**, v. 46, n.1, p.147-156, 2002.

UZZAU, S. et al. Salmonella enterica serovar-host specificity does not correlate with the magnitude of intestinal invasion in sheep. **Infect Immun**, v.69, n.5, p.3092-3099, 2001.

VLIETINCK, A.J. et al. Mvukiyumwami J Screening of a Hundred Rwandese Medicinal Plants for Antimicrobial and Antiviral properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, n. 31-47, 1995.

VUUREN S,VILJOEN A (2011). Plant-Based Antimicrobial Studies – Methods and Approaches to Study the Interaction between Natural Products. **Plant Med.**, v.77, p.1168–1182, 2011.

WALKER, J. T.; ROGERS, J.; KEEVIL, C. W. An investigation of the efficacy of a bromine containing biocide on aquatic consortium of planktonic and biofilm microorganisms including legionella pneumophilia. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 8, n.1, p. 47-54, 1994.

WELCH K.D. et.al. Dose-response evaluation of *Veratrum californicum* in sheep. In: RIET CORREA, F. et al (Eds), **Poisoning by Plants, Mycotoxins and related Toxins**. Cambridge, MA: CAB International, v.37, p.243-250, maio 2011.

WIEST, J.M. et al. Inibição e inativação in vitro de *Salmonella* spp com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n. 1, p. 119-127, 2009.

WOLDEMARIAM, E. et al. Prevalence and distribution of Salmonella apparently healthy slaughtered sheep and goats in Debre Zeit, Ethiopia. **Small Ruminant Research**, v.58, n.1, p.19-24, abr. 2005. Disponível em: <[http://www.smallruminantresearch.com/article/S0921-4488\(04\)00229-9/pdf](http://www.smallruminantresearch.com/article/S0921-4488(04)00229-9/pdf)>. Acesso em: jun.2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Foodborne Disease Surveillance: Antimicrobial resistance**. 2009. Homepage. Disponível em: <http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/en/> Acesso em: 27 fev. 2012.

XAVIER, L.P. **O caroá**. 2.ed. Natal: EMPARN, 1982. 270p. (EMPARN. Documentos, 7. ESAM. Coleção Mossoroense, 247).