



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ - REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

Rodolfo de Moraes Peixoto

**EXTRATO ETANÓLICO DA *Hymenaea martiana* Hayne NA INIBIÇÃO DA
FORMAÇÃO DE BIOFILME E NO TRATAMENTO DA MASTITE CAPRINA
INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE COM *Staphylococcus aureus***

Recife, PE

2014

RODOLFO DE MORAES PEIXOTO

**EXTRATO ETANÓLICO DA *Hymenaea martiana* Hayne NA INIBIÇÃO DA
FORMAÇÃO DE BIOFILME E NO TRATAMENTO DA MASTITE CAPRINA
INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE COM *Staphylococcus aureus***

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

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Recife, PE

2014

Ficha catalográfica

P379e Peixoto, Rodolfo de Moraes
Extrato etanólico da *Hymenaea martiana* Hayne na inibição da formação de biofilme e no tratamento da mastite caprina induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus* / Rodolfo de Moraes Peixoto. – Recife, 2014.
105 f. : il.

Orientador: Mateus Matiuzzi da Costa.
Tese (Doutorado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.
Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Atividade antibacteriana 2. Cabras leiteiras
3. Diagnóstico 4. Extrato natural 5. Mastite 6. Terapia
I. Costa, Mateus Matiuzzi da, orientador II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

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

Rodolfo de Moraes Peixoto _____

Recife, 23 de Maio de 2014.

Banca Examinadora

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

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota (UFRPE)

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior (UFRPE)

Prof.^a Dr.^a Andrea Maria Lazzari (UPIS – Brasília)

Prof.^a Dr.^a Tânia Maria Sarmiento da Silva (UFRPE)

Dedicatória

Dedico a Maria Gomes de Carvalho (minha avó) *in memoriam*.

Agradecimentos

Agradeço imensamente ao nosso Pai eterno, Deus, razão de nossas vidas. Sou grato por tudo, conquistas e também tristezas que me fizeram crescer ou me livrar de algo de ruim. Tudo que sou e tenho é graças a ti Senhor.

Agradeço a minha esposa Luciana Jatobá e Silva Peixoto, pela compreensão que teve em alguns momentos e pela ajuda efetiva durante todo o experimento. Seu apoio foi e será sempre muito importante.

Sou eternamente grato à minha mãe que também não mediu esforços quando o assunto era a formação dos seus filhos. Tudo que eu fizer até os últimos dias não será suficiente para retribuir tudo que fez por nós, seus filhos. Também a agradeço as minhas irmãs Anne Caroline de Moraes Peixoto e Renata de Moraes Peixoto, pelos momentos de aprendizado e descontração. Agradeço à Renata de Moraes pela ajuda efetiva durante todo o experimento, mesmo estando na atual condição de mestranda. Obrigado pela ajuda na realização dos testes moleculares e pela avaliação clínica dos animais durante todos os 21 dias que durou a fase experimental. Obrigado ao meu pai, Antonio Peixoto Neto, pelo apoio durante a minha vida. Ao meu avô Manuel Nunes de Moraes por todos os ensinamentos que levarei sempre e que são importantíssimos na carreira acadêmica: “seja humilde meu neto”, “seja manso”, “tenha força de vontade sempre”. Também agradeço à minha sogra Lícia Jatobá pelo apoio e aos cunhados pelas conversas de apoio e também ajuda.

Expresso meu sentimento de gratidão ao meu professor orientador Mateus Matiuzzi da Costa, pela oportunidade que me deu de ingressar no doutorado, mesmo sabendo que eu estaria lecionando em outra cidade. Sua contribuição na minha vida pessoal e profissional foi bastante importante e, tenho certeza, que ainda irei aprender muito com o professor.

Ao professor Rinaldo Aparecido Mota também expresso meu sentimento de gratidão, uma vez que, quando me selecionou para o PIBIC, me concedeu a oportunidade de conhecer a academia, proporcionando crescimento pessoal e profissional.

Sou grato à Universidade Federal do Vale do São Francisco, uma vez que cedeu as instalações para colocação dos animais, além de fornecer as condições para arraçãoamento dos animais. Agradeço a Profa. Dra. Sandra Yamamoto que me ajudou na elaboração de um programa de manejo alimentar. Sou grato a todos os funcionários da Fazenda da UNIVASF que me ajudaram no manejo dos animais.

Agradeço a todos os colegas que me ajudaram de forma direta ou indireta. Todos os colegas que me ajudaram no manejo dos animais e nas análises realizadas no laboratório de

Microbiologia e Imunologia da UNIVASF, Maria da Conceição Aquino, Werônica Rocha, Evandro Santos, Ariel Marques, Ana Paula Alves, Renilde Cordeiro, Welington Erasmo e Alan Greison. À Gisele Veneroni agradeço pela ajuda na realização e interpretação dos resultados testes moleculares.

Obrigado à Marta Barros Leite (UNIVASF) que realizou os hemogramas dos animais durante a fase experimental. Ao farmacêutico, Silvo Alan (UNIVASF), que me ajudou durante a descoberta do veículo que seria utilizado para o extrato da planta. À Prof^a. Dr^a Tânia Sarmiento (UFRPE) e sua bolsista Telma Guedes pela realização dos testes fitoquímicos e pesquisa dos resíduos presentes no leite.

Agradeço ao professor Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida (UNIVASF) pelos ensinamentos e aos professores Sergio Santos Azevedo (UFCEG) e José Wilton Pinheiro Junior (UFRPE) pela ajuda durante o tratamento estatístico dos dados. Também agradeço a Dra.^a Sandra Santos que fez as PCRs para *Mycoplasma agalactiae*.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano – IF SERTÃO-PE, *Câmpus* Floresta pela anuência para realização deste doutorado. Aos colegas do IF SERTÃO-PE, também agradeço pelo apoio e suporte quando precisei ser substituído nas aulas para ir à Recife.

Agradeço aos membros do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, à prof. Dr^a Marleyne Amorim pelo apoio sempre que necessário. Agradecemos a FACEPE pela concessão da bolsa de pós-graduação e ao MCT/INSA/CNPq, pela concessão de recursos financeiros.

Fontes Financiadoras

- A pesquisa foi financiada com recursos provenientes da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), por meio da concessão da bolsa de pós-graduação e pelo MCT-INSA/CNPq/CT-Hidro/Ação Transversal (N.º 35/2010).

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	15
2 - REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Caprinocultura no Brasil e no Mundo.....	17
2.2 Importância da mastite na caprinocultura leiteira.....	19
2.3 Etiologia e aspectos epidemiológicos da mastite.....	19
2.4 Resistência aos antimicrobianos e genes <i>mecA</i> e <i>blaZ</i>	20
2.5 Produção de biofilme e principais genes envolvidos (<i>icaA</i> , <i>icaD</i> e <i>bap</i>).....	22
2.6 Ferramentas diagnósticas da mastite em ruminantes.....	24
2.7 Estratégias de controle e tratamento.....	27
2.8 Gênero <i>Hymenaea</i> e principais atividades biológicas.....	30
2.9 Extrato de plantas x interferência sobre fatores de virulência.....	31
3 - OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO 1. Caracterização molecular, produção de biofilme e perfil de sensibilidade de <i>Staphylococcus</i> spp. ao extrato de <i>Hymenaea martiana</i> Hayne.....	42
CAPÍTULO 2. Concordância de técnicas empregadas para o diagnóstico da mastite subclínica em cabras leiteiras infectadas experimentalmente com <i>Staphylococcus aureus</i>	54
CAPÍTULO 3. Composição do leite de cabras Saanen infectadas experimentalmente com <i>Staphylococcus aureus</i> e submetidas a dois protocolos de tratamento.....	68
CAPÍTULO 4. Tratamento da mastite caprina induzida experimentalmente por <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando um protocolo com formulação contendo extrato de <i>Hymenaea martiana</i>	82
5 - CONCLUSÕES	103
APÊNDICE	
APÊNDICE 1 - Exemplar de <i>Hymenaea martiana</i> Hayne (Exsicata depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF) sob n.º 21868.....	104
ANEXOS	
ANEXO 1 – Parecer de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIVASF.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Acurácia
CAE	Caprine Arthritis Encephalitis
CBM	Concentração bactericida mínima
CB	Cultura bacteriológica
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CCS	Contagem de células somáticas
CMT	California Mastitis Test
EEB	Extrato etanólico bruto
EEHm	Extrato etanólico da <i>Hymenaea martiana</i> Hayne
Es	Especificidade
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
K	Índice kappa
L	Litro
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
Se	Sensibilidade
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
UV	Ultravioleta
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

LISTA DE SÍMBOLOS

N.º	Número
%	Porcentagem
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
+	Positivo
-	Negativo
µL	Microlitro
X	Multiplicação
°C	Graus Celsius

LISTA DE QUADROS

Revisão de Literatura		Pág.
Quadro 1.	Análise do leite de cabra e interpretação dos escores de CMT e CCS.....	27

Capítulo 01

Quadro 1.	Iniciadores utilizados para amplificação dos genes <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>icaD</i> , <i>icaA</i> e <i>bap</i>	52
Quadro 2.	Resultado da pesquisa dos genes e quantificação e interação do biofilme em formação a partir de isolados de <i>Staphylococcus</i> oriundos do leite de cabra com as frações do extrato de <i>H. martiana</i> do biofilme.....	53

LISTA DE TABELAS

	Capítulo 02	Pág.
Tabela 1.	Resultado do teste de cultura bacteriológica, CMT e CCS do leite de cabras inoculadas experimentalmente com <i>S. aureus</i>	65
Tabela 2.	Estatística descritiva e inferencial dos dados relativos à CCS nos distintos momentos experimentais.....	65
Tabela 3.	Estatística descritiva dos dados relativos à CCS ($\times 10^3$) entre os escores do CMT realizado ao longo dos três momentos experimentais.....	66
Tabela 4.	Análise de parâmetros relacionados as culturas bacteriológicas (CB) realizadas ao longo de três momentos experimentais.....	66
Tabela 5.	Análise dos valores da CCS em comparação com cada CB e com a positividade acumulada realizada.....	67
Tabela 6.	Análise dos resultados do CMT em comparação com a CB realizada em cada momento experimental.....	67
Capítulo 03		
Tabela 1.	Média de cinco repetições do teste de composição de leite para a variável percentual gordura em cabras infectadas experimentalmente com <i>Staphylococcus aureus</i>	74
Tabela 2.	Média de cinco repetições do teste de composição de leite para a variável percentual proteína em cabras infectadas experimentalmente com <i>Staphylococcus aureus</i>	75
Tabela 3.	Média de cinco repetições do teste de composição de leite para a variável percentual lactose em cabras infectadas experimentalmente com <i>Staphylococcus aureus</i>	75
Tabela 4.	Média de cinco repetições do teste de composição de leite para a variável percentual sólidos totais em cabras infectadas experimentalmente com <i>Staphylococcus aureus</i>	76
Tabela 5.	Média de cinco repetições do controle leiteiro (L/dia) realizado em cabras infectadas experimentalmente com <i>Staphylococcus aureus</i>	76
Capítulo 04		
Tabela 1.	Triagem fitoquímica do EEB de <i>H. martiana</i>	98
Tabela 2.	Mediana de cinco repetições para a UFC ($\times 10^3$) avaliada em cabras infectadas experimentalmente com <i>Staphylococcus aureus</i>	99
Tabela 3.	Mediana de cinco repetições para a CCS ($\times 10^3$) avaliada em cabras infectadas experimentalmente com <i>Staphylococcus aureus</i>	99
Tabela 4.	Estatística descritiva dos resultados do CMT obtidos após infecção experimental de cabras leiteiras com <i>Staphylococcus aureus</i>	100

LISTA DE FIGURAS

	Capítulo 01	Pág.
Figura 1.	Perfil de sensibilidade de isolados de <i>Staphylococcus</i> aos antimicrobianos: oxacilina (OXA), ampicilina (AMP), amoxicilina (AMO), doxiciclina (DOX), gentamicina (GEN), rifampicina (RIF), ácido nalidíxico (NAL), lincomicina (LIN), cefalotina (CFL) e eritromicina (ERI).....	53
Figura 2.	Microscopia eletrônica de varredura de varredura de isolado de <i>S. aureus</i> obtido de caso de mastite caprina, indicando A: Presença de biofilme no isolado cultivado sem contato com o extrato de <i>H. martiana</i> e B: Ausência de biofilme no isolado após cultivo de 24hs em contato com o extrato de <i>H. martiana</i>	53
Capítulo 04		
Figura 1.	HPLC-DAD de compostos fenólicos da fração de CHCl ₃ revelado em 290nm.....	100
Figura 2.	HPLC-DAD de compostos fenólicos da fração de AcOEt revelado em 290nm.....	101
Figura 3.	Espectro UV de três componentes presente na fração de AcOEt.....	101
Figura 4.	Cromatogramas e espectros UV das amostras de leite e do extrato.....	102

RESUMO

A mastite é uma das enfermidades mais importantes em criações voltadas para produção de leite, dessa forma, objetivou-se avaliar a interferência do extrato de *Hymenaea martiana* sobre a produção de biofilme em *Staphylococcus* spp., além de avaliar a concordância de testes diagnósticos e o potencial do extrato de *H. martiana* para tratamento da mastite em cabras leiteiras experimentalmente infectadas com *S. aureus*. Foram utilizados 33 isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de caprinos com mastite subclínica para caracterização molecular e realização de testes de sensibilidade. Utilizou-se o extrato etanólico bruto de *H. martiana*, além das frações obtidas para avaliar a sensibilidade dos isolados, utilizando-se a técnica da concentração bactericida mínima. Realizou-se a caracterização fenotípica para formação de biofilme sua interação do extrato *H. martiana* com o biofilme em formação e após sua consolidação. Para avaliar a concordância de testes diagnósticos e avaliar o potencial terapêutico do extrato, fez-se a infecção experimental em 10 fêmeas caprinas da raça Saanen, totalizando em 20 glândulas mamárias infectadas, utilizando uma cepa de *S. aureus*, em uma dose infectante de $1,2 \times 10^8$ UFC/mL. Para avaliar a concordância de técnicas diagnósticas, foram estabelecidos quatro momentos experimentais (0, 24, 48 e 72 horas pós-infecção). Para avaliação do potencial terapêutico da *H. martiana* os animais foram monitorados até o 41º dia pós infecção. O diagnóstico da mastite foi realizado utilizando-se a cultura bacteriológica, contagem bacteriana total no leite, CCS e o CMT. Quanto a cultura bacteriológica, após um período de congelamento as amostras foram submetidas a uma nova cultura. Os valores obtidos para gordura, lactose, proteína, sólidos totais e produção leiteira foram analisados ao longo dos momentos experimentais, comparando-os entre si e entre os grupos experimentais. Três amostras de leite foram submetidas à cromatografia para pesquisa de constituintes presentes na pomada preparada com o extrato da planta. Percebe-se ampla produção de biofilme nos isolados, contudo, é relevante o resultado que demonstra redução na produção desta matriz extracelular quando em contato com o extrato de *H. martiana*. Pôde-se observar que o estabelecimento de pontos de corte no CMT e CCS mais elevados não constitui uma boa alternativa, tendo em vista que estes testes de triagem apresentaram boa sensibilidade e especificidade com pontos de corte inferiores ao recomendado por alguns estudos. Para os percentuais de gordura, proteína e sólidos totais, observou-se uma elevação ao longo dos momentos experimentais. Após o tratamento com pomada contendo o extrato de *H. martiana* e o antimicrobiano comercial, as variáveis CCS e UFC retornaram para valores indicativos de ausência de infecção intramamária segundo padrões internacionais para o leite cru de cabra. Nas condições deste estudo, a pomada elaborada a partir do extrato etanólico da planta *H. martiana* apresentou a capacidade de reduzir as contagens bacterianas totais nas glândulas infectadas experimentalmente com *S. aureus*.

Palavras-chave: atividade antibacteriana, cabras leiteiras, diagnóstico, extrato natural, mastite, terapia.

ABSTRACT

Mastitis is one of the most important diseases in creations focused on milk production. The purpose of the present work were to evaluate the effect of the extract of *Hymenaea martiana* on biofilm production in *Staphylococcus* spp., concordance of mastitis diagnostic tests and the potential of the extract of *H. martiana* for treatment of mastitis in dairy goats experimentally infected with *S. aureus*. Was used *Staphylococcus* spp. (n=33) derived from goats with subclinical for molecular characterization and assessment of sensitivity tests mastitis. We used the crude ethanolic extract of *H. martiana*, besides the fractions obtained to evaluate the sensitivity of isolates using the technique of minimum bactericidal concentration. Was performed phenotypic characterization of biofilm formation extract its interaction with *H. martiana* biofilm formation and after its consolidation. The evaluation of the concordance of diagnostic tests and therapeutic potential of the extract were made by experimental infection in 10 Saanen goats females, totaling 20 infected mammary glands, using a strain of *S. aureus* in an infectious dose of 1.2×10^8 CFU / mL. To determine the concordance of diagnostic techniques were established four experimental times (0, 24, 48 and 72 hours post-infection). To evaluate the therapeutic potential of *H. martiana* animals were monitored until day 41 post infection. The diagnosis of mastitis was performed using the bacterial culture, total bacterial count in the milk SCC and the CMT. As the bacterial culture, after a period of freezing the samples were subjected to a new culture. The values obtained for fat, lactose, protein, total solids and milk production were analyzed through the experimental moments, comparing them with each other and between experimental groups. Three milk samples were subjected to chromatography to survey constituents present in the ointment prepared with the plant extract. Perceives extensive biofilm production in isolates, however, it is relevant that the result shows a reduction in production of the extracellular matrix when in contact with the extract of *H. martiana*. It was observed that the setting of breakpoints in the CMT and higher SCC is not a good alternative in view of these screening tests showed good sensitivity and specificity cutoff below the recommended by some studies. For the percentages of fat, protein and total solids, there was an increase over the experimental moments. After treatment with ointment containing the extract of *H. martiana* and commercial antimicrobial, CCS and UFC variables returned to values indicative of absence of intramammary infection by international standards for raw milk goat. In our study, the ointment prepared from the extract of the plant *H. martiana* showed the ability to reduce total bacterial counts in experimentally glands infected with *S. aureus*.

Keywords: atividade antibacteriana, dairy goat, diagnostic, natural extract, mastitis, therapy.

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura leiteira é vista como atividade com grande potencial econômico, principalmente para o Nordeste brasileiro, onde se localiza mais de 90% do rebanho nacional (IBGE, 2012). O alcance desse patamar, no entanto, depende da organização da cadeia produtiva. A criação, em sua maioria, é restrita às propriedades familiares, sendo a produção voltada para a subsistência (Holanda Junior e Araújo, 2004).

Embora apresente um significativo rebanho caprino, alguns problemas constituem sérios entraves para o crescimento da atividade na região Nordeste, podendo-se citar, aqueles de origem sanitária. Dentre estes, destaca-se a mastite, uma inflamação da glândula mamária ocasionada, geralmente, por micro-organismos. Quanto à etiologia, em cabras leiteiras, as infecções intramamárias são, em sua maioria, causadas por diversas espécies de *Staphylococcus* spp. (Bergonier et al. 2003; Contreras et al. 2007). De acordo com Koop et al. (2012a), a virulência de patógenos no úbere pode ser determinada pelo seu potencial de elevar a contagem de células somáticas (CCS), diminuir a produção de leite e causar mastite clínica.

O diagnóstico da mastite nem sempre é fácil, sendo observado que na mastite clínica, embora o diagnóstico envolva os sinais clínicos característicos da enfermidade como dor e edema na metade mamária afetada, esta pode estar latente. Da mesma forma, o diagnóstico da mastite subclínica é bastante complicado e envolve a detecção de células somáticas e o cultivo bacteriológico (Klaas et al., 2004).

A terapia das mastites subclínicas, causadas principalmente por estafilococos e estreptococos, durante a lactação apresenta resultados variáveis (Berry et al., 1997, Pengov e Ceru, 2003). Os índices de recuperação da glândula variam entre 3,6% e 92%. Esquemas terapêuticos utilizados para tratamento de mastites clínicas ou subclínicas recomendam entre uma e três aplicações de medicamentos, por via intramamária, apresentando melhores resultados quando o número de aplicações é maior ou quando se faz uma terapia associada por via parenteral.

No tratamento das mastites subclínicas devem ser levados em consideração o custo, o tempo de eliminação dos fármacos e a perda de leite (Erskine, 1992; Wilson et al., 1999). A utilização de antimicrobianos constitui a principal forma de tratamento de casos de mastite na propriedade. No entanto, o alto custo e a resistência bacteriana a esses compostos vêm levando os pesquisadores à busca de novas alternativas para o controle dessa enfermidade (Loguercio et al., 2006).

Neste contexto, a busca por tratamentos a base de fitoterápicos tem-se intensificado (Agra et al., 2005). O Brasil apresenta uma extensa e diversificada flora, sendo grande o número de pesquisadores que têm contribuído para o enriquecimento da literatura acerca dos produtos naturais de plantas. No entanto, nosso país não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente. Além disso, há necessidade de integração das diferentes áreas do conhecimento (química, bioquímica, farmacologia, botânica, tecnologia farmacêutica, etc.) para obtenção de resultados efetivos, uma vez que os estudos ocorrem de forma isolada ou fragmentada na determinação de novas estruturas ou novos efeitos biofarmacológicos, carecendo de conexão à obtenção de extratos ativos, como possíveis fitoterápicos (Yunes et al., 2001).

As vantagens que justificam a utilização dos fitoterápicos são: o efeito sinérgico, ou seja, as plantas apresentam vários compostos com efeitos similares; associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes e menores riscos de efeitos colaterais, uma vez que os compostos ativos se apresentam em concentrações reduzidas nas plantas (Yunes et al., 2001).

Neste sentido, é de fundamental importância a descoberta de produtos naturais com potencial para uso na terapia das infecções intramamárias em cabras leiteiras. Além disso, tendo em vista a produção de biofilme em muitos patógenos, tem-se a necessidade de investigar a ação dos extratos de plantas frente a esta matriz. O estudo de concordância de técnicas empregadas no diagnóstico da mastite em cabras também é relevante no sentido de proporcionar informações que permitam a utilização segura das ferramentas diagnósticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caprinocultura leiteira no Brasil e no Mundo

Desde o início da civilização percebe-se uma estreita ligação do homem e a atividade de criação de cabras, sendo um fator relevante para manutenção dos primeiros núcleos de assentamentos, fornecendo leite, carne e pele. No Brasil, os primeiros animais da espécie caprina foram trazidos pelos colonos portugueses, contribuindo para o suprimento de alimentos em áreas inóspitas (Cordeiro e Cordeiro, 2009).

Atualmente, os maiores rebanhos caprinos estão localizados em países em desenvolvimento, contudo, quase a totalidade do leite produzido nestes países é utilizado para a subsistência das famílias ou grupos de famílias e consumido próximo aos locais de produção, não tendo estes países uma participação destacada na indústria e comércio de laticínios de cabra. Também se observa que os países que mais se destacam na produção de leite de cabra, não são aqueles que lideram a industrialização e comercialização de laticínios derivados da exploração caprina (Cordeiro e Cordeiro, 2009).

No Brasil, segundo dados da Organização nas Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), existem cerca de 13 milhões de caprinos, correspondente ao 10º rebanho do mundo. A produção de leite de cabra contribui apenas com 1,3%, aproximadamente 141 mil toneladas. O efetivo caprino na região Nordeste brasileira representa mais de 90% do rebanho nacional (IBGE, 2012), sendo a produção leiteira uma importante fonte de renda ao produtor rural. Dentre os principais sistemas de produção, aqueles voltados para subsistência, geralmente pequenos criatórios, são encontrados tanto nas áreas rurais quanto nas periferias das grandes cidades. Por outro lado, existem também criatórios comerciais bem organizados, com grandes estruturas de produção e, na maioria das vezes, dedicando-se também ao beneficiamento e comercialização dos produtos (Ribeiro, 1997).

De acordo com Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2000), o leite de cabra é um líquido branco, puro, de odor e sabor especiais e agradáveis. Apresenta alto valor nutritivo, qualidade dietética e é um alimento que apresenta elementos necessários à nutrição humana, como: açúcares, proteínas, gorduras, vitaminas e sais minerais (Quadros, 2008).

De maneira geral, a caprinocultura leiteira brasileira passa por um bom momento no cenário socioeconômico atual. A demanda pelo leite em pó e UHT em embalagens longa vida é estável no País, sendo destinado, principalmente, para fins terapêuticos. Atualmente, as

indústrias brasileiras processam cerca de 36 milhões de litros de leite ao mês com inspeção sanitária, sendo todo o volume absorvido pelo consumo doméstico. Contudo, produtores de leite de cabras e laticínios descobriram uma forma de auferir maior renda com a fabricação de queijos finos e iogurtes. Atualmente, um terço do leite caprino produzido no Brasil é destinado a produção de queijos de alto valor agregado ou iogurte, sendo observado um crescimento progressivo deste setor. Na Europa, 85% da matéria-prima é transformada e 15% é consumida como bebida láctea (Poll et al., 2012).

O Brasil produz praticamente o mesmo volume de leite de cabra há três anos, mas a demanda da indústria continua a crescer. Nas regiões em que há indústrias, tais como, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, há necessidade de maior oferta, principalmente para ampliar as linhas de fabricação de queijos. A demanda também se expande no Paraná e no Rio Grande do Sul. No Nordeste brasileiro a produção de leite de cabras e seus derivados é destinada a ações de governo e ao apoio a projetos sociais. Tem-se o Programa de Aquisição de Alimentos (PAA), do Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA), bem como outros programas voltados à merenda escolar. Cerca de 35% da produção brasileira de leite se concentra nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Ceará, Piauí e Bahia. Além dos programas governamentais, alguns destes estados apresentam algumas iniciativas de industrialização de produtos com maior valor comercial (Poll et al., 2012).

A elevada adaptabilidade destes animais às condições edafoclimáticas da região, além da baixa necessidade de capital inicial, torna a criação destes pequenos ruminantes uma alternativa viável para a geração de renda e garantia de segurança alimentar para a população nordestina, principalmente aquela localizada em áreas semiáridas (Holanda Junior e Araújo, 2004).

Novos investimentos em genética, alimentação, instalações, reprodução e sanidade do rebanho, bem como na qualidade e no aproveitamento do leite de cabra têm mudado essa realidade no País. Entre as décadas de 80 e 90 houve aumento de 51,6% na produção nacional, indicando o crescente mercado e interesse na atividade. Entretanto, os sistemas de criação predominantes são caracterizados por baixos índices zootécnicos, em consequência da precária nutrição, dos problemas sanitários, do manejo ineficiente e do baixo potencial genético dos animais (Quadros, 2008).

2.2 Importância da mastite na caprinocultura leiteira

A mastite é a inflamação da glândula mamária normalmente causada por micro-organismos, sendo geralmente classificada em clínica, sub-clínica e crônica (Bergonier et al., 2003). A mastite representa um problema sério em cabras leiteiras, devido às perdas econômicas decorrentes da redução da produção leiteira e do leite descartado (Aires-de-Sousa et al., 2007; Leitner et al., 2007, 2008).

A primeira publicação sobre a mastite em animal leiteiro foi na espécie caprina (Zanger, 1854 apud Koop, 2012), mas, atualmente, a maioria das publicações acerca da mastite são voltadas para espécie bovina. Este fato pode ser explicado pela maior importância econômica das vacas leiteiras. Embora a cabra seja uma fonte essencial de alimento e renda em muitos países em desenvolvimento, a maioria das pesquisas acontece em países desenvolvidos, com uma economia forte e diversos programas de financiamento para a ciência (Koop, 2012). Nestes países, a fêmea bovina é geralmente considerada a mais importante espécie de produção de leite. Além disso, em algumas situações, a mastite em cabras leiteiras tem sido vista como um problema sem importância, devido a menor frequência de casos clínicos (Bergonier et al., 2003; Contreras et al., 2007). Quanto a mastite subclínica, muitas vezes, esta também é ignorada devido a falta de familiaridade com a interpretação dos resultados dos testes de diagnóstico disponíveis (Koop, 2012).

2.3 Etiologia e aspectos epidemiológicos das mastites

O gênero *Staphylococcus* é o mais frequentemente encontrado em infecções intramamárias em cabras, podendo representar mais de 90% de todos os gêneros de bactérias identificadas (McDougall et al., 2002; Leitner et al., 2007). Para Marogna et al. (2012), entre os *Staphylococcus* spp., a espécie *S. aureus* é considerada a mais importante, com frequências variando de 4% a 40% de todos os micro-organismos isolados (McDougall et al., 2002; Moroni et al., 2005a; Leitner et al., 2007). Silva et al., (2004) observaram que em 37% das mastites subclínicas em caprinos leiteiros o patógeno envolvido era o *S. aureus*.

Os *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN) também podem causar mastite clínica e subclínica, acompanhada por um aumento significativo na CCS do leite (Moroni et al., 2005a; Contreras et al., 2007). A importância e a patogenicidade das espécies de SCN variam

amplamente. Na espécie caprina, o *S. epidermidis* é geralmente a espécie mais frequentemente isolada (Contreras et al., 1999; Moroni et al., 2005b; Leitner et al., 2007), seguido por *S. caprae* que, em alguns estudos, foi relatado como sendo a espécie mais predominante (Sánchez et al., 2004; Moroni et al., 2005c). *S. simulans*, *S. chromogenes* e *S. xylosum* são outros SCN frequentemente encontrados no leite mastítico. Outros SCN têm sido isolados a partir do leite de cabra, porém em baixa frequência, sugerindo seu papel secundário na etiologia da mastite caprina (Marogna et al., 2012). Outros micro-organismos relatados como causadores de mastite em cabras são *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Pasteurella* spp., *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Bacillus* spp. e *Actinomyces* spp. (Contreras et al., 1999; White e Hinckley, 1999; Sánchez et al., 2004; Moroni et al., 2005b). Entre estes, *Streptococcus* é o segundo gênero mais frequentemente isolado em leite de cabra após os *Staphylococcus* spp., com uma prevalência variando de 1% a 9 % (Contreras et al., 1999; White e Hinckley, 1999; McDougall et al., 2002; Sánchez et al., 2004; Moroni et al., 2005b).

A mastite clínica apresenta-se com sinais patológicos evidentes, que afetam a produção de leite, promovendo mudanças quantitativas e qualitativas. Já a mastite subclínica é caracterizada pela presença de uma infecção intramamária sem sinais clínicos evidentes, sendo frequentemente acompanhada por um aumento na CCS no leite (White e Hinckley, 1999).

A prevalência da mastite clínica é geralmente inferior a 5% (Contreras et al., 1999; Bergonier et al., 2003; Moroni et al., 2005b), enquanto a mastite subclínica apresenta variação de 9-50 % (McDougall et al., 2001, 2002; Sánchez et al., 2004; Moroni et al., 2005a; Leitner et al., 2007).

Fatores relacionados ao rebanho, tais como o número de crias, estágio de lactação e idade, influenciam de forma significativa a prevalência de mastite em cabras. Normalmente, as taxas de infecção são menos frequentes no primeiro parto, aumentando com a idade (McDougall et al., 2002; Moroni et al., 2005a). Ameh e Tari (2000) relataram que caprinos com idade entre dois e cinco anos apresentam maior risco de apresentar um quadro de mastite.

2.4 Resistência aos antimicrobianos e genes *mecA*, *blaZ*

A resistência aos fármacos antimicrobianos é um tema cada vez mais comum, principalmente na área da saúde pública. A mastite é a razão mais comum para o uso de

antimicrobianos na criação de gado leiteiro, sendo este utilizado na terapia de casos clínicos e infecções persistentes (Taponen et al., 2006).

O uso de antibióticos ou outras drogas de bovinos em pequenos ruminantes, ou até mesmo o uso em caprinos de produtos indicados para ovinos, constituem um alto risco, uma vez que a segurança e eficácia destes produtos para espécie caprina são desconhecidos (Mavrogianni et al., 2011). Neste contexto, entre os agentes antimicrobianos aprovados para uso na mastite bovina, os β -lactâmicos, tais como as penicilinas e cefalosporinas desempenham um papel fundamental. A resistência aos β -lactâmicos é mediada pelo gene *blaZ* ou *mecA* que codifica a proteína fixadora de penicilina (PBP 2a). Esta proteína tem baixa afinidade de ligação para antibióticos β -lactâmicos. Trata-se de uma transpeptidase que pode assumir a síntese da parede celular bacteriana durante o tratamento com o antibiótico, quando normalmente PBPs são inativadas pela ligação com os anéis de compostos β -lactâmicos (Brakstad e Maeland, 1997). De acordo com Thorberg et al. (2006), os seres humanos e animais leiteiros podem compartilhar cepas de SNC, o que significa que estes patógenos têm potencial zoonótico.

Os *Staphylococcus aureus meticilina resistente* (MRSA) constituem um grupo de cepas de *S. aureus* que adquiriram um gene, chamado *mecA*, conferindo a resistência à meticilina e, essencialmente, a todos os outros antibióticos beta-lactâmicos. O primeiro relato de MRSA data de 1961, logo após a meticilina ser introduzida na medicina humana para o tratamento de estafilococos resistentes à penicilina (Buyukcanga et al., 2013). Recentemente, clones de MRSA foram detectados em populações animais (Lee, 2003; Febler et al. 2010; Buyukcanga et al., 2013). Embora a emergência de MRSA esteja associada com a aquisição do gene *mecA*, a utilização inadequada dos antibióticos não deve ser subestimada no processo de surgimento deste mecanismo de resistência em bactérias (Chambers, 1997).

Infecções intramamárias causadas por MRSA estão, em parte, relacionadas com falhas durante as terapias anteriores, tais como dosagem e escolha equivocada do antimicrobiano (Juhasz-Kaszanyitzky et al., 2007; Febler et al., 2010). Embora tenha sido esporadicamente isolado em animais, nos últimos anos observou-se um maior número de pesquisas demonstrando o seu isolamento em rebanhos leiteiros, na suinocultura e em animais levados a hospitais veterinários (Seguin et al., 1999; Voss et al., 2005; Juhasz-Kaszanyitzky et al., 2007; Buyukcangaz et al., 2013).

A mastite estafilocócica é um dos principais problemas em propriedades leiteiras e, conseqüentemente, para a indústria de laticínios em muitos países (Barkema et al., 2006). Na mastite causada por *S. aureus* sensíveis a penicilina, tem-se a benzilpenicilina como

antibiótico de eleição (Constable et al., 2008). No entanto, a resistência à benzilpenicilina é comum entre estes causadores de mastite, embora seja observada ampla variação entre os países (Hendrikesen et al., 2008).

A resistência à benzilpenicilina é causada, principalmente, pela produção de beta-lactamases que destroem o anel beta-lactamâmico hidroliticamente, sendo esta enzima codificada pelo gene *blaZ* (Pinho, 2008). O gene *blaZ* pode estar localizado no cromossomo ou em plasmídeos (Lyon e Skurray, 1987). Este tipo de resistência à penicilina em *S. aureus* pode, assim, surgir por meio de dois mecanismos: propagação de clones resistentes ou através da disseminação horizontal de elementos móveis que contêm o gene *blaZ* (Aarestrup e Schwarz, 2006; Malachowa e Deleo, 2010).

A utilização de técnicas, a exemplo da utilização de *primers* para detecção destes genes é muito útil para se estabelecer o perfil de resistência das linhagens mediante o uso de diversos antimicrobianos. A detecção de genes de resistência em micro-organismos isolados de amostras clínicas permite orientar a terapia e estabelece um prognóstico após sucessivas culturas positivas (Neves et al., 2007). Os testes genéticos podem ser usados como referência para avaliar novas técnicas que determinam a referida resistência (Tenover et al., 1995).

2.5 Produção de biofilme e principais genes envolvidos (*icaA*, *icaD* e *bap*)

O biofilme é uma estrutura formada pela organização das células bacterianas por meio de uma matriz de biopolímeros que as envolve e as unem a uma superfície. Este arranjo está relacionado à troca de material genético, patogenicidade e resistência aos antimicrobianos (Soto et al., 2006). Segundo Antunes et al. (2007), esta substância faz com que as células bacterianas se aglomerem em multicamadas, deixando-as menos acessíveis ao sistema de defesa do organismo e aos antimicrobianos. Esta estrutura já foi encontrada em diversos micro-organismos de interesse veterinário, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila* (Clutterbuck et al., 2007).

Muitas hipóteses sobre mecanismos que justifiquem um aumento da resistência em patógenos formadores de biofilme têm sido avaliadas, dentre elas pode-se destacar a baixa penetração do antimicrobiano, lenta taxa de crescimento bacteriano na maturação do biofilme pela limitação de nutrientes ou como resposta ao estresse iniciado com a sua formação, e, ainda, indução de um fenótipo caracterizado por bomba de efluxo e alteração da composição da membrana protéica (Antunes et al., 2007).

Os estafilococos são conhecidos como os patógenos mais comuns em infecções associadas ao biofilme. Isto ocorre por serem bactérias comensais, frequentes na pele e superfícies mucosas de diversos mamíferos. Durante muito tempo, a investigação sobre a base molecular da formação de biofilme foi voltada para patógenos Gram-negativos, predominantemente *Pseudomonas aeruginosa*. Contudo, os avanços na biologia molecular permitiram aos pesquisadores determinar as bases moleculares da formação de biofilme em estafilococos (Otto, 2008).

A implicação de biofilmes em infecções e resistência às drogas tem provocado um crescente interesse na caracterização dos genes envolvidos na formação desta matriz. A adesão intercelular (ica) consiste dos genes *icaADBC* e, entre estes, os genes *icaA* e *icaD* têm sido relatados desempenhando um papel significativo na formação de biofilmes em *S. aureus* e *S. epidermidis* (Gotz, 2002). O locus *ica* tem sido detectado na maioria dos isolados de *S. aureus* oriundos de casos de mastite, indicando o seu papel potencial como fator de virulência na patogênese da mastite em ruminantes (Vasudevan et al., 2003).

A proliferação das células para aderir e formar biofilme é mediada pela produção do polissacarídeo intercelular chamado adesina (PIA) ou de *N*-acetilglicosamina polimérica (PNAG), e por um conjunto de quatro genes organizados em um operon (*icaADBC*) responsável pela expressão do PIA. Segundo O' Gara (2007), a co-expressão dos genes *icaA* e *icaD* é fundamental para a síntese completa do biofilme. De acordo com Gerke et al., (1998), o gene *icaD* é considerado fundamental na máxima expressão do *N*-acetilglicosamina transferase, conduzindo a expressão fenotípica do polissacarídeo capsular.

A implicação do biofilme na infecção bacteriana crônica em muitas espécies desencadeou um crescente interesse na caracterização de genes envolvidos na formação de biofilme (Vautor et al., 2008). O gene *bap* foi identificado como responsável pela codificação de uma proteína associada ao biofilme, contudo, até agora este gene foi encontrado em uma pequena proporção de cepas de *S. aureus* de mastite bovina na Espanha (Cucarella et al., 2001). Vautor et al. (2008), avaliaram a presença do gene *bap* em isolados de *S. aureus* isolados de diversas espécies e regiões por meio da PCR, não sendo observada a presença do mesmo em nenhum dos isolados, sugerindo que a prevalência deste gene entre os isolados de *S. aureus* deve ser muito baixa.

Para Arciola et al. (2012), embora alguns estudos tenham a preocupação de realizar representações esquemáticas do processo que conduz à formação de biofilme e, posteriormente, a sua dispersão, todos os esforços para ilustrar graficamente o comportamento de bactérias acabam sendo simplistas. Fatores de virulência envolvidos na adesão e formação

de biofilme são geralmente parte do genoma acessório e, como tal, não são comuns a todas as cepas. Além disso, modelos *in vitro* de formação de biofilme estão longe de descrever as complexas interações que ocorrem sob condições *in vivo*.

Os primeiros eventos que envolvem a expressão de adesinas, exopolissacarídeos e proteínas envolvidas na agregação de células e formação de biofilme são orquestrados pelo fator σ^B e proteínas SarA. Uma vez que o biofilme atinge a fase final de maturação, o excesso de peptídeo desencadeia o início da fase de dispersão, caracterizado pelo aumento de expressão de RNAlII com a consequente produção de proteases extracelulares (Arciola et al., 2012).

O *Staphylococcus aureus* representa um importante agente de mastite contagiosa, sendo disseminado entre animais não infectados, durante a ordenha, na ausência de práticas de higiene adequadas (Annemuller et al., 1999; Leitner et al., 2003; Cuteri et al., 2004). A patogênese da mastite causada por *S. aureus* é atribuída ao efeito combinado de fatores extracelulares e toxinas, que em conjunto com as propriedades invasoras, tais como a aderência por meio da formação de biofilme dificulta fagocitose (Cramton et al., 1999). A matriz que envolve os *S. aureus* contribui para adesão e colonização do organismo no epitélio da glândula mamária (Baselga et al., 1993; Aguilar et al., 2001). A capacidade de *S. aureus* para formar biofilme é considerada um relevante fator de virulência, capaz de influenciar o processo de patogenia na mastite (Cifrian et al., 1994; Costerton et al., 1999).

2.6 Ferramentas diagnósticas da mastite em ruminantes

As técnicas de monitoramento devem ser utilizadas na detecção de mudanças no estado geral de saúde da glândula mamária de uma fêmea ou um rebanho caprino, permitindo, dessa forma, uma intervenção ainda nos estágios iniciais da mastite (Koop et al., 2012b). Os sinais clássicos da mastite clínica são: dor, edema, rubor, calor e perda de função, com consequente queda na produção de leite (Smith e Sherman, 2009). Por outro lado, a mastite subclínica pode ser definida como a inflamação da glândula mamária, sem a presença de sinais clínicos visíveis. Dessa forma, a mastite subclínica pode não ser detectada, se ferramentas diagnósticas adicionais não forem empregadas. Duas ferramentas usadas com frequência são a cultura bacteriológica e a contagem de células somáticas (CCS) (Koop et al., 2012b). Enquanto que a mastite clínica apresenta baixa incidência em caprinos, a forma subclínica da enfermidade é muito comum, sendo a CCS bem maior no leite de cabras quando

comparada com o de fêmeas bovinas (Bergonier et al., 2003; Contreras et al., 2007; Paape et al., 2007).

Avaliação da saúde do úbere, especialmente da mastite subclínica em um rebanho de cabras leiteiras, requer conhecimento para interpretação dos dados das ferramentas de diagnóstico disponíveis (Koop et al., 2012b). A CCS se refere a contagem do número de células no leite, expressa em células/mL, podendo ser medida ao nível da glândula, animal ou rebanho. Para monitorar a saúde do úbere de uma cabra leiteira, a CCS é provavelmente a ferramenta mais relevante (Koop et al., 2012b). Estes autores afirmaram que a CCS tem características aceitáveis para o uso como um teste de triagem. Com um valor de corte de 1500×10^3 células/mL, a sensibilidade foi estimada em 0,86 e a especificidade em 0,95, em detecção de *S. aureus* em cabras infectadas no início da lactação (Koop et al., 2011). A CCS é tida como a técnica mais viável economicamente do que a cultura bacteriológica e, em alguns países, onde há programas de melhoria da cadeia produtiva do leite, a CCS apresenta-se como técnica menos demorada que o *California Mastitis Test* (CMT), uma vez que as coletas para avaliação da composição do leite são rotineiras (Koop et al., 2012b).

De acordo com Koop et al. (2012b), na maioria dos estudos, a cultura bacteriológica (CB) é utilizada para determinação do verdadeiro estado de saúde da glândula mamária. Vários critérios são adotados para identificação da doença, tais como número de colônias isoladas na lactocultura (uma ou mais; 5 ou mais colônias idênticas a partir de 10 μ L de inóculo (Contreras et al., 1996). No entanto, a validade da cultura bacteriana como um teste de diagnóstico pode ser questionada. Sánchez et al. (2004) descreveram o efeito do momento da coleta (pré ou pós-ordenha) sobre a probabilidade de detectar amostras positivas, além de descrever também o efeito do armazenamento do leite na recuperação de patógenos (Sánchez et al., 2003). Também em vacas, alguns autores têm apontado que o uso de métodos de rotina, como a cultura bacteriológica, nem sempre resulta na detecção de todos os agentes patogênicos presentes na glândula mamária (Buelow et al., 1996; Sol et al., 2002). Dessa forma, apesar da cultura bacteriológica ser um teste bastante útil, pode apresentar-se como teste imperfeito durante o diagnóstico de infecções intramamárias (Erskine e Eberhart, 1988; Sanford et al., 2006). Ainda assim, muitas vezes é visto como o melhor método disponível (Torres et al., 2009).

Em estudo realizado por Koop et al. (2011), a sensibilidade da cultura bacteriológica para a detecção de *S. aureus* em leite de cabras foi baixa, o que reduz fortemente o seu valor como teste de confirmação em amostras de animais com alta CCS em virtude da presença de *S. aureus*. Um dos pontos positivos da CB é a possibilidade de indicação dos potenciais

patógenos presentes no leite (Koop et al., 2012b). Embora a maioria dos patógenos isolados de casos de mastite subclínica pertence ao gênero *Staphylococcus*, tem-se outros microorganismos relevantes, muitas vezes detectados facilmente na CB. A identificação dos microorganismos responsáveis pelos problemas de mastite nos rebanhos é fundamental para orientar as intervenções que deverão ser realizadas na propriedade, baseando-se, por exemplo, nas características de transmissão do agente patogênico isolado (Koop et al., 2012b). No entanto, a determinação da verdadeira sensibilidade e especificidade da CB requer outros testes, entre os quais, pode-se citar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta ferramenta é vista como promissora para a detecção de patógenos causadores de mastite, sendo observada maior positividade na PCR em tempo real quando comparada a CB (Koskinen et al., 2009; Taponen et al., 2009; Bexiga et al., 2011). O benefício de PCR sobre a cultura bacteriana decorre da sua capacidade de detectar amostras positivas quando a concentração de bactérias no leite é bastante reduzida ou quando o patógeno não cresce nos cultivos convencionais. Dessa forma, a validação da utilização de PCR para o diagnóstico de infecções intramamárias em caprinos é campo de pesquisa bastante importante e necessário (Koop et al., 2012b).

Contudo, a cultura bacteriológica (CB) é considerada o padrão ouro no diagnóstico de infecção intramamária subclínica (IMI) (Sánchez et al., 2004). A utilização de uma única amostra de leite para exame bacteriológico pode contribuir para o diagnóstico falso negativo. Por esta razão, é amplamente recomendável a realização de dois testes para classificação da glândula mamária em positiva ou não. No entanto, por razões econômicas e práticas, apenas uma amostra de leite é geralmente utilizada (Sears et al., 1993).

O monitoramento da saúde da glândula mamária em cabras deve ter como principal objetivo a identificação de fêmeas infectadas com *S. aureus*. A CCS e a CB são valiosas ferramentas de diagnóstico, mas têm algumas limitações. Para CCS, os fatores de ordem não infecciosa desafiam as interpretações dos resultados dos testes. Conhecer a cadeia epidemiológica da enfermidade é fundamental para uma correta aplicação e interpretação dos resultados fornecidos por estes testes (Koop et al., 2012b).

De acordo com revisão realizada por Souza et al. (2012), a contagem de células somáticas do leite é a base dos programas de controle da mastite e controle de qualidade do leite. Em especial na espécie caprina, na CCS os neutrófilos constituem o principal tipo de célula. A secreção do leite de pequenos ruminantes é do tipo apócrina, ou seja, partículas citoplasmáticas também são componentes normais do leite, aumentando aparentemente a concentração de leucócitos no leite de cabras. Além disso, a contagem de células somáticas do leite é influenciada por outros fatores de origem não infecciosa, tais como estágio de lactação

e ordem de parto. No entanto, a mastite é o principal fator que leva à um aumento na contagem de células somáticas, devido à resposta a infecção.

Dessa forma, observa-se que o diagnóstico de mastite em cabras baseia principalmente na contagem de células somáticas (CCS) no leite (Quadro 1). Outros testes indiretos, como o *California Mastitis Test* tem sido estudado, e é utilizado para o diagnóstico de mastite (McDougall et al., 2001; Bergonier et al., 2003; Sánchez et al, 2004; Contreras et al, 2007).

Quadro 1. Análise do leite de cabra e interpretação dos escores de CMT e CCS

Resultado do CMT	Contagem de células somáticas (células/mL)	Interpretação
Negativo	0 a 480.000	Normal
Traços	0 a 640.000	Normal
1+	240.000 a 1.440.000	Normal
2+	1.080.000 a 5.850.000	Mastite
3+	Acima de 10.000.000	Mastite

Fonte: Smith e Sherman (2009).

2.7 Estratégias de prevenção e tratamento

A higiene é a base para redução dos casos de mastite em rebanhos leiteiros e a utilização do pré e pós *dipping* é altamente eficaz na prevenção de novas infecções intramamárias por diferentes patógenos (Hogan et al., 1987). Em pequenos ruminantes, a desinfecção do teto após a ordenha tem sido usada, principalmente, em rebanhos altamente infectados (Paape et al., 2001; Bergonier e Berthelot, 2003, Contreras et al., 2003), e esta tem se revelado como método muito eficaz para prevenir a mastite.

A utilização de vacinas para o controle da mastite torna-se uma opção econômica para os veterinários e criadores, uma vez que reduz custos e tem efeitos positivos sobre a qualidade do leite e a saúde pública, já que diminui a necessidade do uso de antimicrobianos. Vacinas contra mastite clínica gangrenosa, que estão disponíveis no mercado de pequenos ruminantes, são amplamente usadas quando há uma alta prevalência da infecção (Portes et al., 2006). Contudo, devido os diferentes relatos sobre a efetividade destas vacinas para vacas leiteiras e ovelhas, e sua inabilidade para prevenir novas infecções, tem sido sugerido que as vacinas sejam usadas em rebanhos leiteiros com alta prevalência de *S. aureus* para reduzir os sinais clínicos (Contreras et al., 2007). A efetividade dos programas de vacinação contra mastite causada por *S. aureus* tem sido relatada para ovelhas, mas não para cabras (Amorena et al.,

1994; Tollersrud et al., 2002). De modo geral, estudos com vacinação têm fracassado em desenvolver esta ferramenta para o controle da mastite, e mais estudos sobre imunização são necessários para melhorar esta estratégia (Contreras et al., 2007).

O método mais comumente empregado para o tratamento da mastite é baseado no uso de antimicrobianos sistêmicos ou intramamários. Neste sentido, o sucesso do tratamento da mastite envolve uma série de fatores incluindo a escolha do antimicrobiano, susceptibilidade do micro-organismo, duração do tratamento, dosagem empregada e o *status* imune do animal (Erskine et al., 1993). A mastite causada por *S. aureus* é de difícil eliminação, e a presença de animais positivos para este patógeno, representa uma séria ameaça aos demais animais do rebanho (Sears e McCarthy, 2003). Como a terapia durante o período seco é bem sucedida em 40 % a 70 % dos casos, este é considerado o melhor período para tratamento (Nickerson, 1993). Contudo, devido a dificuldade de eliminação do *Staphylococcus aureus* em infecções intramamárias, foram desenvolvidos protocolos com período de tratamento ao longo de 6 a 8 dias a fim de manter os níveis terapêuticos do antimicrobiano. Nestes casos, as taxas de cura variaram desde índices inferiores a 20% até mais de 60 %, com uma redução acentuada na contagem de células somáticas do leite (CCS) (Owen et al., 1997).

Dentre as diversas fases do processo produtivo, o período seco representa uma fase de susceptibilidade a novas infecções. Em bovinos leiteiros, a terapia no período seco apresenta uma série de vantagens, sendo os índices de recuperação elevados (40-70%) (Nickerson, 1993). No entanto, nos casos de mastite por *S. aureus* torna-se mais difícil a obtenção de bons resultados ao tratamento (Sears e McCarthy, 2003). Em pequenos ruminantes, a terapia no período seco não constitui uma prática rotineira nas criações voltadas para produção de leite. Contudo, a terapia da mastite em ovelhas e cabras não-lactantes tem-se mostrado como uma ferramenta eficiente na redução das infecções intramamárias, proporcionando ganhos na produção de leite (Fox et al., 1992; Gonzalo et al., 2004). O tratamento no período seco é recomendado para rebanhos com um elevado número de animais com mastite subclínica associado com altas CCS. Por outro lado, o manejo adequado do rebanho, especialmente antes do parto e nos dias que se seguem, resulta em menores índices de mastite, sem a necessidade de utilização dos antimicrobianos (Shwimmer et al., 2008).

Diferentemente das infecções por *S. aureus*, outras infecções estafilocóccicas são mais facilmente tratadas e eliminadas. Além disso, a terapia no período seco pode eliminar 80% a 100% das infecções por *Staphylococcus coagulase negativa*, enquanto que a taxa de cura espontânea pode alcançar índices de até 73% (Harmon e Langlois, 1989). Entretanto, tem-se

observado o fenômeno da resistência antimicrobiana em muitos isolados de *Staphylococcus coagulase negativa* (Lollai et al., 2008; Taponen e Pyörälä, 2009).

A antimicrobianoterapia deverá sempre ser acompanhada por um veterinário, no sentido de garantir a adequada e higiênica administração (Contreras et al., 2007). O uso excessivo de antibióticos pode aumentar o risco da resistência, fato que tem se tornado um problema de saúde pública. Goni et al. (2004) destacam que a detecção de cepas de *S. aureus* resistentes aos aminoglicosídeos deve ser considerada uma preocupação para saúde pública, dado ao mecanismo similar para cepas isoladas em humanos.

A partir de 1950, quando os antibióticos passaram a ser amplamente utilizados, intensificou-se o fenômeno de resistência bacteriana. Desde então, o problema da resistência passou a representar importância considerável em saúde pública. Essas infecções, além de contribuírem com significativas perdas econômicas, podem ser consideradas como um sério problema para a saúde pública (Barlett et al., 1992).

São vários os registros históricos sobre a utilização das plantas para tratamento de doenças nos seres humanos e animais. Um dos primeiros relatos sobre o uso de plantas medicinais pelo homem teve origem na Mesopotâmia e data de aproximadamente 2.600 a.C. Desde então, o emprego de plantas medicinais como instrumento de cura tem passado por diferentes paradigmas. Inicialmente, a utilização de plantas era realizada basicamente de forma empírica, sendo o conhecimento repassado entre as gerações. Ao longo do tempo, as plantas medicinais tornaram-se alvo de interesse para pesquisas científicas, aliando diferentes percepções sobre esse instrumento terapêutico (Leite, 2009).

A utilização de medicamentos homeopáticos e fitoterápicos tem demonstrado resultados satisfatórios durante a terapia dos casos de mastite, porém os estudos são voltados em sua maioria para a espécie bovina (Egan, 1995; Almeida, 2004; Thomaz, 2004). Mitidiero (2002) demonstrou que esta terapia alternativa permite manter a sanidade do rebanho em padrões semelhantes aos da alopatia, constituindo-se assim, em uma opção viável para os produtores de leite. Estudos *in vitro* visando à determinação do potencial antimicrobiano de plantas pertencentes à flora brasileira têm demonstrando resultados satisfatórios (Granato et al., 2005; Oliveira et al., 2007; Ushimaru et al., 2007), porém observa-se a descontinuidade destes estudos e uma fragmentação dos resultados, não permitindo muitos avanços na área.

Alguns trabalhos vêm demonstrando a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de plantas da flora nordestina, em especial do bioma caatinga. Pode-se citar a *Amburana cearensis* (Bravo et al., 1999), *Borreria verticillata* (L.) G. Mey (Peixoto-Neto et al., 2002) e

espécies pertencentes ao gênero *Hymenaea* (Fernandes et al., 2005; Gonçalves et al., 2005; Granato et al., 2005; Valentim, 2006).

2.8 Gênero *Hymenaea* e principais atividades biológicas

O gênero *Hymenaea* é pertencente à família *Leguminosae* (Fabaceae), subfamília *Caesalpinieae*, com nome popular de Jatobá, originário da língua tupi, cujo significado é “arvore de fruto duro”. A palavra *Hymenaea* deriva do grego “Hymen” e significa “deus das uniões” (Barroso et al., 2007). Esta planta é originária da África (Lee e Langenheim, 1975 *apud* Souza, 2008) e pode ser encontrada no México, Cuba e América do Sul, sendo de grande distribuição no cerrado Brasileiro (Minas Gerais, Bahia, Goiás e Tocantins) e na floresta Amazônica (Silva et al., 1994; Pettit et al., 2003).

De acordo com Souza (2008), aproximadamente 25 espécies do gênero *Hymenaea* foram descritas como originárias do continente Americano, a maioria com madeira de alto valor comercial. No Brasil verifica-se a presença de 13 espécies (Corrêa, 1984). O jatobá é uma árvore grande, com 15 a 20 metros de altura (podendo chegar até 40 metros na região Amazônica), possuindo tronco reto, com cerca de 2 metros de diâmetro, copa arredondada com folhagem densa e casca espessa de até 3 centímetros (Apêndice 1). A casca externa tem cor cinza-clara com pequenos sulcos e espessura de até 10 mm e a casca interna é rosada apresentando uma resina cor de vinho, ocorrendo frequentemente em solos argilosos e pobres (Shanley e Medina, 2005).

Esta planta produz madeira de alto valor comercial, com excelente aceitação no mercado externo pela sua durabilidade, sendo utilizada na construção civil (Granato et al., 2005; Shanley e Medina, 2005). A resina da madeira, chamada de “jutaicica”, é utilizada na indústria e na área farmacêutica (Almeida et al., 1998) sendo normalmente encontrada no pé da árvore, escorrida das “feridas” abertas pelos insetos na casca do tronco e é um excelente impermeabilizador natural (Shanley e Medina, 2005). Os frutos dessa árvore, de sabor adocicado, aspecto farináceo e cheiro característico, possuem elevado teor de fibra alimentar e são utilizados na alimentação humana e animal e possuem um alto teor de cálcio e magnésio (Corrêa, 1984; Silva et al., 2001). A polpa dos frutos é bastante apreciada na culinária regional, produzindo uma farinha que é utilizada para elaboração de bolos, pães, biscoitos e mingaus (Almeida et al., 1998).

O gênero *Hymenaea* é utilizado na medicina popular no tratamento de várias enfermidades, tais como, infecções pulmonares, laringites, diarreia entre outras patologias

(Shanley e Medina, 2005; Agra et al., 2007). Os principais constituintes dessa planta são os terpenos, detectados na resina exsudada pelo tronco e em extratos da casca (Nogueira et al., 2001) além de taninos e fenóis (Caramori et al., 2004).

Da casca da *H. martiana* foi isolado um flavonoide “astilbina” que apresenta atividade antioxidante e hepatoprotetora (Closa et al., 1997). Algumas pesquisas têm demonstrado a presença de atividade antibacteriana *in vitro* para preparações obtidas de plantas do gênero *Hymenaea* (Marsaioli, 1975; Almeida Alves et al., 2000; Novais et al., 2003; Fernandes et al., 2005; Gonçalves et al., 2005; Granato et al., 2005; Valentim, 2006; Linhares e Ximenes, 2010; Dimech et al., 2013), além de atividade antifúngica da *Hymenaea martiana* (Souza, 2008).

2.9 Extrato de plantas x interferência sobre fatores de virulência

Tendo em vista que as terapias antimicrobianas convencionais têm a desvantagem de selecionar bactérias resistentes, outros mecanismos visando o controle das enfermidades têm sido estudados. Assim, controlar apenas a virulência de bactérias, mas não o seu crescimento parece ser uma alternativa viável. As plantas podem oferecer oportunidades para descoberta de potenciais moléculas bioativas contra os fatores de virulência de organismos patogênicos. Dentro estes fatores de virulência, têm-se o biofilme bacteriano, capaz de desencadear um quadro crônico da doença, mesmo com a utilização de tratamentos com antimicrobianos. Alguns estudos vêm avaliando a capacidade dos extratos de plantas em interferir nos mecanismos relacionados aos fatores de virulência, a exemplo do potencial de inibir ou destruir biofilmes, ou ainda, interferir em sistemas *quorum-sensing* (QS) (Linhares e Ximenes, 2011; Nazzaro et al., 2013; González-Ortiz et al., 2014).

O sistema QS pode ser definido como a habilidade que algumas bactérias têm de coordenar um comportamento coletivo por meio de um mecanismo regulador via expressão simultânea de grupos de genes e transdução de sinal em conformidade com a densidade de micro-organismos (Fuqua et al., 1994), sendo este fenômeno descrito pela primeira vez em *Vibrio fischeri* (Nealson et al., 1970). É sabido que várias espécies de bactérias fazem uso do QS objetivando regular uma série de fenótipos, entre estes, a formação de biofilmes, bioluminescência, produção de antibióticos e outros fatores de virulência (Camilli e Bassler, 2006). Tendo em vista que as alterações no QS podem influenciar na patogenia das doenças infectocontagiosas, as alterações que acontecem nos padrões QS podem ser empregadas para o controle da densidade populacional bacteriana e, assim, evitar o avanço de diversas

bacterioses. A etapa inicial consiste na síntese de auto-indutores (AI) e, em algumas bactérias, as *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) são os principais responsáveis nesta etapa. Outras enzimas são responsáveis pela clivagem do anel de homoserina das AHLs e, portanto, são denominadas de enzimas “*quorum-quenching*” (QQ). Dessa forma, a inativação e/ou ausência de mensageiros QS pode inibir a formação de biofilmes e, conseqüentemente, controlar o surgimento das infecção bacteriana (Rasmussen e Givskov, 2006).

Alguns extratos de plantas têm ação comprovada sobre o metabolismo microbiano de várias bactérias patogênicas. González-Ortiz et al. (2014) avaliaram a atividade anti-biofilme e a capacidade de interferência nos sistemas QS do farelo de trigo, em condições *in vitro*, sendo observado que extrato solúvel deste farelo na concentração de 0,5% foi capaz de inibir e destruir o biofilme, além de interferir também com os sistemas de QS bacterianas, como foi demonstrado, devido a atividade da lactonase capaz de reduzir a concentração dos autoindutores, as acil-homoserina lactonas (AHL) no meio.

A formação de biofilme por bactérias é um dos principais fatores de virulência, pois está relacionado com formação de uma “barreira” contra a resposta imune do hospedeiro e o contato com agentes antimicrobianos. Assim, está relacionada com a cronicidade da infecção (Cegelski et al., 2008) A utilização de concentrações sub-inibitórias do extrato hidro-alcoólico de uma planta do gênero *Hymenaea* reduziu a atividade de alguns fatores de virulência de *S. aureus*, dentre estes, a catalase, lipase e formação de biofilme (Linhares e Ximenes, 2011). Estes autores destacaram que a capacidade que o extrato hidro- alcoólico da planta apresentou em reduzir a atividade de alguns fatores de virulência se deve, provavelmente, pela presença dos metabólitos secundários como os flavonoides e taninos.

Extratos contendo altos teores de compostos fenólicos podem estar diretamente relacionados à atividade antimicrobiana (Dimech et al., 2013). Há uma correlação positiva entre a presença de taninos ou flavonoides e atividade antimicrobiana dos extratos de plantas (Cowan, 1999; Okoro et al. 2010). Os flavonoides têm a capacidade de formar complexos com proteínas e células bacterianas, sendo estes irreversíveis, principalmente com aminoácidos nucleofílicos (Cowan, 1999).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos pode ser explicado, a princípio, por meio de três hipóteses: 1. inibição de enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexando com os substratos dessas enzimas; 2. ação sobre as membranas celulares dos micro-organismos, modificando seu metabolismo; 3. formação de complexos dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (Scalbert, 1991).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a interferência do extrato da planta na formação do biofilme e o potencial terapêutico do extrato etanólico da *Hymenaea martiana* Hayne no tratamento da mastite em cabras experimentalmente infectadas com cepa de *Staphylococcus aureus*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização molecular de isolados obtidos de amostras de leite de cabra;
- Determinar o perfil de sensibilidade de isolados de *S. aureus* aos fármacos comumente utilizados no tratamento das mastites;
- Verificar a resistência múltipla dos isolados as drogas testadas;
- Determinar a composição química do extrato da *H. martiana*;
- Determinar a concentração bacteriana mínima (CBM) para as frações obtidas a partir do extrato bruto da *H. martiana*;
- Analisar a concordância das diferentes técnicas empregadas para o diagnóstico da mastite em fêmeas caprinas.
- Avaliar as alterações nas características químicas do leite de cabra após infecção experimental com *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar o potencial terapêutico o extrato etanólico bruto da *H. martiana* no tratamento da mastite caprina induzida experimentalmente com *S. aureus*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M.; SCHWARZ, S. (2006). Antimicrobial resistance in staphylococci and streptococci of animal origin. In Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Edited by Aarestrup FM. Washington, DC: ASM Press:187-212.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA FILHO, J.M. (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Rev Bras Farmacognosia. 17:114-140.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; CÂMARA, C.A.; SILVA, T.M.S.; ALMEIDA, R.N.; AMARAL, F.M.M.; ALMEIDA, M.Z.; MEDEIROS, I.A.; MORAES, M.O.; BARBOSA FILHO, J.M.; NURIT, K.; OLIVEIRA, F.S.; FREIRE, K.R.L.; MORAIS, L.C.S.L.; RÊGO, T.J.A.S.; BARROS, R.F.M. (2005) Medicináveis e produtoras de princípios ativos. In: SAMPAIO, E.V.S.P; PAREYRN, F.G.C; FIGUEIRÔA, J.M.; SANTOS JUNIOR, A.G. (Ed). Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial. Recife: Associação de Plantas do Nordeste, p.135-198.
- AGUILAR, B.; AMORENA, B.; ITURRALDE, M. (2001). Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. Vet Microbiol., 78:183-191.
- AIRES-DE-SOUSA, M.; PARENTE, C.E.S.R.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; BONNA, I.C.F.; SILVA, D.A.; LENCASTRE, H. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Buffalo, Bovine, Ovine, and Caprine Milk Samples Collected in Rio de Janeiro State, Brazil. Appl environ microbiol. 73(12):3845-3849.
- ALMEIDA, S.P.A.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. (1998). Cerrado: Espécies vegetais úteis. Planaltina. Embrapa - CPAC 464p.
- ALMEIDA ALVES, T.M.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C.L. (2000). Biological screening of brasilian medicinal plants. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 95(3):367- 373.
- ALMEIDA, L.A.B. (2004). Avaliação do tratamento alopático e homeopático de mastite bovina em animais inoculados com *Staphylococcus aureus*. Dissertação (Mestrado em epidemiologia experimental e aplicada às zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 104p.
- AMEH, M.J.A.; TARI, I.S. (2000). Observations on the prevalence of caprine mastitis in relation to predisposing factors in Maiduguri. Small Rumin Res. 35:1-5.
- AMORENA, B.; BASELGA, R.; ALBIZU, I. (1994). Use of liposome immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. Vaccine. 12:243-249.
- ANNEMULLER, C.; LAMMLER, C.H; ZSEHOCK, M. (1999). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Vet Microbiol., 69:217-224.
- ANTUNES, A. L. S.; PEREZ, L., R. R.; REITER, K. C.; SECCHI, C.; FREITAS, A.L. P. (2007). Detecção da produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. por Agar Congo Red. Revista de Saúde da UCPEL. 1:27-31.
- ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; MONTANARO, L.; COSTERTON, J.W. (2012). Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials., 33(26):5967-5982.
- BARKEMA, H.; SCHUKKEN, Y.H.; ZADOKS, R.N. (2006) Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine staphylococcus aureus mastitis. J Dairy Sci., 89:1877-1895.
- BARLETT.P.C.; MILLER, G.,Y.; LANCE, S.E.; HEIDER, L.E. (1992). Managerial determinants of intramammary coliform and environmental streptococci infections in Ohio dairy herds. J. Dairy Sci. 14:1241-1252.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F. (2007). Sistemática de angiospermas do Brasil. v.1. 2.ªed. Viçosa: Editora UFV. 309p.
- BASELGA, R.; ALBIZU, I.; DE LA CRUZ, M.; DEL CACHO, E.; BARBERAN, M.; AMORENA, B. (1993) Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implication in colonization and virulence. Infect Immun. 61:4857- 4862.

- BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. (2003). New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livest. Prod. Sci.* 79:1-16.
- BERGONIER, D.; CREMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G.; BERTHELOT, X. (2003) Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res*, 34:689–716.
- BERRY, S.L.; MASS, J.; KIRK, J.H.; REYNOLDS, J.P.; GARDNER, I.A.; AHAMADI, A. (1997) Effects of antimicrobial treatment at the end of lactation on milk yield, somatic cell count, and incidence of clinical mastitis during the subsequent lactation in a dairy herd with a low prevalence of contagious mastitis. *J Am Vet Med Assoc*, 211(2):207-211.
- BEXIGA, R.; KOSKINEN, M.T.; HOLOPAINEN, J.; CARNEIRO, C.; PEREIRA, H.; ELLIS, K.A.; VILELA, C.L. (2011). Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. *J Dairy Res.*, 78:49-55.
- BRAKSTAD, O.G.; MAELAND, J.A. (1997). Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. *APMIS*, 5(4):264- 276.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n.º 37 de 31 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra (Diário Oficial da República Federativa do Brasil), Brasília. Publicado em 08/11/2000. Seção 01, p.23. Acesso em 24 de abril de 2014.
- BRAVO, J.A.; SAUVAIN, M.; GIMENEZ, A.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LE MEN-OLIVER, L.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C. (1999). Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry*. 50(1):71-74.
- BUELOW, K.L.; THOMAS, C.B.; GOODGER, W.J.; NORDLUND, K.V.; COLLINS, MT. (1996). Effect of milk sample collection strategy on the sensitivity and specificity of bacteriologic culture and somatic cell count for detection of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy cattle. *Prev Vet Med*. 26:1-8.
- BUYUKCANGAZ, E.; KAHYA, S.; SEN, A.; INTAS, A.S.; EYIGOR, A.; TEMELLI, S.; CARLI, K.T. (2013). MecA gene prevalence in *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows in Turkey. *J. Biol. Environ. Sci.* 7(21): 183-190.
- CAMILI, A.; BASSLER, B. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*. 311(5764):1113-1116.
- CARAMORI, S.S.; LIMA, C.S.; FERNANDES, K.F. (2004). Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian savannas. *Braz Arch Biol Technol*. 47:253-259.
- CEGELSKI, L.; MARSHALL, G.R.; ELDRIDGE, G.R.; HULTGREN, S.J. (2008) The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol*, 6(1):17–27.
- CHAMBERS H.F. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev*, 10:781-791.
- CIFRIAN, E.; GUIDRY, A.J.; O'BRIEN, C.N.; NICKERSON, S.C.; MARQUARDT, W.W. (1994). Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci*. 77:970-983.
- CLOSA, D.; TORRES, M.; HOTER, G.; BIOQUE, G.; LEÓN, O.S.; GELPÍ, O.S.; ROSELLÓ-CATAFAU, J. (1997). Prostanoids and free radicals in CL4C-induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids* 56:331-334
- CLUTTERBUCK, A.L.; WOODS, E.J.; KNOTTENBELT, D.C.; CLEGG, P.D.; COCHRANE, C.A.; PERCIVAL, S.L. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol*, 121:1-7.
- CONSTABLE, P.; PYÖRÄLÄ, S.; SMITH, G. (2008). Guide for antimicrobial use in cattle. In *Antimicrobial Use in Animals*. Edited by Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H. Singapore: Blackwell Publishing Ltd, Fabulous Printers PTE Ltd:143-160.
- CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; CORRALES, J.C.; SÁNCHEZ, A.; MARCO, J. (1996) Physiological threshold of somatic cell count and California Mastitis Test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. *Small Rumin Res*, 21(3):259-264.
- CONTRERAS, A.; PAAPE, M.J.; MILLER, R.H. (1999). Prevalence of subclinical intramammary infection caused by *Staphylococcus epidermidis* in a commercial dairy goat herd. *Small Rumin Res*. 31:203-208.
- CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SANCHEZ, A.; CORRALES, J.C. (2003). The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livest. Prod. Sci.* 79:273-283.

- CONTRERAS A.; SIERRA D.; SÁNCHEZ A.; CORRALES J.C.; MARCO J.C.; PAAPE M.J.; GONZALO C. (2007) Mastitis in small ruminants. *Small Rumin Res*, 68:145–153.
- CORDEIRO, P.R.C.; CORDEIRO, A.G.P.C. A produção de leite de cabra no Brasil e seu mercado. In: X Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas e Média Mogiana, Espírito Santo do Pinhal, 2009. Disponível em: <http://www.capritec.com.br/pdf/LeitedeCabranoBrasil.pdf>. Acesso em: 24 de abril de 2014.
- CORRÊA MP. (1984). Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. v.4. 765p.
- COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infection. *Science*. 284:1318-1322.
- COWAN, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agentes. *Clin Microbiol Rev*. 12(4):564-582.
- CRAMTON, S.E.; GERKE, C.; SCHNELL, N.F.; NICHOLS, W.W.; GOTZ, F. (1999). The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*. 67: 5427-5433.
- CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADE J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol*. 183:2888-2896.
- CUTERI, V. MARENZANI, M.L.; MAZZOLA, R.; TOSTI, N.; MERLETTI, L.; ARCIONIAND, S.; VALENTE, C. (2004). *Staphylococcus aureus* study of genomic similarity of strains isolated in veterinary pathology using AFLD. *Indian J Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 27: 247-253.
- DIMECH, G.S.; SOARES, L.A.L.; FERREIRA, M.A.; OLIVEIRA, A.G.V.; CARVALHO, M.C.; XIMENES, E.A. (2013). Phytochemical and Antibacterial Investigations of the Extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. *The Scientific World Journal*. v.2013:1-8.
- EGAN, J. (1995). Evaluation of a homeopathic treatment for subclinical mastitis. *Vet. Rec*. 135(3):48.
- ERSKINE, R.J.; EBERHART, R.J. (1988). Comparison of duplicate and single quarter milk samples for the identification of intramammary infections. *J Dairy Sci*. 71:854-856.
- ERSKINE, R.J. (1992) Mastitis control in dairy herds with high prevalence of subclinical mastitis. In: The compendium collection, Infections disease in food animal practice, Veterinary Learning Systems, 14:7-15.
- ERSKINE, R.J.; KIRK, J.K.; TYLER, J.W.; DEGRAVES, F.J.; (1993). Advances in the therapy of mastitis. *Vet. Clin. N. Am*. 9(3):499-517.
- FERNANDES, T.T.; SANTOS, A.T.F.; PIMENTA, F.C. (2005). Atividade antimicrobiana das plantas – *Plathymenia reticulate*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Rev. Patol Trop*. 34(2):113-122.
- FEBLER, A.; SCOTT, C.; KADLEC, K.; EHRICHT, R.; MONECKE, S.; SCHWARZ, S. (2010). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J Antimicrob. Chemother*, 65: 619-625.
- FOX, L.K.; HANCOCK, D.D.; HORNER, S.D. (1992). Selective intramammary antibiotic therapy during the nonlactating period in goats. *Small Rumin. Res*. 9:313-318.
- FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*. 176:269-275.
- GERKE, C.; KRAFT, A.; SÜSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GÖTZ, F. (1998). Characterization of the N- acetylglucosaminyl-transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* – polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem*. 273(29):18586-18596.
- GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. (2005). Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq. Inst. Biol*. 72(3):353-358.
- GONI, P.; VERGARA, Y.; RUIZ, J.; ALBIZU, I.; VILA, J.; GOMEZ-LUS, R. (2004). Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 23:268-272.
- GONZÁLEZ-ORTIZ, G.; VAN UFFORD, H.C.Q.; HALKES, S.B.; CERDÀ-CUÉLLAR, M.; BEUKELMAN, C.J.; PIETERS, R.J.; LISKAMP, R.M.; PÉREZ, J.F.; MARTÍN-ORUE, S.M. (2014). New properties of wheat bran: anti-biofilm activity and interference with bacteria quorum-sensing systems. *Environ Microbiol*. 16(5):1346-1353.
- GONZALO, C.; TARDÁGUILA, J.A.; DE LA FUENTE, L.F.; SAN PRIMITIVO, F. (2004). Effects of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield in the subsequent lactation in dairy ewes. *J. Dairy Res*. 71:33-38.

- GOTZ, F. (2002) Microreview on *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*, 43:1367–1378.
- GRANATO, D.; NUNES, D.S.; MATTOS, P.P.; RIOS, E.M.; GLINSKI, A.; RODRIGUES, L.C.; ZANUSSO JÚNIOR, G. (2005). Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. *Braz. Archives of Biology and Technology*. 48:237-241.
- HARMON, R.J.; LANGLOIS, B.E. (1989). Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. *Agri-Practice*. 10:29-34.
- HENDRIKSEN, R.S.; MEVIUS, D.J.; SCHROETER, A.; TEALE, C.; MEUNIER, D.; BUTAYE, P.; FRANCO, A.; UTINANE, A.; AMADO, A.; MORENO, M.; GREKO, C.; STÄRK, K.; BERGHOLD, C.; MYLLYNIEMI, A.L.; WASYL, D.; SUNDE, M.; AARESTRUP, F.M. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002–2004. *Acta Vet Scand*. 50:28.
- HOGAN, J.S.; WHITE, D.G.; PANKEY, J.W. (1987). Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci*. 70:873-879.
- HOLANDA JUNIOR, E. V.; ARAÚJO, G. G. L. O papel dos caprinos e dos ovinos deslanados na agricultura familiar. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande – MS. Anais. Campo Grande – MS: SBZ, 2004.
- IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. 2012. Disponível na Internet: <http://www.sidra.ibge.gov.br>, capturado em 24/03/2014, On line.
- JUHASZ-KASZANYITZKY, E.; JANOSI, S.; SOMOGYI, P.; ÁDAM, D.; LINDA, V.D.; GRAAFVAN, B.; ENGELINE, V.D.; JAAP, A.W. (2007). MRSA Transmission between Cows and Humans. *Emerg Inf Dis*, 13:630-632.
- KLAAS, I.C.; ENEVOLDSEN, C.; VAARST, M.; HOUEH, H. (2004) Systematic clinical examinations for identification of latent udder health types in Danish dairy herds. *J Dairy Sci*, 87(5):1217-1228.
- KOOP, G.; VAN WERVEN, T.; TOFT, N.; NIELEN, M. (2011). Estimating test characteristics of somatic cell count to detect *Staphylococcus aureus*-infected dairy goats using latent class analysis. *J Dairy Sci*. 94:2902-2911.
- KOOP, G. (2012). Udder health in dairy goats. Thesis. Utrecht University, Utrecht, 193p.
- KOOP, G.; DE VliegHER, S.; DE VISSCHER, A.; SUPRÉ, K.; HAESBROUCK, F.; NIELEN, M.; VAN WERVEN, T. (2012a) Differences between coagulase-negative *Staphylococcus* species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. *J Dairy Sci*, 95:5075–5084.
- KOOP, G.; NIELEN, M.; VAN WERVEN, T. (2012b) Diagnostic tools to monitor udder health in dairy goats. *Vet Q*, 32(1):37-44.
- KOSKINEN, M.T.; HOLOPAINEN, J.; PYÄRÄLÄ, S.; BREDBACKA, P.; PITKÄLÄ, A.; BARKEMA, H.W.; BEXIGA, R.; ROBERSON, J.; SØLVERØD, L.; PICCININI, R.; KELTON, D.; LEHMUSTO, H.; NISKALA, S.; SALMIKIVI, L. (2009). Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *J Dairy Sci*. 92:952–959.
- LEE, J.H. (2003). Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol*, 69:6489-6494.
- LEITE, J.P.V. (2009). Fitoterapia – bases científicas e tecnológicas. 1.º Ed. São Paulo: Atheneu. 328p.
- LEITNER, G.; LUBANSHEVSKY, E.; TRAININ, Z. (2003). *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. Composition and evaluation of its immunogenicity in mouse model. *Vet Immunol Immunopathol*. 35: 99-106.
- LEITNER, G.; MERIN, U.; LAVI, Y.; EGBER, A.; SILANIKOVE, N. (2007) Aetiology of intramammary infection and its effect on milk composition in goat flocks. *J. Dairy Res*. 74, 186-193.
- LEITNER, G.; SILANIKOVE, N.; MERIN, U. (2008) Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Rumin Res*. 74:221-225, 2008.
- LINHARES, L.A.; XIMENES, E.C.P.A. (2010). Avaliação da atividade antimicrobiana de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne frente a *Staphylococcus aureus* multirresistente. In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UFPE, 2010, Recife. XVII Conic UFPE, 2010.

- LINHARES, L.A.; XIMENES, E.C.P.A. (2011). Efeito da concentração sub-inibitória do extrato de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne sobre os fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UFPE, 2011, Recife. XIX Conic UFPE, 2011.
- LOGUERCIO, A.P.; GROFF, A.C.M.; PEDROZZO A.F.; WITT, N.M.; SILVA, M.S.; VARGAS, A.C. (2006) Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. *Pesqui Agropecu Bras*, 41(2):347-349.
- LOLLAI, S.A.; ZICCHEDDU, M.; MAUROB, C.D.; MANUNTA, D.; NUDDAB, A.; LEORI, G. (2008). Profile and evolution of antimicrobial resistance of ovine mastitis pathogens. *Small Rum Res*. 74:249-254.
- LYON, B.R.; SKURRAY, R.A. (1987). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Ver.*, 51:88-134.
- MALACHOWA, N.; DELEO, F.R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci*. 67:3057-3071.
- MAROGNA, G; PILO, C.; VIDILI, A.; TOLA, S.; SCHIANCHI, G.; LEORI, S.G. (2012) Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis. *Small Rumin. Res*. 102:74- 83.
- MARSAIOLI, A.J. Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry*, v.14, p.1882-1883, 1975.
- MAVROGIANNI, V.S.; MENZIES, P.I.; FRAGKOU, I.A.; FTHENAKIS, G.C. (2011). Principles of Mastitis Treatment in Sheep and Goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract*. 27:115-120.
- MCDOUGALL, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; SCRUTON, D. (2001) Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Rumin Res*, 40(3):245–254.
- MCDOUGALL, S.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; MURDOUGH, P.A.; SCRUTON, D. (2002) Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in Vermont, USA. *Small Rumin Res*. 46:115-121.
- MITIDIERO, A.M.A. (2002). Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura de leite: avaliação dos aspectos sanitários e de produção. Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 119p.
- MORONI, P.; PISONI, G.; RUFFO, G.; BOETTCHER, P.J. (2005a). Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in Italian dairy goats. *Prev. Vet. Med*. 69:163-173.
- MORONI, P.; PISONI, G. RUFFO, G.; CORTINOVIS, I.; CASAZZA, G. (2005b). Study of intramammary infections in dairy goats from mountainous regions in Italy. *NZ Vet. J*. 53:375-376.
- MORONI, P.; PISONI, G.; VIMERCATI, C.; RINALDI, M.; CASTIGLIONI, B.; CREMONESI, P.; BOETTCHER, P. (2005c). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from chronically infected dairy goats. *J. Dairy Sci*. 88:3500-3509.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. (2013). Quorum sensing and phytochemicals. *Int J Mol Sci*. 14:12607-12619.
- NEALSON, K.H.; PLATT, T.; HASTINGS, J.W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol*. 104(1):313-22.
- NEVES, M.C.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; ALVES, E.C.C.; LEMOS, M.V.F. (2007). Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. *Arq. Inst. Biol.*, 74(3):207-213.
- NICKERSON SC. (1993). Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis infections. *Vet Med*. 33:368-373.
- NOGUEIRA, R.T.; SHEPHERD, G.J.; LAVERDE JR., A.; MARSAIOLI, A.J.; IAMAMURA, P.M. (2001). Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *Phytochemistry*. 58:1153-1157.
- NOVAIS, T.S.; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. (2003). Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Rev. Bras. de Farmacognosia*. 14:5-8. (supl.)
- O' GARA, J.P. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 270:79-188.

- OKORO, I.O.; OSAGIE, A.; ASIBOR E.O. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Nigeria. *Afr J Biotechnol.* 9(20):2989-2993.
- OLIVEIRA, D.F.; PEREIRA, A.C.; FIGUEIREDO, H.C.P.; CARVALHO, D.A.; SILVA, G.; NUNES, A.S.; ALVES, D.S.; CARVALHO, H.W.P. (2007). Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. *Fitoterapia.* 78:142-145.
- OTTO, M. (2008). Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322:207-228.
- OWEN, W.E.; RAY, C.H.; BODDIE, R.L.; NICKERSON, S.C. (1997). Efficacy of sequential intramammary antibiotic treatment against chronic *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *Large Anim Pract.* 18:10-14.
- PAAPE, M.J.; POUTREL, B.; CONTRERAS, A.; MARCO, J.C.; CAPUCO, A.V. (2001). Milk somatic cells and lactation in small ruminants. *J. Dairy Sci.* 84:237-244. (E. Suppl.).
- PAAPE, M.J.; WIGGANS, G.R.; BANNERMAN, D.D.; THOMAS, D.L.; SANDERS, A.H.; CONTRERAS, A.; MORONI, P.; MILLER, R.H. (2007). Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Rumin Res.* 68:114-125.
- PEIXOTO-NETO, P.A.S.; SILVA, M.V.; CAMPOS, N.V.C.; PORFÍRIO, C.Z.; CAETANO, L.C. (2002). Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. *Fitoterapia.* 73(6):529-531.
- PENGOV, A.; CERU, S. (2003) Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and ovine mammary glands. *J Dairy Sci.* 86(10):3157-3163.
- PETTIT, G.R.; MENG, Y.; STEVENSON, C.A.; DOUBEK, D.L.; KNIGHT, J.C.; CICHACZ, Z.; PETTIT, R.K.; CHAPUIS, J.C.; SCHMIDT, J.M. (2003). Isolation and structure of palstatin from the Amazon tree *Hymenaea palustris*. *J. Nat. Prod.* 66:259-262.
- PINHO, M.G. (2008). Mechanisms of β -lactam and glycopeptides resistance in *Staphylococcus aureus*. In *Staphylococcus molecular genetics*. Edited by Lindsay JA. Norfolk, UK: Caister Academic Press, Norwich:207-226.
- POLL, H.; SANTOS, C.; REETZ, E.R.. Anuário brasileiro da pecuária. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2012. 128p.
- PORTES, V.M.; WOLFF, C.; VAZ, A.K.; DICK, W. (2006). Efeito da vacinação contra a mastite estafilocócica sobre a associação de *Staphylococcus* spp. a células do leite. *Acta Sci Vet.* 34(2):137-141.
- QUADROS, D.G. (2008) Leite de cabra: produção e qualidade. Disponível em: <http://www.caprtec.com.br/pdf/LeiteCabraProducaoQualidade.pdf>. Acesso em: 24 de abril de 2014.
- RASMUSSEN, T.B.; GIVSKOV, M. (2006). Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology.* 152:895-904.
- RIBEIRO, S. D. A. Caprinocultura: criação racional de caprinos. 1ª ed. São Paulo: Nobel, 1997, 318p.
- SÁNCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, J.; LUENGO, C.; CORRALES, J.C.; FERNÁNDEZ, C. (2003) Effect of freezing goat milk samples on recovery of intramammary bacterial pathogens. *Vet Microbiol.* 94(1):71-77.
- SÁNCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; CORRALES, J.C.; MUÑOZ, P. (2004). Influence of sampling time on bacteriological diagnosis of goat intramammary infection. *Vet Microbiol.* 98:329-332.
- SANFORD, C.J.; KEEFE, G.P.; SANCHEZ, J.; DINGWELL, R.T.; BARKEMA, H.W.; LESLIE, K.E.; DOHOO, I.R. (2006). Test characteristics from latent class models of the California Mastitis Test. *Prev Vet Med.* 77:96-108.
- SCALBERT, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.* 30(12):3875-3883.
- SEARS, P.M.; GONZALEZ, R.N.; WILSON, D.J.; HAN, H.R. (1993). Procedures for mastitis diagnosis and control. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 9:445-468.
- SEARS, P.M.; MCCARTHY, K.K. (2003). Management and treatment of *Staphylococcal* mastitis. *Vet. Clin. Food Anim.* 19:171-185.
- SEGUIN, J.C.; WALKER, R.; CARON, J.P.; KLOOS, W.E.; GEORGE, C.G.; HOLLIS, R.J. (1999). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. *J Clin Microbiol.* 37:1459-63.
- SHANLEY, P.; MEDINA, G. (2005). Árvores frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Belém: CIFOR, Imazon, 300p.
- SHWIMMER, A.; KENIGSWALD, G.; VAN STRATEN, M.; LAVIC, Y.; MERIN, U.; WEISBLIT, L.; LEITNER, G. (2008). Dry-off treatment of Assaf sheep: Efficacy as a management tool for improving milk quantity and quality. *Small Rum Res.* 74:45-51.

- SILVA, J.A.; SILVA, D.B.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. (1994). Frutas nativas dos cerrados. Planaltina; EMBRAPA-CPAC 166p.
- SILVA, M.R.; SILVA, M.S.; MARTINS, K.A.; BORGES, S. (2001). Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e do jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. Cienc Tecnol Aliment. 21:176-182.
- SILVA, E.; SIQUEIRA A.P.; MARTINS J.C.D.; FERREIRA W.P.B.; SILVA N. (2004) Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. Small Rumin. Res. 55:45-49.
- SMITH MC, SHERMAN DM. (2009). Mammary gland and milk production. Goat medicine. 2nd ed. Vol. Chap. 14. Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell. p.647-689.
- SOL, J.; SAMPIMON, O.C.; HARTMAN, E.; BARKEMA, H.W. (2002). Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from subclinical mastitis samples. Vet Microbiol. 85:241-249.
- SOTO, S.M.; SMITHSON, A.; HORCAJADA, J.P.; MARTINEZ, J.A.; MENSA, J.P.; VILA, J. (2006). Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infections by uropathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Infect. 12:1021-1045.
- SOUZA, A.C.M. (2008). Potencial Antifúngico de extratos de *Hymenaea martiana*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 84p.
- SOUZA, F.N.; BLAGITZ, M.G.; PENNA, C.F.A.M.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; HEINEMAN, M.B.; CERQUEIRA, M.M.O.P. (2012) Somatic Cell count in small ruminants: Friend or foe? Small Rumin Res., 107:65-75.
- TAPONEN, S.; SIMOJOKI, H.; HAVERI, M.; LARSEN, H.D.; PYORALA, S. (2006). Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. Vet. Microbiol. 115:199-207.
- TAPONEN S.; PYÖRÄLÄ S. (2009) Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- Not so different from *Staphylococcus aureus*? Vet Microbiol, 134(1-2):29-36.
- TAPONEN, S.; SALMIKIVI, L.; SIMOJOKI, H.; KOSKINEN, M.T.; PYÖRÄLÄ, S. (2009). Real-time polymerase chain reaction- based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. J Dairy Sci. 92:2610-2617.
- TENOVER, F.C.; POPOVIC, T.; OLSVIK, O. (1995). Genetic methods for detecting antibacterial resistance genes. In: MURRAY, P.R. (Ed.). Manual of clinical microbiology. 6th.ed. Washington: American Society for Microbiology, p.1368-1378.
- THOMAZ, L.W. (2004). Efeito da utilização de medicamentos homeopáticos no tratamento da mastite subclínica em vacas leiteiras. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 66p.
- THORBERG, B.M.; KU, H.N.I.; AARESTRUP, F.M.; BRANDSTROM, B.; JONSSON, P.; DANIELSSON-THAM, M.L. (2006). Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. Vet. Microbiol. 115:163-172.
- TOLLERSRUD, T.; NORSTEBØ, P.E.; ENGVIK, J.P.; ANDERSEN, S.R.; REITAN, L.J.; LUND, A. (2002). Antibody responses in sheep vaccinated against *Staphylococcus aureus* mastitis: a comparison of two experimental vaccines containing different adjuvants. Vet. Res. Commun. 26:587-600.
- TORRES, A.H.; RAJALA-SCHULTZ, P.J.; DEGRAVES, F.J. (2009). Diagnosis of intramammary infections at dry-off based on sampling strategy, epidemiology of pathogens, and agreement beyond chance. J Vet Diag Inv. 21:427-436.
- USHIMARU, P.I.; SILVA, M.T.N.; DI STASI, L.C.; BARBOSA, L.; FERNANDES JUNIOR, A. (2007). Antibacterial activity of medicinal plant extracts. Bras. J Microbiol. 38:717-719.
- VALENTIM, A.P.T. (2006). Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne (jatobá). Dissertação (Mestrado em biotecnologia de produtos bioativos). Departamento de Antibióticos. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 100p.
- VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANA, K.S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet. Microbiol. 92:179-185.

- VAUTOR, E.; ABADIE, G.; PONT, A.; THIERY, R. (2008). Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Vet. Microbiol.*, 127:407:411.
- VOSS, A.; LOEFFEN, F.; BAKKER, J.; KLAASSEN, C.; WULF, M.(2005). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis*, 11:1965-6.
- WHITE, E.C.; HINCKLEY, L.S. (1999). Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. *Small Rumin Res.* 33:117-121.
- WILSON, D.J.; GONZAÇEZ, R.N.; CASE, K.L.; GARRISON, L.L.; GROHN, Y.T. (1999) Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *J Dairy Sci*, 82(2):1664-1670.
- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. (2001) Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil, *Quim Nova*, 24(1):147-152.

Artigo Submetido para Pesquisa Veterinária Brasileira

Caracterização molecular, produção de biofilme e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. ao extrato de *Hymenaea martiana* Hayne¹

Rodolfo M. Peixoto^{2*}, Renata de M. Peixoto³, Werônica S. Rocha³, Luciana J. S. Peixoto², Jackson R. G. S. Almeida³, Gisele V. Gouveia³, Helinando P. Oliveira³ e Mateus M. Costa³

ABSTRACT.- Peixoto R.M., Peixoto R.M., Rocha W.S., Peixoto L.J.S., Almeida J.R.G.S., Gouveia G.V., Oliveira H.P. & Costa M.M. 2013. [**Molecular characterization, production of biofilm and sensitivity profile of *Staphylococcus* spp. to extract of *Hymenaea martiana* Hayne.**] Caracterização molecular, produção de biofilme e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. ao extrato de *Hymenaea martiana* Hayne. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(00):00-00. Campus Floresta, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambuco, Rua Projetada, s/n, Caetano II, Floresta, PE 56400-000, Brazil. E-mail: rodolfo.peixoto@ifsertao-pe.edu.br

The mastitis is one of the most important diseases in dairy milk systems. Molecular studies about the main agents and tests of bacterial sensitivity to plant extracts, configure the main areas of research about this illness in actuality. This study was the aim to perform a molecular characterization of isolates from cases of subclinical mastitis and evaluate the production of biofilm in interaction with extract of *H. martiana*. Were used 33 isolates of *Staphylococcus* spp. from goats with subclinical mastitis. The antimicrobial sensitivity test was performed by modified Kirby-Bauer disk diffusion method. Crude ethanolic extract of *H. martiana*, as well the fractions obtained in ethyl acetate, chloroform and hexane were used to evaluate sensitivity of isolates, using the technique of minimal bactericidal concentration. The analysis of the genetic potential for resistance to antimicrobials was performed through the amplification of genes *mecA* and *blaZ*. The genetic potential for production of biofilm was assessed by amplification of the gene *icaD*, *icaA* and *bap*, via the polymerase chain reaction (PCR). The phenotypical characterization for biofilm formation and its interaction with extract *H. martiana*. In addition, there was the scanning electron microscopy to assess efficacy of the extract in reducing biofilm production. The antimicrobial susceptibility profile of isolates evaluated presented variation, being observed high sensitivity to gentamicin. None isolate presented *mecA* gene, however, the presence of *blaZ* gene in 33.3% was observed. Of the 33 samples evaluated nine (27.2%), three (10.0%) and four (12.9%) presented *icaD*, *icaA* and *bap* gene, respectively. In sensitivity tests "in vitro" to crude ethanolic extract of *H. martiana* (EEBHm), the median obtained for CBM was 1,563 µg/mL. It was observed that after the addition of the extract, 77.3, 81.8 and 86.3% of the isolates showed a reduction in the production of biofilm in fractions ethyl acetate, chloroform and hexane, respectively. It is clear that extensive production of biofilm in isolates, however, is relevant the result that demonstrates reduction in production of this extracellular matrix when in contact with the extract of *H. martiana*, demonstrating the potential of antimicrobials in mastitis caused by *Staphylococcus* spp.

INDEX TERMS: mastitis, pathogens, resistance genes, sensitivity tests.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Rua Projetada s/n, Caetano II, Floresta, PE 56400-000, Brasil. *Autor para correspondência: rodolfo.peixoto@ifsertao-pe.edu.br

³ Campus Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Rodov. BR 407 Km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho s/n, Petrolina, PE 56300-990, Brasil.

RESUMO.- A mastite é uma das enfermidades mais importantes em criações voltadas para produção de leite. Estudos moleculares sobre os principais agentes e testes de sensibilidade aos extratos de plantas, configuram as principais áreas de pesquisa acerca da mastite na atualidade. Neste trabalho, objetivou-se realizar a caracterização molecular de isolados oriundos de casos de mastite subclínica e avaliar a produção de biofilme em interação com extrato de *H. martiana*. Foram utilizados 33 isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de caprinos com mastite subclínica. Realizou-se teste de sensibilidade aos antimicrobianos por meio do método de difusão em disco Kirby-Bauer modificado. Utilizou-se o extrato etanólico bruto da *H. martiana*, além das frações obtidas em acetato de etila, clorofórmio e hexano para avaliar a sensibilidade dos isolados, utilizando-se a técnica da concentração bactericida mínima (CBM). A análise do potencial genético para resistência aos antimicrobianos foi realizada através da amplificação dos genes *mecA* e *blaZ*. O potencial genético para produção de biofilme foi avaliado pela amplificação do gene *icaD*, *icaA* e *bap*, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Realizou-se a caracterização fenotípica para formação de biofilme e a interação do extrato *H. martiana* com o biofilme em formação e após sua consolidação. Além disso, realizou-se a microscopia eletrônica de varredura para avaliar eficácia do extrato na redução da produção de biofilme. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados avaliados apresentou variação, sendo observada alta sensibilidade à gentamicina. Não foi observada a presença do gene *mecA*, contudo, observou-se a presença do gene *blaZ* em 33,3%. Das 33 amostras avaliadas nove (27,2%), três (10,0%) e quatro (12,9%) apresentaram o gene *icaD*, *icaA* e *bap*, respectivamente. Nos testes de sensibilidade “*in vitro*” ao extrato etanólico bruto de *H. martiana* (EEBHm), a mediana obtida para CBM foi igual a 1.563 µg/mL. Observou-se que após a adição do extrato, 77.3, 81.8 e 86.3% dos isolados apresentaram redução na produção do biofilme nas frações acetato de etila, clorofórmio e hexano, respectivamente. Percebe-se ampla produção de biofilme nos isolados, contudo, é relevante o resultado que demonstra redução na produção desta matriz extracelular quando em contato com o extrato de *H. martiana*, demonstrando o potencial antimicrobiano nas mastites causadas por *Staphylococcus* spp.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: mastite, patógenos, genes de resistência, testes de sensibilidade.

INTRODUÇÃO

A mastite caracteriza-se por um processo inflamatório da glândula mamária causada comumente por micro-organismos infecciosos. Quanto à etiologia, em cabras leiteiras, as infecções intramamárias são, em sua maioria, causadas por diversas espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) (Bergonier et al. 2003, Contreras et al. 2007). De acordo com Koop et al. (2012), poucos são os estudos acerca das diferenças relacionadas à patogenicidade entre os SCN isolados do leite de cabras. Ainda de acordo com estes autores, a patogenicidade de patógenos no úbere pode ser determinada pelo seu potencial de elevar a contagem de células somáticas (CCS), diminuir a produção de leite e causar mastite clínica.

Característica importante, que contribui para a persistência das infecções intramamárias é a produção de biofilme, uma estrutura formada pela organização das células bacterianas através de uma matriz de biopolímeros que envolve as bactérias e as unem a uma superfície. Este arranjo está relacionado à troca de material genético, patogenicidade e resistência aos antimicrobianos (Soto et al. 2006). Segundo Antunes et al. (2007), esta matriz faz com que as células bacterianas se aglomerem em multicamadas de biofilme, deixando-as menos acessíveis ao sistema de defesa do organismo e aos antimicrobianos. Esta estrutura já foi encontrada em diversos micro-organismos de interesse veterinário, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila* (Jacques et al. 2010). Em *Staphylococcus* spp. a principal molécula responsável pela adesão é o polissacarídeo intercelular adesina (PIA). Os avanços recentes na compreensão do biofilme neste gênero demonstraram que há algumas estruturas e fatores que regulam a produção do biofilme, dentre estes, pode-se citar os fatores ambientais. Apesar de nem todos os biofilmes estarem dependentes da expressão do exopolissacarídeo PIA, ele é o mais importante determinante dentro do gênero *Staphylococcus*, e possivelmente, em uma variedade de outros patógenos (Otto 2008).

Os genes *icaA* e *icaD* são considerados fundamentais para máxima expressão do *N*-acetilglicosamina transferase, conduzindo a expressão fenotípica do polissacarídeo capsular. Outro fator envolvido na produção de biofilmes é o gene *bap* e a proteína associada ao biofilme (Bap – *Biofilm*

Associated Protein) expressa por este gene, e que promove tanto a fixação primária a uma superfície quanto a adesão intercelular (Gerke et al. 1998, Otto 2008).

Com relação ao tratamento das mastites, poucas drogas são especificamente licenciadas para uso em pequenos ruminantes, particularmente em cabras. O uso de antibióticos ou outros fármacos indicados para bovinos em pequenos ruminantes, constituem um alto risco devido à segurança e eficácia destes produtos em cada espécie serem em grande parte desconhecidos (Mavrogianni et al. 2011). A utilização de medicamentos homeopáticos e fitoterápicos tem demonstrado resultados satisfatórios durante a terapia dos casos de mastite, porém os estudos são voltados em sua maioria para espécies bovina (Almeida 2004, Thomaz 2004). Novais et al. (2003), avaliaram a atividade antimicrobiana de alguns extratos de espécies vegetais nativas ou endêmicas do semi-árido brasileiro, sendo encontrada atividade em sete plantas, dentre elas, uma pertencente ao gênero *Hymenaea*, que foi ativa contra isolados de *Staphylococcus aureus*, mas não contra *E. coli*.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo realizar a caracterização molecular e susceptibilidade aos antimicrobianos convencionais e extrato natural de isolados oriundos de casos de mastite subclínica em cabras e avaliar a produção de biofilme em interação com extrato de *H. martiana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de execução. O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do Campus Ciências Agrárias, localizado na Fazenda experimental da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, situada na Rodovia BR 407, km 12 – Lote 543 – Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/nº “C1”, Petrolina-PE.

Amostras bacterianas. Foram utilizados 33 isolados da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, inicialmente identificados como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, baseando-se nas características bioquímicas (Gram, catalase, coagulase, dnase e fermentação de açúcares (Holt 1994). Estes isolados foram oriundos de caprinos com mastite subclínica provenientes do município de Valente-BA.

Todos os isolados foram testados quanto a presença dos genes *nuc* (Kateete et al. 2010) e *rdr* (Shome et al. 2012), cujas presenças classificam o micro-organismo como pertencente às espécies *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis*, respectivamente.

Para pesquisa do gene *nuc*, como template foi utilizado o DNA extraído dos isolados bacterianos, sendo que 4µl desta suspensão foram acrescidos a 11µl de mix contendo 2mM de MgCl₂, 0,4pmol dos primers, 0,4mM dos desoxirribonucleotídeos, tampão de enzima 1X e 1.5U de Taq DNA polimerase. Os ciclos de amplificação do gene *nuc* foram realizados de acordo com Kateete et al. (2010) com modificações, constando de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 37 ciclos, consistindo, cada um de 94°C por 1 minuto, hibridação do iniciador a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para pesquisa do gene *rdr*, a reação de PCR foi baseada no trabalho de Shome et al. 2012, porém com algumas modificações. Para os 5µl da suspensão de DNA foram acrescidos a 20µl de mix contendo 1,5 mM de MgCl₂, 0,5pmol dos primers, 0,4mM dos desoxirribonucleotídeos, tampão de enzima 1X e 1.5U de Taq DNA polimerase. Os ciclos de amplificação do gene *rdr* constaram de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos, consistindo, cada um de 94°C por 30 s, hibridação do iniciador a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 s, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os resultados da PCR foram verificados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (1,0 mg mL⁻¹) e documentado através de fotodocumentador. Os primers estão descritos no Quadro 1.

Teste fenotípico de sensibilidade aos antimicrobianos. O perfil de sensibilidade dos micro-organismos foi determinado através do método de difusão em disco Kirby-Bauer modificado. Os isolados foram semeados em caldo Muller Hinton e incubados a 37°C até obtenção de turvação conforme a escala 0,5 de Mac Farland. Com auxílio de um swab, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Muller Hinton. Logo após, foram aplicados os discos impregnados com os fármacos: ampicilina (10µg), doxicilina (30µg), lincomicina (2µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), rifampicina (30µg), cefalotina (30µg), amoxicilina (10µg), ácido nalidíxico (30µg) e oxacilina (1µg). As placas foram incubadas em estufa durante 24h a 37°C. Em seguida, foi realizada a leitura dos halos para determinação do perfil de sensibilidade dos isolados (CLSI 2008). O índice de resistência múltipla (IRMA) foi calculado seguindo a metodologia descrita por Kruperman (1983), o qual é determinado pela relação entre o número de antimicrobianos que a amostra é resistente e o número total de antimicrobianos testados.

Análise molecular do potencial genético para resistência aos antimicrobianos. Para realização da técnica de PCR com objetivo de avaliar a presença de genes de resistência, foi necessário

primeiramente realizar a extração do DNA dos isolados. O DNA foi extraído e purificado seguindo adaptações dos protocolos descritos por Aldous et al. (2005) e Ausubel et al. (1989). Uma alçada de cultivo foi colocada em 300µl de TE (Tris-EDTA) e as amostras foram levadas ao vórtex brevemente para homogeneizar. Acrescentou-se 70µl de SDS 10%, e novamente foram homogeneizadas. Em seguida foi acrescentado 100µl de NaCl₂ 5M e 80µl CTAB/NaCl. Foram incubadas a 65°C por 10 min. Logo após, foram adicionados 700µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e foram homogeneizadas por inversão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 11.750 g por 5 min. Foi transferida a 1ª fase para outro tubo e acrescentados 450µl de isopropanol. Os tubos foram invertidos e deixados em gelo por 20 minutos. Passado esse período as amostras foram centrifugadas a 11.750 g por 15 min, desprezado o sobrenadante, e acrescentados 500µl de etanol 70%. Em seguida, foram centrifugadas a 11.750 g por 10 min, desprezado o sobrenadante, e os microtubos foram invertidos para facilitar na secagem. As amostras foram suspensas em 50µl de TE (pH 8,0) e deixadas à 65°C por 10 minutos. Ao término foram armazenadas à -20°C.

A análise do potencial genético para resistência aos antimicrobianos foi realizada através da amplificação dos genes *mecA* e *blaZ*, relacionados a resistência a meticilina (oxacilina) e aos beta-lactâmicos, respectivamente. Para amplificação de um fragmento de 214pb, que corresponde ao gene *mecA*, e para a amplificação do gene *blaZ* (fragmento de 517pb), foi utilizado como template o DNA extraído dos isolados bacterianos, sendo que 4µl desta suspensão foram acrescidos a 11µl de um mix contendo 2mM de MgCl₂, 0,4mM dos primers, 0,4mM dos desoxirribonucleotídeos, tampão de enzima 1X e 1,5U de *Taq* DNA polimerase. A reação de amplificação do gene *mecA* constou de uma desnaturação inicial a 94°C por 1 min, seguida por 15 ciclos, que consistiam de uma desnaturação à 94°C por 30 segundos, 68°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguidos por mais 20 ciclos constituídos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos à 60°C, 30 segundos à 72°C e uma extensão final a 72°C por 2 minutos (adaptado de Murakami et al. 1991). A reação de amplificação do gene *blaZ* constou de uma desnaturação inicial à 94°C por 4 min, seguida por 30 ciclos, que consistiram em 94°C por 1 minuto, 50,5°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e, uma extensão final a 72°C por 5 minutos (Sawant et al. 2009). Os primers utilizados estão descritos no Quadro 1.

Análise molecular do potencial genético para formação de biofilme (*icaD* *icaA* e *bap*). Como *template* foi utilizado o DNA extraído dos isolados bacterianos. Para pesquisa do gene *icaD*, 2µl desta suspensão foram acrescidos 13µl de mix contendo 1,33mM de MgCl₂, 1mM dos primers, 0,2mM dos desoxirribonucleotídeos, tampão de enzima 1x e 1,5U de *Taq* DNA polimerase. A reação foi conduzida ao termociclador e submetida à desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida por 30 ciclos constituídos por 45 segundos a 92 °C; 49,8 °C por 45 segundos e 1 min a 72 °C e uma extensão final a 72 °C por 7 min.

Para pesquisa do gene *icaA*, utilizou-se 5µL da suspensão (*template*) foram acrescidos a 20 µL de mix contendo 2,5mM de MgCl₂, 1pmol dos primers, 0,28mM dos desoxirribonucleotídeos, tampão de enzima 1 x e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase. A reação de amplificação do gene *icaA* foi realizada de acordo com Vasudevan et al. (2003) com modificações, constando de desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos constituídos por 45 segundos a 92°C; 58,6°C por 45 segundos; e 1 minuto a 72°C e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para a pesquisa do gene *bap*, utilizou-se 5 µL da suspensão (*template*) foram acrescidos a 20 µL de mix contendo 2,0mM de MgCl₂, 0,4pmol dos primers, 0,4mM dos desoxirribonucleotídeos, tampão de enzima 1 x e 2,5U de *Taq* DNA polimerase. A reação de amplificação do gene *bap* foi realizada de acordo com Cucarella et al. (2001) com modificações, constando de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos constituídos por 45 segundos a 9°C; 56,5°C por 45 segundos; e 50 segundos a 72°C e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os primers utilizados estão descritos no Quadro 1.

Teste fenotípico para detecção da presença de biofilme. A caracterização fenotípica para formação de biofilme dos isolados foi realizada por meio do teste de aderência em placa. As colônias isoladas foram inoculadas em 3 mL de *Tryptone Soya Broth* (TSB) com glicose (0,25%) e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, 200 µl foram inoculados em placas de microdiluição e novamente incubados a 37°C por 24 horas. Após as 24 horas, foi realizada três lavagens com 200 µl de água destilada e aguardou-se secar em temperatura ambiente. As placas foram coradas com 100 µl de cristal violeta 0,25% por 2 a 3 min em temperatura ambiente. Foi repetida a lavagem, mais três vezes com água destilada. Para dissolver o corante, utilizou-se 200 µl de álcool-acetona (80:20). A absorbância foi medida em leitor de microplacas de Elisa Easys® e mensurada em filtro de 620 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicata, bem como os controles positivo e negativo. Como controle positivo foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, caracterizada genotipicamente para produção de biofilme, e como controle negativo, uma cepa de *S. epidermidis*. Foi possível determinar a produção de biofilme através da seguinte classificação: sem produção de biofilme (DO amostra ≤ DO controle negativo), fraca produção de biofilme (DO controle negativo < DO amostra ≤ 2.DO controle negativo), moderada produção de

biofilme ($DO_{\text{controle negativo}} < DO_{\text{amostra}} \leq 4 \cdot DO_{\text{controle negativo}}$) e forte produção de biofilme ($DO_{\text{amostra}} < 4 \cdot DO_{\text{controle negativo}}$) (Adaptado de Merino et al., 2009).

Teste de sensibilidade ao extrato. Utilizou-se o extrato etanólico bruto da *H. martiana*, além das frações obtidas em acetato de etila, clorofórmio e hexano. Foi realizada pesagem de 0,25 g de cada extrato, sendo diluído em 10 mL de DMSO 1%, obtendo-se uma solução estoque na concentração de 25 mg.mL⁻¹. A determinação da concentração inibitória mínima baseou-se no documento M7-A7 (CLSI, 2008), sendo obtidas as seguintes concentrações finais: 12.500; 6.250; 3.125; 1.562,5; 781,2; 390,6; 195,3 e 97,6 µg/mL.

Na preparação do inóculo, colônias obtidas em Ágar Muller-Hinton, foram utilizadas na obtenção de uma suspensão bacteriana com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland. Desta suspensão foi inoculado 10 µL nos poços de microplacas contendo a diluição do extrato etanólico. O material foi incubado a 37°C por 24h, em condições de aerobiose. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) ao verificar a menor concentração do extrato capaz de causar inibição do crescimento bacteriano. Quando não foi observado crescimento bacteriano visível, retirou-se uma alíquota de 10 µL, semeando-se na superfície de ágar MH e incubando por 48 h a 37 °C. Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), a partir dos poços sem o desenvolvimento de crescimento bacteriano visível, retirou-se uma alíquota de 10 µL, semeando-a na superfície do ágar Muller-Hinton. Após 48h de incubação a 35 °C foi definida a concentração bactericida mínima como a menor concentração do extrato etanólico em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Interação do extrato com o biofilme em formação e consolidado. Onze (n=11) isolados identificados como *Staphylococcus aureus* foram utilizados para a realização destes testes. A formação de biofilme em microplacas foi obtida a partir da incubação de 100 µl da suspensão bacteriana por 24 h a 37 °C. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com água destilada e, então, acrescidos de 100 µl do extrato (0,5; 0,25 e 0,125 CBM). A densidade ótica (DO) foi determinada imediatamente após a adição do extrato (0 h) e 24 h depois. A interferência do extrato no biofilme consolidado foi definida pela equação: $DO_{0h} \text{ média} / DO_{24h} \text{ média} \times 100$. Adaptado de Nostro et al. (2007).

De acordo com os resultados obtidos da CBM três diferentes concentrações (0,5; 0,25 e 0,125 CBM) foram utilizadas sobre o biofilme em formação. Este ensaio foi realizado em microplacas. Os inóculos bacterianos foram cultivados em 10 ml de TSB com 1% de glicose a 1%, por 24 h a 37 °C, sendo 100 µl acrescidos nos poços da placa, previamente adicionados de 100 µl do extrato vegetal e 100 µl de meio de cultura nos controles. Após 24 h de incubação a 37 °C, as placas foram submetidas à coloração por Violeta de Genciana, acima descrita. A eficácia do extrato em interferir com a formação do biofilme foi definida pela equação: $DO \text{ média dos poços tratados} / DO \text{ média dos poços controle} \times 100$. Adaptado de Nostro et al. (2007).

Microscopia eletrônica de varredura. Com objetivo de avaliar a interferência do extrato da *H. martiana* na formação do biofilme, utilizou-se um isolado de *Staphylococcus aureus* classificado como forte produtor de biofilme pelo teste de aderência em placa. A amostra controle foi inoculada em caldo TSB. O mesmo isolado também foi inoculado em caldo TSB contendo o extrato da planta. Ambas foram incubadas a 37°C por 24 h (adaptado de Freitas, Sand & Simonetti 2010). O inóculo, após ser retirado da suspensão foi inoculado em lamínulas e em seguida foram lavados em solução salina esterilizada por um minuto. Posteriormente, foram fixados em glutaraldeído 1% por um período de 12 horas. Após a fixação, as lâminas foram imersas em concentrações crescentes de etanol 50,70, 80, 95 e 100%, intercalando-se 20 minutos em cada troca. Ao final da desidratação, as amostras foram imersas em acetona 100%. Os fragmentos foram observados em microscópio eletrônico de varredura, modelo TM-1000 Hitachi.

Análise Estatística. Empregou-se a técnica de estatística descritiva por meio da distribuição das frequências relativa e absoluta para os achados microbiológicos e moleculares. Utilizou-se a análise de variância de Friedman para comparação dos valores da CBM nas três frações do extrato. O teste de Mann-Whitney com o objetivo de avaliar as diferenças entre as CBM obtidas de isolados moderados ou fortes produtores de biofilme e os isolados negativos ou fracos produtores. O mesmo teste foi utilizado para a comparação dos resultados da CBM entre os isolados positivos e negativos para o gene *blaZ* (Thrusfield 2004).

RESULTADOS

Amostras bacterianas. Os testes moleculares realizados para pesquisa dos genes *nuc* e *rdr* demonstraram que 97% (32/33) foram positivos para o gene *nuc*, sendo identificados como *S. aureus*. Apenas um isolado foi positivo na pesquisa do gene *rdr*, indicando *S. epidermidis*.

Teste fenotípico de sensibilidade aos antimicrobianos. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados avaliados apresentou variação, o que pode ser visualizado na Figura 1. No teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, os que apresentaram maior percentual de sensibilidade *in vitro* foram a gentamicina (97%) e a doxiciclina (97%), seguida da eritromicina com 76%, rifampicina, lincomicina e cefalotina com 70%, não ocorrendo grande variação entre a oxacilina, ampicilina e amoxicilina com 45%, 52% e 48%, respectivamente. O fármaco com menor percentual de sensibilidade foi o ácido nalidíxico com 30%. Das amostras avaliadas, o IRMA variou de 0 a 0,8, sendo que 51,5% (17 isolados) tiveram este índice acima de 0,2; isto é, foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos.

Análise molecular do potencial genético para resistência aos antimicrobianos. Foi observada a resistência à oxacilina em 18 (54,5%) isolados, porém, nenhuma amplificação por PCR do gene *mecA* foi observada. Dentre os 33 isolados avaliados, 11 (33,3%) foram positivos para o gene *bla_Z*.

Análise molecular do potencial genético para formação de biofilme. Das 33 amostras avaliadas nove (27,2%), três (10,0%) e quatro (12,9%) apresentaram o gene *icaD*, *icaA* e *bap*, respectivamente. Apenas duas amostras foram positivas ao mesmo tempo para os genes *icaD* e *icaA*.

Teste fenotípico para detecção da presença de biofilme. Dentre as 33 amostras testadas, uma (3%) apresentou forte produção de biofilme, nove (27,2%) apresentaram produção moderada de biofilme, 15 (45,4%) produção fraca e oito (24,2%) foram classificadas como não produtora de biofilme.

Teste de sensibilidade ao extrato. Nos testes de sensibilidade "*in vitro*" ao extrato etanólico bruto de *H. martiana* (EEBHm), a mediana obtida para CBM foi de 1563 µg/mL. Para as frações acetato de etila, hexano e clorofórmio, as medianas da CBM foram, respectivamente, 1042, 390 e 716 µg/mL, porém sem diferença estatística ($p > 0,05$). Para o extrato bruto, observou-se uma mediana de 2864 µg/mL entre os isolados classificados como moderados ou fortes produtores de biofilme. Por outro lado, entre os isolados classificados como negativos ou fracos produtores de biofilme, a CBM média obtida para o extrato bruto de *H. martiana* foi igual 1563 µg/mL ($p=0,07$). Dentre os 11 isolados positivos para o gene *bla_Z*, observou-se que a mediana foi igual a 781 µg/mL. Por outro lado, os isolados negativos para presença deste gene, a mediana foi igual 2604 µg/mL, porém sem diferença estatística significativa ($p=0,14$).

Interação do extrato com o biofilme em formação e consolidado. Observou-se que após a adição do extrato, 81,8, 90,0 e 81,83% dos isolados apresentaram redução na produção do biofilme nas frações acetato de etila, hexânica e clorofórmica, respectivamente. Quanto à observação do biofilme após sua consolidação, não foi observada a redução da produção em nenhum isolado (Quadro 2).

Microscopia de varredura. Na amostra controle, a qual não teve contato com o extrato da planta, observou-se ampla produção de uma matriz extracelular. Por outro lado, a amostra que permaneceu em contato com o extrato por 24 horas, visivelmente não foi observada a produção de biofilme (Figura 2).

DISCUSSÃO

No teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, pode-se observar que não houve ampla variação entre os beta-lactâmicos, sendo observado um perfil similar de resistência aos fármacos deste grupo. Em condições experimentais semelhantes, França et al. (2012) observaram ampla resistência de isolados oriundos de casos de mastite subclínica em pequenos ruminantes. Fagundes & Oliveira (2004) afirmam que a resistência dos *Staphylococcus* spp. à penicilina é um achado comum, devido ao seu uso frequente e inadequado, ao longo dos anos, o que favorece os mecanismos de transferência de resistência entre os micro-organismos. Neste sentido, Silva et al., (2004), expressam a preocupação quanto à crescente ocorrência de multirresistência em micro-organismos isolados de pequenos ruminantes com mastite. Pode-se notar que alguns isolados apresentaram resistência à oxacilina. De Giusti et al. (1999), denota que a resistência à oxacilina indica resistência cruzada com os demais beta-lactâmicos.

Em relação aos fármacos pertencentes ao grupo dos aminoglicosídeos, observou-se elevado número de isolados sensíveis, corroborando com outros trabalhos (Kumar et al. 2009, França et al. 2012). Com relação ao grupo das tetraciclinas, observou-se alta sensibilidade à doxiciclina. Em um estudo desenvolvido por Guimarães et al. (2012), a tetraciclina apresentou uma eficiência igual a 86,7% sobre as amostras oriundas de fêmeas bubalinas e de 66,7% para amostras provenientes de isolados bovinos.

O gene *mecA* não foi detectado nas amostras testadas neste estudo. Soares et al. (2008) relatam que isolados resistentes à oxacilina em vários testes fenotípicos podem não apresentar o gene *mecA*, sendo

este fato explicado pelo fenótipo de produzir as beta-lactamases, dentre essas as oxacilinas pertencentes a classe D, que são resistentes as penicilinas. Entretanto a pesquisa do gene *blaZ*, revelou uma positividade de 33,3%(n=11). Deste total, quatro foram resistentes aos beta-lactâmicos testados. Os resultados indicam a produção de beta-lactamase codificada pelo gene *blaZ*, sendo este mecanismo relatado em outros países em gado leiteiro (Olsen et al. 2006, Taponen & Pyörälä (2009)). Embora a terapia antimicrobiana voltada para mastite nos rebanhos amostrados não seja tão comum, sabe-se da utilização de diversas drogas para outras infecções nestes pequenos ruminantes. A utilização generalizada de alguns antimicrobianos para tratamento clínico pode estar associado com as altas taxas de resistência (Ribeiro et al. 2009, Schmidt et al. 2009).

A análise do IRMA indicou que mais da metade dos isolados apresentaram índices superiores a 0,2. Este padrão de multirresistência aos antimicrobianos tem aumentado, devido ao uso demorado desses fármacos (Ferreira et al. 2006). Em Guimarães et al. (2012), o IRMA de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos, apresentou variação de 0 a 0,5. Os índices de resistência observados neste trabalho podem ser decorrentes do manejo incorreto adotado pelas propriedades. A consequência é o menor número de fármacos disponíveis para uso na terapia mastite.

Dentre os isolados positivos para o gene *blaZ* (n=11), nove apresentaram médias para CBM inferiores à 2.604 µg/mL, o que sugere a presença de atividade antimicrobiana no extrato estudado frente aos isolados portadores de genes de resistência. No entanto, é fundamental a realização de pesquisas com o objetivo de elucidar os mecanismos da ação antibacteriana do extrato. Estudos fitoquímicos realizados com plantas do mesmo gênero detectaram a presença de diterpenos na resina exsudada pelo tronco e em extratos da casca (Nogueira et al. 2001). Os terpenos apresentam várias atividades biológicas, como proteção contra infecções e ataques de insetos (Robbers et al. 1997). Várias pesquisas têm demonstrado a presença de atividade antibacteriana *in vitro* para preparações obtidas de plantas do gênero *Hymenaea* (Novais et al. 2003; Fernandes et al. 2005; Gonçalves et al. 2005; Granato et al. 2005; Valentim 2006). Em estudos com outra planta do mesmo gênero, Valentim et al. (2006) relataram a presença e ação de oligossacarídeos e polissacarídeos. Estes mesmos autores observaram a atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus*, porém em concentrações mais elevadas do que aquelas observadas neste estudo.

Para produção de biofilme, a análise pela técnica molecular, revelou a presença dos genes *icaD*, *icaA* e *bap*, contudo em baixa frequência, sendo que em apenas dois isolados foi verificada a presença, ao mesmo tempo, dos genes *icaD* e *icaA*, responsáveis pela síntese do biofilme. Os mecanismos genéticos que determinam a produção de biofilme são complexos e envolvem outros genes que não foram pesquisados neste estudo, tais como o gene *IS257* (Tormo et al., 2005). Arciola et al. (2002) mostraram que técnicas moleculares para identificação dos genes *ica* que codificam a síntese do biofilme são ferramentas importantes para identificação de cepas virulentas. A implicação do biofilme na infecção bacteriana crônica em muitas espécies desencadeou um crescente interesse na caracterização de genes envolvidos na formação de biofilme (Vautor et al., 2008). O gene *bap* foi recentemente identificado como responsável pela codificação de uma proteína associada ao biofilme. Contudo, até agora este gene foi encontrado em uma pequena proporção de cepas de *S. aureus* de mastite bovina na Espanha (Cucarella et al. 2001). Vautor et al. (2008), avaliaram a presença do gene *bap* em isolados de *S. aureus* isolados de diversas espécies e regiões por meio da PCR, não sendo observada a presença do mesmo em nenhum dos isolados, sugerindo que a prevalência deste gene entre os isolados de *S. aureus* deve ser muito baixa.

Neste trabalho, observou-se melhor atividade antimicrobiana para o extrato etanólico bruto da *H. martiana* entre as cepas classificadas como negativas ou fracas produtoras de biofilme. Além disso, pode-se comprovar que a produção de biofilme foi reduzida após adição do extrato da planta, demonstrando seu potencial em interferir na produção desta matriz extracelular. Contudo, não foi observada redução quando o extrato foi adicionado após a consolidação do biofilme. A redução da produção de biofilme também foi comprovada por meio da microscopia eletrônica de varredura. É sabido que o biofilme interfere no modo de ação dos antimicrobianos, devido à baixa penetração, bem como ao estado fenotipicamente protegido nas bactérias que compõe esta estrutura (Jacques et al. 2010, Altieri et al. 2013). Estes autores citam que as estratégias para redução do biofilme incluem a prevenção de fixação microbiana, a prevenção do crescimento microbiano, interrupção da comunicação de célula-célula, inibição da síntese da matriz e a desintegração da matriz do biofilme. A inibição do biofilme em formação é dependente de fatores relacionados a inibição enzimática de proteases e mecanismos de *quorum sensing* (González-Ortiz et al. 2014). Por se tratar de um antimicrobiano natural, a redução da produção do biofilme após interação do isolado com o extrato de *H. martiana* suscita a necessidade de novas pesquisas, permitindo conhecer o modo de ação deste extrato. Para Cegelski et al. (2008), a utilização de inibidores pode mudar drasticamente o tratamento de muitas doenças infecciosas. De acordo com Landini et al. (2010) a estratégia básica para a descoberta de inibidores de biofilme consiste na triagem dos compostos químicos durante os ensaios que avaliam a interferência de drogas ou extratos na formação do biofilme.

Estes autores afirmam que, atualmente, as pesquisas têm sido voltadas para inibidores do “quorum sensing”, em compostos que interferem com o metabolismo da molécula c-di-GMP ou inibidores da biossíntese de DNA e nucleotídeos.

Os estudos voltados para terapia alternativa de enfermidades na Medicina Veterinária, apesar de comuns, caracterizam-se pela descontinuidade, com trabalhos esparsos sobre uma mesma planta. Assim, as informações mínimas necessárias para uso de plantas na Medicina Veterinária nem sempre são obtidas, uma vez que os ensaios pré-clínicos e clínicos não são realizados.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram a possibilidade de tratamento de infecções por *Staphylococcus* spp. em cabras utilizando a gentamicina. A baixa frequência dos genes envolvidos na produção de biofilme sugere heterogeneidade nas origens genéticas dos isolados e a variação entre os resultados fenotípicos e genotípicos demonstra que os mecanismos para produção desta matriz são bastante complexos, sendo fundamental a continuidade dos estudos na referida área molecular, como a pesquisa de outros genes relacionados na literatura. Houve redução na produção desta matriz extracelular quando em contato com o extrato etanólico de *H. martiana*, demonstrando o potencial antimicrobiano nas mastites causadas por *Staphylococcus* spp. Existe a necessidade da realização de novos estudos com o objetivo de elucidar os mecanismos que resultam na baixa produção de biofilme quando os isolados estão em contato com o extrato desta planta, dessa forma, garantindo a continuidade da pesquisa na área de fitoterapia, mais especificamente com a planta *H. martiana*.

Agradecimentos.- à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.

REFERÊNCIAS

- Aldous W.K., Pounder J.I., Cloud J.L. & Woods G.L. 2005. Comparison of Six Methods of Extracting Mycobacterium tuberculosis DNA from Processed Sputum for Testing by Quantitative Real-Time PCR. J. Clin. Microbiol. 43:2471-2473.
- Almeida L.A.B. 2004. Avaliação do tratamento alopático e homeopático de mastite bovina em animais inoculados com *Staphylococcus aureus*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 104p.
- Altieri K.T., Sanitá P.V., Machado A.L., Giampaolo E.T., Pavarina A.C., Jorge J.H., Vergani C.E. 2013. Eradication of a Mature Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilm From Acrylic Surfaces. Braz. Dent. J. 24(5):487-491.
- Antunes A.L.S, Perez L.R.R., Reiter K.C., Secchi C., Freitas A.L.P. 2007. Detecção da produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. por agar congo red. Rev. de Saúde da UCPEL. 1(1):27-31.
- Arciola C.R., Campoccia D., Gamberini S., Cervellati M., Donati E. & Montanaro L. 2002. Detection of slime production by means of an optimized Congored agar plate based on a colorimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. Biomaterials. 23:4233-4239.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. & Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York, N.Y., USA, 1989.
- Bergonier D., Cremoux R., Rupp R., Lagriffoul G. & Berthelot. X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. Vet. Res. 34:689-716.
- Cegelski L., Marshall G.R., Eldridge G.R. & Hultgren S.J. 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. Nat. Rev. Microbiol. 6:17-27.
- CLSI 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Clinical and Laboratory Standards Institute. Approved Standard, 3rd ed. CLSI/NCCLS document M31 - A3. Wayne.
- Contreras A., Sierra D., Sanchez A., Corrales J.C., Marco J.C., Paape M.J. & Gonzalo C. 2007. Mastitis in small ruminants. Small Rumin. Res. 68:145-153.
- Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I. & Penade J.R., 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J. Bacteriol. 183: 2888-2896.
- De Giustia M., Pacifico L., Tufia D., Panerob A., Boccia A. & Chiesa C. 1999. Phenotypic detection of nosocomial mecA-positive coagulase- negative staphylococci from neonates. J. Antimicrob. Chemother. 44:351-358.
- Fagundes H. & Oliveira C.A.F. 2004. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. Ciênc. Rural. 34(4):1315-1320.

- Fernandes T.T., Santos A.T.F. & Pimenta F.C., 2005. Atividade antimicrobiana das plantas – *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. Rev. de Pat. Trop. 34(2):113-122.
- Ferreira L.M., Nader Filho A., Oliveira E., Zafalon L.F. & Souza V. 2006. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas. Ciênc. Rural. 36(4):1228-1234.
- França C.A., Peixoto R.M., Cavalcante M. B., Melo M.F., Oliveira C.J.B., Veschi J. A., Mota R.A. & Costa M.M. 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. Pesq. Vet. Bras. 32(8):747-753.
- Freitas V.R., Sand S.T.V. & Simonetti A.B. 2010. Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. Rev. Odontol UNESP. 39:193-200.
- Gerke C., Kraft A., Süßmuth R., Schweitzer O. & Götz F. 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyl-transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* – polysaccharide intercellular adhesin. J. Biol. Chem. 273(29):18586-18593.
- Gonçalves A.L., Alves Filho A. & Menezes H., 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arq. Inst. Biol. 72(3):353-358.
- González-Ortiz G., Van Ufford H.C.Q., Halkes S.B., Cerdà-Cuéllar M., Beukelman C.J., Pieters R.J., Liskamp R.M., Pérez J.F., Martín-Orue S.M. 2014. New properties of wheat bran: anti-biofilm activity and interference with bacteria quorum-sensing systems. Environ Microbiol. 16(5):1346-1353.
- Granato D., Nunes D.S., Mattos P.P. Rios E.M., Gliniski A., Rodrigues L.C. & Zanusso Júnior G. 2005. Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. Braz. Arch. Biol. Technol. 48:237-241.
- Guimarães G., França C.A., Krug F.S., Peixoto R.M., Krewer C.C., Lazzari A.M. & Costa M.M. 2012. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. Pesq. Vet. Bras. 32(12): 1219-1224.
- Holt J.G. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore. 787p.
- Jacques M., Aragon V. & Tremblay Y.D.N. 2010. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. Anim. Health Res. Rev. 11(2):97-121.
- Kateete D.P., Kimani C.N., Katabazi F.A., Okeng A., Okee M.S., Nanteza A., Joloba M.L. & Najjuka F.C. 2010. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 9(23): 1-7.
- Koop G., De Vliegheer S., De Visscher A., Supré K., Haesebrouck F., Nielen M. & Van Werven T. 2012. Differences between coagulase-negative *Staphylococcus* species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. J. Dairy Sci. 95:5075-5084.
- Krumperman P.H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Appl. Environ. Microbiol. 46(1):165-170.
- Kumar R., Yadav B.R. & Singh R.S. 2009. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. Curr. Microbiol. 60:379-386.
- Landini P., Antoniani D., Burgess J.G. & Nijland R. 2010. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86:813-823.
- Mavrogianni V.S., Menzies P.I., Fragkou I.A. & Fthenakis G.C. 2011. Principles of Mastitis Treatment in Sheep and Goats. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract 27:115-120.
- Merino N., Toledo-Arana A., Vergara-Irigaray M., Valle J., Solano C., Calvo E., Lopez J.A., Foster T.J., Penadés J.R. & Lasa I. 2009. Proteína A- Mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 191(3):832-843.
- Murakami K.W., Minamide W., Wada K., Nakamura E., Teraoka H. & Watanabe S. 1991. Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29:2240-2244.
- Nogueira R.T., Shepherd G.J., Laverde Júnior A., Marsaioli A.J. & Yamamura P.M. 2001. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. stilbocarpa. Phytochemistry. 58:1153-1157.
- Nostro A., Roccaro A.S., Bisignano G., Marino A., Cannatelli M.A., Pizzimenti F.C., Cioni P.L., Procopio F. & Blanco A.R. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J. Med. Microbiol. 56:519-523.
- Novais T.S., Costa J.F.O., David J.P.L., David J.M., Queiroz L.P., França F., Giuletta A.M., Soares M.B.P. & Santos R.R. 2003. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. Rev. Bras. Farmacogn. 14:5-8.
- Olsen J.E., Christensen H. & Aarestrup F.M. 2006. Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J. Antimicro. Chemother. 57:450-460.
- Otto M. 2008. Staphylococcal Biofilms. Curr Top Microbiol Immunol. 322:207-228.

- Ribeiro M.G., Geraldo J.S., Langoni H., Lara G.H.B., Siqueira A.K., Salerno T. & Fernandes M.C. 2009. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite produzido no sistema orgânico. *Pesq. Vet. Bras.* 29:52-58.
- Robbers J.E., Speedie, M.K., Tyler, V.E., 1997. *Farmacognosia e Farmacobiocologia*. Premier, São Paulo, 372p.
- Sawant A.A., Gillespie B.E. & Oliver S.P. 2009. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Vet. Microbiol.* 134:73-81.
- Schmidt V., Pinto A.T., Schneider R.N., Silva F.F.P. & Mello F.A. 2009. Caracterização da mastite subclínica em caprinos produzidos em sistema orgânico no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 29:774-778.
- Shome B.R., Mitra S., Bhuvana B., Krithiga N., Shome R., Velu D., Prabhuda K. 2012. Multiplex PCR for the detection of five important *Staphylococcus* sp. in bovine subclinical mastitis milk. *Indian J. Anim. Sci.* 82(1):9-14.
- Silva E.R., Siqueira A.P., Martins J.C.D., Ferreira W.P.B. & Silva N. 2004. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. *Small Rumin. Res.* 55:45-49.
- Soares L.C., Pereira I.A., Coelho S.M.O., Cunha C.M.M., Oliveira D.F.B., Miranda A.N. & Souza M.M.S. 2008. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. *Ciênc. Rural.* 38(5):1346-1350.
- Soto S.M., Smithson A., Horcajada J.P., Martinez J.A., Mensa J.P. & Vila J. 2006. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infections by uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:1021-1045.
- Taponen S. & Pyörälä S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet. Microbiol.* 134:29-36.
- Thomaz L.W. 2004. Efeito da utilização de medicamentos no tratamento da mastite subclínica em vacas leiteiras. Dissertação de Mestrado, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 66p.
- Thrusfield M. V. 2004. *Epidemiologia Veterinária*. 2ª ed. São Paulo: Roca. 556p.
- Tormo M.A., Knecht E., Götz F., Lasa I. & Penadés J.R. 2005. Bap- dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiol.* 151: 2465-2475.
- Valentim A.P.T., 2006. Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne (jatobá). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 100p.
- Vasudevam P., Nair M.K.M., Annamalai T. & Venkitanarayanan K.S. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.* 92:179-185.
- Vautor E., Abadie G., Pont A. & Thiery R. 2008. Evaluation of the presence of the bap gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Vet. Microbiol.* 127:407:411.

Legenda de Figuras

Fig. 1. Perfil de sensibilidade de isolados de *Staphylococcus* aos antimicrobianos: oxacilina (OXA), ampicilina (AMP), amoxicilina (AMO), doxiciclina (DOX), gentamicina (GEN), rifampicina (RIF), ácido nalidíxico (NAL), lincomicina (LIN), cefalotina (CFL) e eritromicina (ERI).

Fig. 2. Microscopia eletrônica de varredura de isolamento de *S. aureus* obtido de caso de mastite caprina, indicando A: Presença de biofilme no isolado cultivado sem contato com o extrato etanólico de *H. martiana* e B: Ausência de biofilme no isolado após cultivo de 24hs em contato com o extrato etanólico de *H. martiana*.

Quadros

Quadro 1. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes *nuc*, *rdr*, *mecA*, *blaZ*, *icaD*, *icaA* e *bap*

Gene	Primer	Sequência (5´-3´)	Fragmento amplificado	Referência
<i>nuc</i>	<i>nucF</i>	GCGATTGATGGTGATACGGTT	279 pb	Kateete et al. (2010)
	<i>nucR</i>	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC		
<i>rdr</i>	<i>serF</i>	AAGAGCGTGGAGAAAAGTATCAAG	130 pb	Shome et al. (2012)
	<i>serR</i>	TCGATACCATCAAAAAGTTGG		
<i>mecA</i>	SA - 1	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	214 pb	Murakami et al. (1991)
	SA - 2	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		
<i>blaZ</i>	<i>blaZ F</i>	AAGAGATTTGCCTATGCTTC	517 pb	Sawant et al. (2009)
	<i>blaZ R</i>	GCTTGACCACTTTTATCAGC		
<i>icaD</i>	<i>seicaDF</i>	AAGCCCAGACAGAGGCAATATCCA	381 pb	Vasudevan et al. 2003
	<i>seicaDR</i>	AGTACAAACAAACTCATCCATCCGA		
<i>icaA</i>	<i>icaAF</i>	CCTAACTAACGAAAGGTAG	1315 pb	Vasudevan et al. 2003
	<i>icaAR</i>	AAGATATAGCGATAAGTGC		
<i>bap</i>	<i>bap F</i>	AAGCCCAGACAGAGGCAATATCCA	971 pb	Cucarella et al., (2001)
	<i>bap R</i>	AGTACAAACAAACTCATCCATCCGA		

Quadro 2. Resultado da pesquisa dos genes e quantificação e interação do biofilme em formação a partir de isolados de *Staphylococcus* oriundos do leite de cabra com as frações do extrato etanólico de *H. martiana* do biofilme

Isol.	<i>icaD</i>	<i>icaA</i>	<i>bap</i>	Quantificação do biofilme	Após interação com as frações		
					Acetato	Hexânica	Clorofórmica
1	-	NP	NP	Moderado	Fraco	Fraco	Fraco
2	-	-	-	Moderado	Fraco	Fraco	Fraco
3	-	-	+	Moderado	Fraco	Fraco	Fraco
4	-	-	+	Fraco	Fraco	Moderado	Forte
5	+	+	-	Moderado	Fraco	Fraco	Fraco
6	-	NP	+	Moderado	Moderado	Fraco	Moderado
7	-	-	-	Forte	Fraco	Fraco	Fraco
8	-	-	-	Moderado	Fraco	Fraco	Fraco
9	-	-	-	Moderado	Fraco	Fraco	Fraco
10	-	-	-	Moderado	Fraco	Fraco	Fraco
11	-	-	-	Moderado	Fraco	Fraco	Fraco

Figura 01

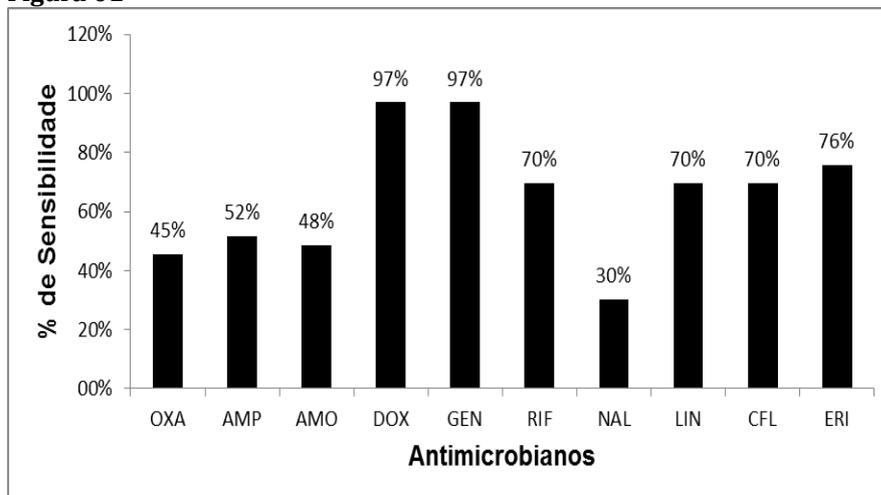
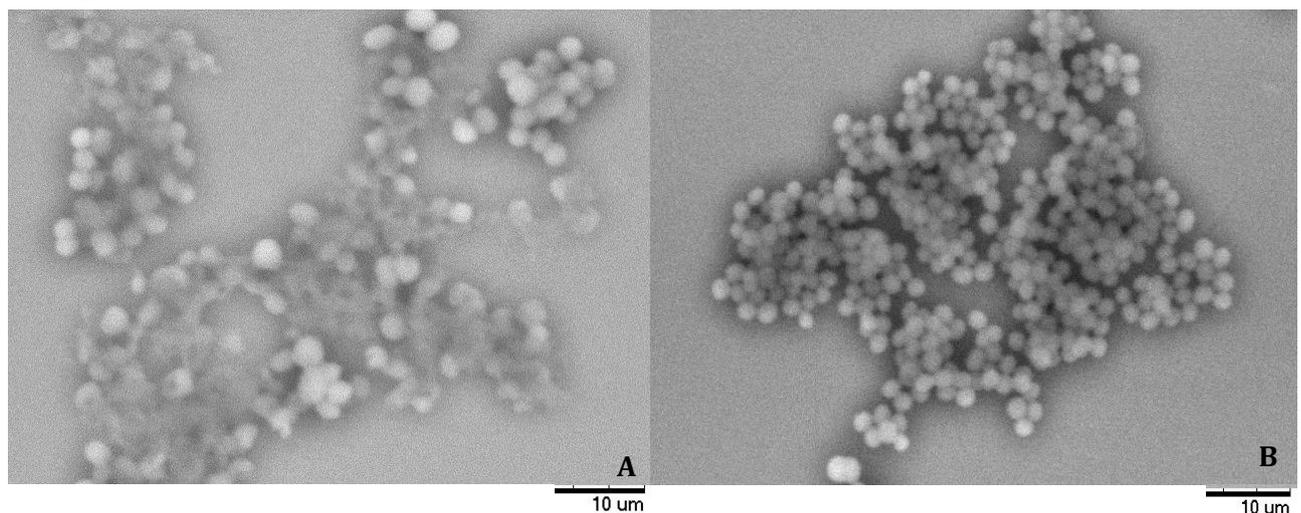


Figura 02



Artigo a ser submetido para Journal of Veterinary Diagnostic Investigation

Concordância de técnicas empregadas para o diagnóstico da mastite subclínica em cabras leiteiras infectadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*

Rodolfo de M. Peixoto, Mateus M. da Costa¹

Resumo. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a sensibilidade e especificidade das técnicas disponíveis para o diagnóstico da mastite em cabras leiteiras experimentalmente infectadas. Realizou-se infecção experimental em 20 metades mamárias, utilizando-se cepa de *S. aureus*, em uma dose infectante de $1,2 \times 10^8$ UFC/mL. Para detecção da mastite subclínica foi utilizado o *California Mastitis Test* (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS). A cultura bacteriológica (CB) foi empregada como padrão ouro, sendo realizada logo após a coleta do leite. Após um período de congelamento as amostras foram submetidas a uma nova cultura bacteriológica. Foram estabelecidos quatro momentos experimentais (0, 24, 48 e 72 horas pós-infecção). Foi observada concordância pelo teste de McNemar entre os resultados da CB realizada antes e após o congelamento das amostras. Pôde-se observar que o estabelecimento de pontos de corte no CMT e CCS mais elevados não constitui uma boa alternativa, tendo em vista que estes testes de triagem apresentaram boa sensibilidade e especificidade com pontos de corte inferiores ao recomendado por alguns estudos, a exemplo das amostras que foram positivas na cultura bacteriológica, mesmo com CCS inferior à 1×10^6 cél./mL. Levando em consideração a queda da sensibilidade ao longo dos momentos experimentais, é relevante a realização da cultura bacteriológica seriada, principalmente em rebanhos com elevada prevalência de *S. aureus*.

Key words: bacteriological culture, *California Mastitis Test*, goat, milk, somatic cell count

Câmpus Floresta, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Brasil (Peixoto)
Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco

¹Autor para correspondência: Mateus M. da Costa, Rodov. BR 407 Km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação
Senador Nilo Coelho s/n, Petrolina, PE 56300-990, Brasil. mateus.costa@univasf.edu.br

Concordance of techniques used for the diagnosis of subclinical mastitis in dairy goats experimentally infected with *Staphylococcus aureus*

Abstract. This study aimed to evaluate the sensitivity and specificity for the diagnosis of mastitis in dairy goats experimentally infected techniques. In total, it became experimental infection in 20 mammary gland. We used a strain of *S. aureus* in an infectious dose of 1.2×10^8 CFU/mL. For detection of subclinical mastitis was used the California Mastitis Test (CMT) and somatic cell count. The bacterial culture (BC) was used as the gold standard, being performed immediately after collection of milk. After a period of freezing the samples were subjected to a new bacterial culture. Four experimental time points (0, 24, 48 and 72 hours post- infection) were established. No disagreement with the McNemar test between the results of BC performed before and after freezing the samples was observed. It was observed that the establishment of cutoffs on CMT and higher SCC is not a good alternative, considering that these screening tests showed good sensitivity and specificity with cutoff points lower than recommended by some studies, like the samples that were positive on bacterial culture even with less than 1×10^6 cells/ml. Given the decrease in sensitivity over the experimental moments is important to perform serial bacteriological culture, especially in herds with a high prevalence of *S. aureus*.

Introdução

A mastite é a inflamação da glândula mamária ocasionada, geralmente, por micro-organismos. O *Staphylococcus aureus* pode não apenas causar mastite subclínica, mas também é uma importante causa de mastite clínica.^{6,33} O diagnóstico da mastite nem sempre é fácil, sendo que na mastite clínica o diagnóstico envolve a observação dos sinais clínicos característicos da enfermidade como dor e edema na glândula mamária afetada.

A mastite subclínica pode passar despercebida, a menos que as ferramentas de diagnóstico adicionais sejam utilizadas. Enquanto a mastite clínica tem baixa incidência, tem-se elevado índice de mastite subclínica em cabras associado a altas contagens de células somáticas.^{3,5,19}

O diagnóstico da mastite subclínica é bastante complicado e envolve a detecção de células somáticas e o cultivo bacteriano.¹¹ Vários testes podem ser utilizados para determinar a presença de células somáticas no leite, tais como o *California Mastitis Test* (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS).²⁵ O diagnóstico bacteriológico é uma técnica simples, entretanto, exige pessoal treinado para coleta das amostras e laboratório para a identificação dos agentes etiológicos.⁴ As técnicas diagnósticas da mastite podem ser empregadas para detecção da enfermidade no animal ou rebanho, permitindo a intervenção ainda no estágio inicial da doença.¹²

A avaliação da saúde do úbere de cabras leiteiras com mastite subclínica, requer amplo conhecimento para interpretação dos resultados obtidos com o auxílio das ferramentas de

diagnóstico disponíveis.¹² Neste trabalho, objetivou-se avaliar o conjunto sensibilidade e especificidade das técnicas disponíveis para o diagnóstico da mastite em cabras leiteiras experimentalmente infectadas com *S. aureus*.

Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Estudos Humanos e Animais, da Universidade Federal do Vale do São Francisco, sob número de protocolo 0005/131211.

Foram utilizadas 10 fêmeas caprinas da raça saanen, com faixa etária variando entre 1,5 e 4 anos, entre primeira e segunda lactação. No total, fez-se a infecção experimental em 20 metades mamárias. Antes da inoculação foram estabelecidas características bacteriológicas e celulares do leite. Os animais foram negativos em três lactoculturas consecutivas, sendo adotado um intervalo de setes dias entre estas coletas realizadas na fase pré-infecção. Os animais estavam entre o sexto e nono mês de lactação, com produção leiteira variando entre 0,5 e 1,4 L/dia, sendo a média diária igual a 0,960 L. As fêmeas foram negativas para a pesquisa de anticorpos anti-lentivírus da CAE, utilizando a imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e para *Mycoplasma agalactiae* pela técnica da PCR.

Após obter os índices das variáveis do momento inicial, as duas metades mamárias de cada fêmea foram infectadas, utilizando a via intramamária, por meio de uma sonda uretral nº 4 acoplada a uma seringa plástica esterilizada. Antes da inoculação, fez-se ordenha completa e anti-sepsia em ambos os tetos com álcool 70° GL. Após a inoculação (01 mL) na parte proximal da cisterna foi realizada massagem com movimentos ascendentes para o inóculo se distribuir na glândula mamária. Utilizou-se uma cepa de *Staphylococcus aureus*, numa dose infectante de $1,2 \times 10^8$ UFC/mL. Esta cepa de campo foi oriunda de um caso de mastite subclínica em cabra e identificada de acordo com as características bioquímicas.¹⁰

Foram estabelecidos os seguintes momentos experimentais: M0 (0h); M1 (24 horas pós-infecção); M2 (48 horas pós-infecção); M3 (72 dias pós-infecção). Para detecção da mastite subclínica foi utilizado o California Mastitis Test (CMT) de acordo com descrições da literatura.²⁴ Para a determinação da contagem de células somáticas, as amostras de leite foram coletadas após a eliminação dos três primeiros jatos de leite da ordenha em fracos contendo pastilhas de bronopol para contagem de células somáticas (CCS), utilizando medidor de fluorescência por citometria de fluxo – SomaScope MKII, fabricado pela Delta Instruments.

A cultura bacteriológica foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo *National Mastitis Council*.¹⁸ O isolamento bacteriano foi realizado a partir de leite coletado antes da ordenha, após anti-sepsia dos tetos com álcool a 70° GL. O leite foi coletado diretamente em frascos estéreis, previamente identificados e colocados em caixas isotérmicas com gelo e encaminhados imediatamente ao laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) para processamento.

Com o objetivo de avaliar o efeito do congelamento sobre a recuperação do patógeno, procedeu-se o congelamento (-20 °C) das amostras. Dessa forma, foram realizadas duas culturas bacteriológicas (CB), sendo uma realizada logo após a coleta do leite e a segunda, após o congelamento. Para realização da CB, volumes de 10 µL de cada amostra foram semeados com alça calibrada em cada quadrante de uma placa de *Blood Agar Base* acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Assim, foram consideradas positivas as placas que apresentaram uma colônia ou mais com as mesmas características morfológicas da cepa previamente identificada.⁹ As bactérias foram identificadas de acordo com características morfológicas, bioquímicas e tintoriais.¹⁰

Para avaliação dos testes diagnósticos (CMT e CCS), utilizou-se como padrão ouro o resultado da CB realizada no mesmo dia que os demais testes foram feitos. Assim, para cada momento experimental, considerou-se como padrão ouro o resultado da CB obtido naquele mesmo momento. Os resultados de positividade e negatividade na CB ao final das coletas em série (n=03), constituíram a CB acumulada. Dessa forma, resultados do CMT e CCS obtidos 72 horas (M3) após o desafio experimental foram comparados com o resultado da CB acumulada ao final das três coletas realizadas em intervalos de 24 horas. Neste caso, o padrão ouro foi a CB acumulada. Foram calculadas a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, acurácia e coeficiente *Kappa*. Valores de *Kappa* acima de 0,7 indicam concordância excelente; valores entre 0,4 e 0,7 indicam concordância moderada/boa e valores menores que 0,4 indicam concordância ruim.³¹

O teste de McNemar foi utilizado para avaliar o grau de concordância entre os testes diagnósticos. Além disso, fez-se uso do teste de McNemar para avaliar as concordâncias entre os resultados das CB realizadas no dia da coleta do leite e após um período de congelamento (-20 °C).

Para comparação dos valores da CCS entre as amostras positivas e negativas na cultura bacteriológica foi realizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%.³⁴ As médias da CCS também foram comparadas entre os momentos experimentais pela análise de variância de Friedman. Os resultados da CCS obtidos em cada um dos escores do CMT

(negativo, traço, 1+ e 2 +), foram comparados entre si, dentro de cada momento experimental, por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Usou-se a correlação de Spearman para análise das variáveis CMT e CCS, sendo considerada positividade quando: $CCS > 1 \times 10^6$ e $CMT \geq 1+$.

Com o objetivo de remover a heterogeneidade de variâncias, os dados de CCS foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 (\log_{10}) para análise estatística, e a função antilogarítmica para apresentação dos resultados. A ausência de normalidade dos dados foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para análise dos dados, foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0 para Windows.

Resultados

Considerando a série de três coletas de leite realizadas antes do congelamento das amostras, após o desafio com *S. aureus*, observou-se que do total de 20 glândulas mamárias avaliadas, 15 (75%) foram positivas nas três culturas bacteriológicas, 11 (55%) apresentaram resultado positivo em duas coletas e 14 (70%) em apenas uma coleta de leite, na etapa anterior ao congelamento. Analisando cada momento experimental, a positividade na primeira cultura bacteriológica do leite (anterior ao congelamento) foi igual a 55, 45 e 5% nos momentos 1, 2 e 3, respectivamente.

Após o congelamento e nova cultura bacteriológica, observou-se que 17 (85%) amostras foram positivas na série de três coletas, 14 (70%) foram positivas em duas coletas e 10 (50%) apresentaram-se positivas em apenas uma coleta. Dessa forma, a positividade obtida após o período de congelamento das amostras foi igual a 60, 55 e 25% nos momentos 1, 2 e 3 (Tabela 1). Foi observada concordância pelo teste de McNemar entre os resultados da CB realizada antes e após o congelamento das amostras.

Os valores da CCS nos momentos (M1, M2 e M3) foram superiores aqueles obtidos antes do desafio com cepa *S. aureus* ($p \leq 0,05$) (Tabela 3). Em M1, para a reação “traços” no CMT, as contagens celulares foram inferiores à 1×10^6 cél/mL. Por outro lado, nos momentos dois e três, observou-se CCS superior a $\geq 1 \times 10^6$ cél/mL para a reação traços. Para a reação uma cruz (1+), em todos os momentos experimentais, observou-se CCS superiores a 1×10^6 cél/mL (Tabela 4). Quando as variáveis CMT e CCS foram correlacionadas, observou-se os seguintes valores: $r = 0,71$ em M1, $r = 0,84$ em M2 e $r = 0,85$ em M3, com $p \leq 0,05$, sendo considerada positividade quando: $CCS > 1 \times 10^6$ e $CMT \geq 1+$.

O teste de Mann – Whitney realizado para os valores da CCS entre as amostras positivas e negativas na CB não apresentou significância estatística M1, contudo em M2, observou-se que as médias da CCS foram maiores entre as amostras positivas na CB ($p \leq 0,05$). Em M3, devido a presença da positividade em apenas uma amostra, não foi possível a realização do teste de média.

Para o CMT, observou-se que em todos os momentos a CCS mediana entre as reações “traços” e duas cruces (2+) apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) com medianas maiores nas reações 2+. Em M3, também observou-se diferença entre a CCS mediana para as reações 1 e 2+.

Os resultados das análises de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, acurácia e índice *Kappa*, realizadas para as análises de apenas uma CB em comparação com a CB acumulada (padrão ouro), constam na tabela 5. Em M1, observou-se que o diagnóstico baseado em apenas uma CB apresentou concordância moderada quando comparada com a positividade nas três lactoculturas, com *Kappa* = 0,58 e 0,42, antes e após o congelamento, respectivamente. Os resultados de concordância dos valores da CCS estão descritos na tabela 6. Quanto aos dados relativos à concordância do CMT estão apresentados na tabela 7.

Discussão

As culturas bacteriológicas realizadas a cada momento, quando comparadas com a positividade acumulada, antes e após o congelamento das amostras, demonstraram que o *S. aureus* nem sempre foi isolado com frequência, sendo observada uma diminuição da positividade ao longo dos momentos experimentais. A especificidade do teste foi igual a 100,0% em todas as análises e o maior percentual de sensibilidade foi obtido 24 horas após a infecção. De acordo com o *National Mastitis Council*,¹⁸ o isolamento do *S. aureus* em amostra de leite é considerado definitivo para o diagnóstico da infecção intramamária pelo patógeno. No entanto, a liberação intermitente deste patógeno no leite²⁷ pode justificar os resultados falso-negativos em algumas situações. Embora estes resultados tenham sido fundamentados em experimentos realizados com a espécie bovina, pode-se também usá-la na espécie caprina tendo em vista a similaridade da patogenia em ambas espécies animais.

A maioria das amostras positivas na cultura bacteriológica apresentaram reações “traços” e 1+ no CMT, demonstrando a importância em se considerar estas reações durante o monitoramento da mastite em rebanhos de cabras leiteiras com elevada prevalência de *S. aureus*. A existência de concordância entre o escore “traços” e a positividade na lactocultura

em algumas situações, denota a importância de se considerar qualquer grau de reatividade ao CMT, principalmente quando se pretende realizar a triagem de casos de mastite subclínica em cabras.³² Dessa forma, o *California Mastitis Test* (CMT) representa uma valiosa ferramenta para determinação da frequência da mastite em rebanhos de cabras leiteiras.²⁹

O teste de CMT apresenta boa correlação com a CCS, contudo as amostras reagentes e com elevados escores devem ser interpretadas com cautela, devido a possibilidade de reações falso-positivas, em decorrência de fatores de origem não infecciosa. Assim, o CMT deve ser utilizado com cuidado em cabras com baixa produção de leite ou em estágio final de lactação, quando as contagens de células são maiores.²¹

As medianas da CCS entre as amostras positivas e negativas na CB não apresentaram diferença estatística significativa em M1, contudo em M2, observou-se que os valores da CCS foram maiores nas amostras positivas na CB ($p \leq 0,05$). Para monitorar a saúde do úbere de uma cabra leiteira, a CCS é provavelmente a ferramenta mais relevante e possui características aceitáveis para o uso como um teste de triagem.¹² Com um valor de corte de 1500×10^3 células/mL, a sensibilidade foi estimada em 0,86 e especificidade em 0,95, para a detecção de *S. aureus* em cabras infectadas no início da lactação.¹³

A CCS é amplamente utilizada para avaliação do *status* sanitário da glândula mamária em cabras e ovelhas.¹⁵ Têm sido realizadas tentativas de estabelecer a CCS de cabras não infectadas, mas a comparação dos resultados constitui uma tarefa árdua, em decorrência da quantidade de fatores biológicos e instrumentais que podem interferir neste parâmetro.²

Existem muitos trabalhos que trazem os valores da CCS para a espécie caprina, contudo, levando em consideração as especificidades deste estudo, as comparações precisam ser feitas com bastante cautela. Em estudos transversais para detecção da mastite adquirida naturalmente, algumas variáveis não podem ser controladas, tais como espécie do patógeno, tempo de exposição e dose infectante. Neste estudo, teve-se o objetivo de fornecer informações que possam garantir a utilização das ferramentas CCS e CMT de maneira mais segura ao pesquisador e produtor de leite, neutralizando algumas variáveis. Assim, decidiu-se pela utilização de um modelo de infecção experimental, com controle de algumas variáveis relevantes para validação de testes diagnósticos.

Houve aumento gradativo na celularidade de acordo com o aumento no escore do CMT, fato já esperado, apresentando uma elevada correlação entre o CMT e CCS nos três momentos experimentais, corroborando com diversos outros estudos.^{8,23,28}

Levando em consideração a CB realizada em M1, M2 e M3, as análises de concordância realizadas com a CCS, mostraram que o melhor conjunto sensibilidade e especificidade,

ocorreu 48 pós infecção (M2). Quando foi considerada CB acumulada ao final de 72 horas como sendo o padrão ouro, a acurácia da CCS foi superior, com valor igual a 85%. Recentemente, alguns trabalhos vêm realizando combinações da CB com outros testes na tentativa de estabelecer critérios para o diagnóstico da mastite na espécie bovina.^{1,9} Segundo observações,⁹ para *S. aureus*, aquelas amostras que tiveram o crescimento de apenas uma colônia, a sensibilidade da cultura bacteriológica foi superior a 90%, sendo gradativamente diminuída quando pontos de corte mais elevados eram estabelecidos (ex. positividade quando isoladas duas ou mais colônias e CCS mínima de 200×10^3 cél./mL). Em estudo realizado com fêmeas caprinas foi observado uma sensibilidade e especificidade de 96,2 e 96,1%, respectivamente, a partir de apenas uma amostra de leite coletada antes da ordenha, tendo como padrão ouro a positividade em sucessivas amostragens.⁷

No teste de McNemar realizado para detectar concordância entre os resultados da cultura bacteriológica antes e depois do congelamento das amostras de leite nos diferentes momentos avaliados foi observado resultado significativo ($p \leq 0,05$), embora tenha sido verificado um maior número de amostras positivas na lactocultura realizada após o período de congelamento das amostras. Estudos sobre o efeito do congelamento (-20 °C) de amostras de leite positivas para *Staphylococcus* coagulase negativa não apresentaram diferenças na recuperação deste patógeno.^{14,17} Em amostras de leite de cabra, um estudo observou aumento na recuperação de patógenos pertencentes a este grupo de patógenos em diferentes dias de armazenamento.²² Contudo, outro estudo não observou aumento na recuperação de SCN em leite de cabra congelado.¹⁶

A localização intracelular dos estafilococos e os danos que o congelamento traz as células fagocíticas talvez seja o principal motivo para explicação deste fenômeno, uma vez que as células bacterianas são liberadas.²⁶ Além disso, sabe-se que o percentual de células somáticas e neutrófilos no leite de cabra é mais elevado que o encontrado em leite de vaca.²⁰

Pôde-se observar no presente estudo, que o estabelecimento de pontos de corte mais altos no CMT e CCS não constitui uma boa alternativa, tendo em vista que estes testes de triagem apresentaram boa sensibilidade e especificidade com pontos de corte inferiores ao recomendado por outros pesquisadores, a exemplo das amostras que foram positivas na cultura bacteriológica mesmo com CCS inferior à 1×10^6 cél./mL. A concordância dos resultados da cultura bacteriológica realizada antes e após o congelamento das amostras, demonstra a possibilidade de armazenamento das amostras sem comprometimento da viabilidade. Por outro lado, levando em consideração a queda da sensibilidade da CB ao longo dos momentos experimentais, faz-se necessário, quando possível, a realização da cultura

bacteriológica seriada, principalmente em rebanhos de cabras leiteiras com elevada prevalência de *S. aureus*.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse em relação à pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

Fontes de Financiamento

A pesquisa foi financiada com recursos provenientes da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e pelo MCT-INSA/CNPq/CT-Hidro/Ação Transversal (N.º 35/2010).

Referências

1. Andersen S, Dohoo IR, Olde Riekerink R, Stryhn H: 2010, Diagnosing intramammary infections: evaluating expert opinions on the definition of intramammary infection using conjoint analysis. *J Dairy Sci* 93:2966–2975.
2. Andrade PVD, Souza MR, Borges I, Penna CFAM: 2001, Contagem de células somáticas em leite de cabra [Enumeration of somatic cells in goat Milk]. *Arq Bras Med Vet Zootec* 53:396-400. In Portuguese. Abstract in English.
3. Bergonier D, de Cremoux R, Rupp R, et al.: 2003, Mastitis of dairy small ruminants *Vet Res* 34:689–716.
4. Buswell J: 1995, Simple mastitis bacteriology for the practice. *In Pract* 17:426-432.
5. Contreras A, Sierra D, Sánchez A, et al.: 2007, Mastitis in small ruminants. *Small Rumin Res* 68:145–153.
6. Contreras A, Luengo C, Sánchez A, Corrales JC: 2003, The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livest Prod Sci* 79:273–283.
7. Contreras A, Corrales JC, Sánchez A, Sierra D: 1997, Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. *J Dairy Sci* 80:2815–2819.
8. Contreras A, Sierra D, Corrales JC, et al.: 1996, Physiological threshold of somatic cell count and California Mastitis Test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. *Small Rumin Res* 21:259-264.
9. Dohoo IR, Smith J, Andersen S, et al.: 2011, Diagnosing intramammary infections: evaluation of definitions based on a single milk sample. *J Dairy Sci* 94:250–261.
10. Holt JG: 1994, *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
11. Klaas IC, Enevoldsen C, Vaarst M, Houeh H: 2004, Systematic clinical examinations for identification of latent udder health types in Danish dairy herds. *J Dairy Sci* 87:1217-1228.

12. Koop G, Nielen M, van Werven T: 2012, Diagnostic tools to monitor udder health in dairy goats. *Vet Q* 32:37-44.
13. Koop G, van Werven T, Toft N, Nielen M: 2011, Estimating test characteristics of somatic cell count to detect *Staphylococcus aureus*-infected dairy goats using latent class analysis. *J Dairy Sci.* 94:2902–2911.
14. Luedecke LO, Forster TL, Williams K, Hillers JK: 1972, Effect of freezing and storage at–20°C on survival of mastitis pathogens. *J Dairy Sci* 55:417–418.
15. McDougall S, Murdough P, Pankey W, et al.: 2001, Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Rumin Res* 40:245–254.
16. McDougall S: 2000, Recovery of bacteria from goat's milk following freezing and the prevalence of bacterial infection in milk from goats with an elevated somatic cell count. *N Z Vet J* 48:27–29.
17. Murdough PA, Deitz KE, Pankey JW: 1996, Effects of freezing on the viability of nine pathogens from quarters with subclinical mastitis. *J Dairy Sci* 79:334–336.
18. National Mastitis Council: 1999, (US). Laboratory handbook on bovine mastitis. Arlington, VA: WD Hoard & Sons.
19. Paape MJ, Wiggans GR, Bannerman DD, et al.: 2007, Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Rumin Res* 68:114–125.
20. Paape MJ, Capuco AV: 1997, Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. *J Anim Sci* 75:556–565.
21. Perrin GG, Mallereau MP, Lenfant D, Baudry C.: 1997, Relationships between California mastitis test (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. *Small Rumin Res* 26:167-170.
22. Sánchez A, Contreras A, Jiménez J, et al.: 2003. Effect of freezing goat milk samples on recovery of intramammary bacterial pathogens. *Vet Microbiol* 94:71-77.
23. Schalm OW, Carrol EJ, Jain NC: 1971, Bovine mastitis: Physical and chemical tests for detection of mastitis. pp.128-157, Lea and Febiger, Philadelphia.
24. Schalm OW, Noorlander DO: 1957, Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *J Am Vet Med Assoc* 130:199-207.
25. Schroder AC, Hamman J: 2005, The influence of technical factors on differential cell counts in milk. *J Dairy Res* 72:153-158, 2005.
26. Schukken YH, Smit JAH, Grommers FJ, et al.: 1989, Effect of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk samples. *J Dairy Sci* 72:1900–1906.
27. Sears PM, Smith BS, English PB, et al.: 1990, Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *J Dairy Sci* 73:2785–2789.
28. Silva ER, Araújo AM, Alves FSF, et al.: 2001, Associação entre o California Mastitis Test e a Contagem de Células Somáticas na avaliação da saúde da glândula mamária caprina

- [Relationship between California Mastitis Test and Somatics Cells Count in the avaluation of the healthy mammary gland in goats]. *Braz J Vet Res Anim Sci* 38:46-48. In Portuguese. Abstract in English.
29. Souza FN, Blagitz MG, Penna CFAM, et al.: 2012, Somatic Cell count in small ruminants: Friend or foe? *Small Rumin Res* 107:65-75.
 30. Taponen S, Salmikivi L, Simojoki H, et al.: 2009. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culture. *J Dairy Sci* 92:2610-2617.
 31. Thrusfield M: 2005, *Veterinary epidemiology*, 3th ed., 600 pp. Blackwell Science, Oxford, England.
 32. Tonin FB, Nader Filho A: 2005, Correlação entre o “California Mastitis Test” e o exame bacteriológico no leite de cabras [Correlation between california mastitis test and bacteriological examination of goat milk]. *ARS Veterinária*. 21:155-159. In Portuguese. Abstract in English.
 33. White EC, Hinckley LS: 1999, Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. *Small Rumin Res*. 33:117–121.
 34. Zar J.H. 1999. *Biostatistical analysis*, 4th ed, pp.486-500. Prentice Hall, Upper Saddle River.

Tabela 1. Resultado do teste de cultura bacteriológica, CMT e CCS do leite de cabras inoculadas experimentalmente com *S. aureus*.

	M0		M1		M2		M3		Acumulada		M0: antes da infecção; M1: 24 horas após
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	
1ª CB	0,0	100,0	55,0	45,0	45,0	55,0	5,0	95,0	75,0	25,0	
2ª CB	0,0	100,0	60,0	40,0	55,0	45,0	25,0	75,0	85,0	15,0	
CCS	0,0	100,0	40,0	60,0	80,0	20,0	70,0	30,0	80,0	20,0	
CMT	0,0	100,0	50,0	50,0	70,0	30,0	65,0	35,0	80,0	20,0	

infecção; M2: 48 horas pós infecção; M3: 72 horas pós infecção. P = positivo; N = negativo. CB = cultura bacteriológica. A 1ª CB foi realizada no dia da coleta do leite. A 2ª CB foi realizada após cinco meses de congelamento do leite. A positividade foi considerada quando: CCS: $> 1 \times 10^6$ e CMT: $\geq 1+$.

Tabela 2. Estatística descritiva e inferencial dos dados relativos à CCS nos distintos momentos experimentais.

	M0	M1	M2	M3
Mínimo	22,0	177,0	66,0	127,0
Máximo	787,0	8683,0	8939,0	9290,0
Mediana	66,5 ^b	554,0 ^a	4086,5 ^a	2502,0 ^a

M0: anterior a infecção; M1: 24 horas pós infecção; M2: 48 horas pós infecção; M3: 72 horas pós infecção. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$), pela análise de variância para amostras relacionadas (Teste de Friedman).

Tabela 3. Estatística descritiva dos dados relativos à CCS ($\times 10^3$) entre os escores do CMT realizado ao longo dos três momentos experimentais.

	M0	M1			M2			M3		
	CMT neg.	Tr	1 +	$\geq 2 +$	Tr	1 +	$\geq 2 +$	Tr	1 +	$\geq 2 +$
Mínimo	22	177	220	5920	66	1218	6462	127	927	6360
Máximo	787	729	7376	8683	2604	7939	8939	1401	9290	7373
Mediana	66,5	280,0	3251,5	6300,1	354,0	3696,0	8816,0	738,0	2985,0	6844,5
Amostras (%)	100,0	50,0	30,0	20,0	30,0	40,0	30,0	35,0	45,0	20,0

M0: anterior a infecção; M1: 24 horas pós infecção; M2: 48 horas pós infecção; M3: 72 horas pós infecção

Tabela 4. Análise de parâmetros relacionados as culturas bacteriológicas (CB) realizadas ao longo de três momentos experimentais.

M1: 24 horas pós infecção; M2: 48 horas pós infecção; M3: 72 horas pós infecção. Considerou-se padrão ouro, o

Valores observados	Anterior ao congelamento			Após o congelamento			resultado das três lactoculturas realizadas a cada 24 horas. Teste de McNemar
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	
Sensibilidade (%)	73,3	60,0	6,7	70,6	64,7	29,4	
Especificidade (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
Valor Preditivo positivo (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
Valor Preditivo negativo (%)	55,6	45,5	26,3	37,5	33,3	20,0	
Acurácia (%)	80,0	70,0	30,0	75,0	70,0	40,0	
<i>Kappa</i>	0,58	0,43	0,03	0,42	0,35	0,11	
McNemar	NS	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	NS	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	

emmar com $p \leq 0,05$ indica discordância entre o resultado obtido no momento experimental quando comprado ao resultado da CB acumulada.

Tabela 5. Análise dos valores da CCS em comparação com cada CB e com a positividade acumulada.

Valores observados	CCS			
	M1	M2	M3	PA
Sensibilidade (%)	45,5	100,0	0,0	86,7
Especificidade (%)	66,7	36,4	26,3	80,0
Valor Preditivo positivo (%)	62,5	56,3	0,0	92,9
Valor Preditivo negativo (%)	50,0	100,0	83,3	66,7
Acurácia (%)	55,0	65,0	25,0	85,0
<i>Kappa</i>	0,12	0,34	-0,10	0,63
McNemar	NS	≤ 0,05	≤ 0,05	NS

M1: 24 horas pós infecção; M2: 48 horas pós infecção; M3: 72 horas pós infecção; PA: positividade acumulada. Considerou-se padrão ouro a CB realizada no mesmo momento experimental, bem como aquela positividade acumulada ao final das três coletas. A positividade foi considerada a partir: CCS: > 1 x 10⁶. Teste de McNemar com $p \leq 0,05$ indica discordância entre o resultado obtido no momento experimental quando comparado ao resultado da CB acumulada.

Tabela 6. Análise dos resultados do CMT em comparação com a CB realizada em cada momento experimental.

Valores observados	CMT ≥ uma cruz				CMT ≥ duas cruzes			
	M1	M2	M3	PA	M1	M2	M3	PA
Sensibilidade (%)	54,5	88,9	0,0	80,0	27,3	44,4	0,0	26,7
Especificidade (%)	55,6	45,5	31,6	80,0	88,9	81,8	78,9	100,0
Valor Preditivo +	60,0	57,1	0,0	92,3	75,0	66,7	0,0	100,0
Valor Preditivo -	50,0	83,3	85,7	57,1	50,0	64,3	93,8	31,3
Acurácia (%)	55,0	65,0	30,0	80,0	55,0	65,0	75,0	45,0
<i>Kappa</i>	0,10	0,33	-0,10	0,53	0,15	0,27	-0,09	0,15
McNemar	NS	NS	≤ 0,05	NS	≤ 0,05	NS	NS	≤ 0,05

M1: 24 horas pós infecção; M2: 48 horas pós infecção; M3: 72 horas pós infecção; PA: positividade acumulada. Considerou-se padrão ouro a CB realizada no mesmo momento experimental, bem como aquela positividade acumulada ao final das três coletas. Teste de McNemar com $p \leq 0,05$ indica discordância entre o resultado obtido no momento experimental quando comparado ao resultado da CB acumulada.

Artigo a ser submetido para Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Composição do leite de cabras Saanen infectadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus* e submetidas a dois protocolos de tratamento

[*Milk composition of goats experimentally infected Saanen with Staphylococcus aureus and subjected to two treatment protocols*]

R. M. Peixoto^{1*}; M. M. Costa²

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, *Campus Floresta*, PE

² Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF - *Campus Ciências Agrárias*, Petrolina, PE

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the chemical composition of milk after infection and treatment of mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. Ten Saanen goats were used. Experimental infection was performed in 20 mammary glands, forming four groups, each consisting of five mammary glands. One group was treated with commercial antimicrobial and another with ointment the base of natural plant extract. The other groups were constituted controls. The values obtained for fat, lactose, protein, total solids and milk production were analyzed through the experimental moments, comparing them with each other and between experimental groups. Mastitis was diagnosed after 24 hours of inoculation in milk microbiology. The animals showed no changes in the clinical parameters evaluated. For the percentages of fat, protein and total solids, there was an increase over the experimental moments. However, there was variation among the experimental groups. Given the importance of conventional antimicrobial therapy and increased use of natural antimicrobials results obtained show equality between the two treatment options, especially regarding the maintenance of the main components of milk.

Keywords: goat, milk composition, therapy, mastitis

* Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: rodolfo.peixoto@ifsertao-pe.edu.br

RESUMO

Neste estudo, objetivou-se avaliar a composição química do leite após a infecção e tratamento da mastite induzida por S. aureus. Foram utilizadas 10 fêmeas caprinas da raça Saanen. Fez-se a infecção experimental em 20 glândulas mamárias, formando-se quatro grupos experimentais, sendo cada um composto por cinco glândulas mamárias. Um grupo foi tratado com antimicrobiano comercial e outro com pomada a base de extrato natural de planta. Os demais grupos foram constituídos controles. Os valores obtidos para gordura, lactose, proteína, sólidos totais e produção leiteira foram analisados ao longo dos momentos experimentais, comparando-os entre si e entre os grupos experimentais. A mastite foi diagnosticada 24 horas pós inoculação, utilizando-se a lactocultura. Os animais não apresentaram alterações nos parâmetros clínicos avaliados. Para os percentuais de gordura, proteína e sólidos totais, observou-se uma elevação ao longo dos momentos experimentais, sem variação entre os grupos experimentais. Tendo em vista, a importância da terapia antimicrobiana convencional e a crescente utilização de antimicrobianos naturais os resultados obtidos mostram igualdade entre as duas opções terapêuticas, principalmente no aspecto de manutenção dos principais componentes do leite.

Palavras-chave: cabras, composição do leite, terapia, mastite

INTRODUÇÃO

O efetivo caprino na região Nordeste brasileira representa mais de 90% do rebanho nacional (IBGE, 2012), sendo a produção leiteira uma importante fonte de renda ao produtor rural. Diversos fatores têm contribuído para melhoria da cadeia produtiva do leite de cabra, porém, ainda existem algumas limitações em decorrência dos poucos estudos voltados para composição do leite desta espécie. Os principais componentes utilizados na avaliação da qualidade da matéria-prima, são: lactose, proteína, gordura e sólidos totais (Souza *et al.*, 2009).

Estudos com rebanhos caprinos leiteiros revelaram variação nos teores de gordura e proteínas no leite de diferentes raças (Haenlein, 1996; Zeng e Escobar, 1996; Sung *et al.*, 1999), em virtude de fatores genéticos, nutricionais, sistema de produção, fase da lactação, ano e estação do ano (Morgan *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2009). Níveis elevados da produção de leite foram associados com menor concentração de sólidos totais, em especial, teor de gordura. Estudos apontam que os teores de proteínas do leite não apresentam variação em diferentes períodos de lactação, mas a lactose e a gordura podem variar com o avanço da lactação (Das e Singh, 2000; Prasad e Sengar, 2002).

O componente material genético e o aporte de nutrientes também têm uma influência direta sobre a produção de leite e a concentração dos seus principais constituintes (Prasad e Sengar 2002). Além disso, têm-se os fatores relacionados à sanidade do rebanho, destacando-se a mastite, uma enfermidade frequente em rebanhos leiteiros e que traz uma série de prejuízos, dentre estes, a redução da produção leiteira e alteração dos principais componentes do leite (Winter *et al.*, 2003; Leitner *et al.* 2004; Karzis *et al.*, 2007; Koop *et al.*, 2010; Mungatana *et al.*, 2011).

Programas eficazes e econômicos de controle de mastite devem direcionar suas ações para as medidas preventivas, em virtude dos ganhos obtidos com a produção de leite, contudo a intervenção terapêutica também constitui uma parte importante de um programa de controle de mastite (Erskine *et al.*, 2003).

São escassos os estudos que avaliam a composição do leite após terapias antimicrobianas, principalmente a partir de extratos naturais. É sabido que a composição do leite é um importante requisito para avaliar a qualidade do leite que será enviado à indústria de laticínios (Souza *et al.*, 2009).

Tendo em vista que o conhecimento da composição do leite é fundamental para determinação de parâmetros qualitativos, além de definir propriedades organolépticas e

industriais, realizou-se um este estudo com o objetivo de avaliar a composição química do leite após a infecção com *S. aureus* e terapia antimicrobiana convencional e natural.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e sistema de criação

Foram utilizadas 10 fêmeas caprinas da raça Saanen, com faixa etária variando entre 1,5 e 04 anos, entre primeira e segunda ordem de parto. Os animais estavam entre o sexto e nono mês de lactação, com produção leiteira variando entre 0,5 e 1,4 L/dia, sendo a média diária igual a 0,960 L. O período de adaptação dos animais às novas instalações da UNIVASF foi de oito meses. Todas as fêmeas foram negativas para a pesquisa de anticorpos anti-lentivírus da CAE, utilizando a imunodifusão em gel de agarose (IDGA). Antes da fase experimental, todas as fêmeas foram vermifugadas e submetidas ao casqueamento. Após o parto, as crias permaneceram em aleitamento natural durante três meses. As fêmeas foram submetidas a ordenha manual (1x ao dia).

Infecção experimental com *Staphylococcus aureus*

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Estudos Humanos e Animais, da Universidade Federal do Vale do São Francisco, sob número de protocolo 0005/131211. Após a aprovação, desenhou-se o seguinte delineamento experimental para os estudos “in vivo”: foram formados quatro grupos, cada qual constituído por cinco glândulas mamárias. No grupo um (G1), as metades mamárias do lado direito foram infectadas e tratadas com pomada à base de extrato de *H. martiana*. A metade mamária esquerda do mesmo animal também foi infectada, porém foi considerada “controle” (não tratada), constituindo o G2. No grupo 03 (G3), as metades mamárias do lado direito foram infectadas e tratadas com antibiótico à base de gentamicina na metade direita. A metade mamária esquerda foi considerada “controle” (não tratada), sendo identificada como G4. No total, fez-se a infecção experimental em 20 metades mamárias, onde cada grupo era composto por cinco metades mamárias. O fármaco utilizado foi determinado pelo teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Antes da inoculação foram estabelecidas as informações clínicas, as características físico-químicas e celulares do leite, mediante a realização de uma ordenha no período da manhã. Os animais foram negativos em três lactoculturas consecutivas, sendo

adotado um intervalo de setes dias entre as coletas realizadas na fase pré-infecção. Para infecção experimental, utilizou-se uma cepa de campo oriunda de um caso de mastite subclínica em cabra e identificada de acordo com suas características bioquímicas (Holt, 1994).

Após obter os índices das variáveis do momento inicial, as duas metades mamárias de cada fêmea foram infectadas, utilizando a via intramamária, por meio de uma sonda uretral nº 4 acoplada a uma seringa plástica estéril. Antes da inoculação, fez-se ordenha completa e anti-sepsia em ambos os tetos com álcool 70° GL. Após a inoculação (01 mL) na parte proximal da cisterna foi realizada massagem com movimentos ascendentes para o inóculo se distribuir na glândula mamária. A dose infectante utilizada foi de $1,2 \times 10^8$ UFC/mL.

A partir deste instante os animais foram acompanhados diariamente, mediante avaliação clínica (temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória e dinâmica ruminal) e análise do leite em uma ordenha diária (Santos et al., 2007).

A mastite foi reconhecida no momento em que surgiram as evidências das alterações de características do leite, utilizando-se a lactocultura e o California Mastitis Test (CMT). Foram estabelecidos os seguintes momentos experimentais:

- M0 - anterior à infecção (0h);
- M1 - 48 horas pós infecção;
- M2 - 72 horas pós infecção/início do tratamento;
- M3 - 06 dias pós infecção/03 dias após o início tratamento;
- M4 - 09 dias pós infecção/final do tratamento;
- M5 - 12 dias pós infecção/06 dias após o final do tratamento;
- M6 - 25 dias pós infecção/16 dias após o final do tratamento;
- M7 - 41 dias pós infecção/32 dias após o final do tratamento;

Uso da terapia convencional e natural

O tratamento foi instituído 36 horas após a infecção. No G1, a metade mamária direita de cada fêmea foi tratada com pomada à base de *H. martiana* na dose de 05 mL, via intramamária, durante seis dias consecutivos, logo após a ordenha da manhã. No G3, as metades mamárias foram tratadas com uma pomada comercial à base de gentamicina (15 mg/mL), via intramamária, durante seis dias consecutivos. Em cada animal, a metade mamária esquerda (grupos G2 e G4) foi considerada controle e recebeu solução fisiológica (0,9% NaCl) na dose de cinco (5 mL).

Preparação do extrato de planta para uso via intramamária

Baseando em resultados de outros estudos de pesquisa, utilizou-se o extrato etanólico bruto da *H. martiana* para preparação terapia intramamária (Gonçalves et al., 2005; Cruz Silva et al., 2012). Foram realizados testes de compatibilidade entre as diferentes bases e o extrato da planta. Fez-se testes de compatibilidade com as bases “creme” e “pomada”, sendo observada a separação de fases quando utilizou-se a base creme. A partir daí, os testes seguiram com base pomada. Observou-se também, que os antimicrobianos comerciais têm em sua formulação a base “pomada”. A pomada contendo extrato de *H. martiana* apresentou uma concentração final de 5%.

Fórmula:

- Extrato de *H. martiana* (jatobá) ----- 2,5 g
- Lanolina ----- 15,0 g
- Vaselina sólida q.s.p. ----- 50,0 g

Inicialmente, o extrato foi solubilizado em propilenoglicol. Em seguida, procedeu-se a manipulação da pomada com lanolina e vaselina, obtendo uma concentração final de lanolina de 30%.

Composição do leite

Para determinação a composição do leite (gordura, proteína, lactose e sólidos totais), utilizou-se o espectrômetro FTIR - LactoScope FTIR Analyser, fabricado pela Delta Instruments, sendo empregado o método secundário de espectroscopia de infravermelho – Transformada de Fourier (FTIR).

Análise estatística

Os valores obtidos para gordura, lactose, proteína, sólidos totais e produção leiteira foram analisados ao longo dos momentos experimentais, comparando-os entre si e entre os grupos experimentais, tendo a média como medida de tendência central, empregando-se os testes não paramétricos de Friedman para a comparação dos momentos dentro de cada grupo e de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos dentro de cada momento experimental.

RESULTADOS

A mastite foi diagnosticada após 24 horas da inoculação, utilizando-se a lactocultura. Os animais não apresentaram alterações nos parâmetros clínicos avaliados.

Na avaliação dos componentes do leite, para o percentual de gordura, observou-se maior percentual ao longo dos momentos experimentais em G1 e G2. No grupo tratado com antibiótico (G3) e seu respectivo controle (G4) não foram observadas alterações significativas. Este percentual não apresentou variação entre os grupos tratados e controles (Tabela 1).

Tabela 1. Média de cinco repetições do teste de composição de leite para a variável percentual gordura em cabras infectadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
G1	1,82 ^{Aa}	2,64 ^{ABa}	2,52 ^{ABa}	2,54 ^{ABa}	2,76 ^{ABa}	2,69 ^{ABa}	3,13 ^{Ba}	3,18 ^{Ba}
G2	1,92 ^{Aa}	2,73 ^{ABa}	2,44 ^{ABa}	2,57 ^{ABa}	2,74 ^{ABa}	2,78 ^{ABa}	3,20 ^{Ba}	3,19 ^{Ba}
G3	2,08 ^{Aa}	2,20 ^{Aa}	2,24 ^{Aa}	2,15 ^{Aa}	2,69 ^{Aa}	2,61 ^{Aa}	2,82 ^{Aa}	2,93 ^{Aa}
G4	2,20 ^{Aa}	2,38 ^{Aa}	2,31 ^{Aa}	2,22 ^{Aa}	3,20 ^{Aa}	2,68 ^{Aa}	2,80 ^{Aa}	3,03 ^{Aa}

G1: metades mamárias tratadas com extrato de *H. martiana*;

G2: metades mamárias não tratadas;

G3: metades mamárias tratadas com antibiótico comercial à base de gentamicina;

G4: metades mamárias não tratadas;

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

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

M0 - anterior à infecção (0h); M1 - 48 horas pós infecção; M2 - 72 horas pós infecção/início do tratamento; M3 - 06 dias pós infecção/03 dias após início do tratamento; M4 - 09 dias pós infecção/final do tratamento; M5 - 12 dias pós infecção/03 dias após o final do tratamento; M6 - 25 dias pós infecção/16 dias após o final tratamento; M7 - 41 dias pós infecção/32 dias após o final do tratamento;

Para o percentual de proteínas, também observou-se maior percentual ao longo dos momentos experimentais, sem variações entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Média de cinco repetições do teste de composição de leite para a variável percentual proteína em cabras infectadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
G1	2,88 ^{Aa}	3,30 ^{ABa}	3,32 ^{ABa}	3,40 ^{Ba}	3,32 ^{ABa}	3,27 ^{Ba}	3,03 ^{ABa}	3,08 ^{ABa}
G2	2,87 ^{Aa}	3,22 ^{ABa}	3,13 ^{ABa}	3,22 ^{ABa}	3,20 ^{Ba}	3,23 ^{Ba}	3,03 ^{ABa}	3,08 ^{ABa}
G3	3,06 ^{Aa}	3,27 ^{ABa}	3,21 ^{ABa}	3,21 ^{ABa}	3,41 ^{Ba}	3,43 ^{Ba}	3,21 ^{A ABa}	3,19 ^{ABa}
G4	3,05 ^{Aa}	3,24 ^{ABa}	3,19 ^{ABa}	3,24 ^{ABa}	3,63 ^{Ba}	3,39 ^{Ba}	3,21 ^{ABa}	3,17 ^{ABa}

G1: metades mamárias tratadas com extrato de *H. martiana*;

G2: metades mamárias não tratadas;

G3: metades mamárias tratadas com antibiótico comercial à base de gentamicina;

G4: metades mamárias não tratadas;

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

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

M0 - anterior à infecção (0h); M1 - 48 horas pós infecção; M2 - 72 horas pós infecção/início do tratamento; M3 - 06 dias pós infecção/03 dias após início do tratamento; M4 - 09 dias pós infecção/final do tratamento; M5 - 12 dias pós infecção/03 dias após o final do tratamento; M6 - 25 dias pós infecção/16 dias após o final tratamento; M7 - 41 dias pós infecção/32 dias após o final do tratamento;

Para o percentual de lactose, não foram observadas variações ao longo dos momentos experimentais. Por outro lado, observou-se diferença entre grupos, porém em apenas dois momentos (Tabela 3).

Tabela 3. Média de cinco repetições do teste de composição de leite para a variável percentual lactose em cabras infectadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
G1	4,29 ^{Aa}	4,03 ^{Aa}	4,05 ^{Aa}	3,87 ^{Aa}	4,08 ^{Aa}	4,10 ^{Aa}	4,30 ^{Aa}	4,16 ^{Aa}
G2	4,30 ^{Aa}	4,13 ^{Aa}	4,22 ^{Aa}	4,23 ^{Aa}	4,38 ^{Aab}	4,16 ^{Aa}	4,34 ^{Aa}	4,16 ^{Aab}
G3	4,43 ^{Aa}	4,32 ^{Aa}	4,29 ^{Aa}	4,39 ^{Aa}	4,56 ^{Ab}	4,36 ^{Aa}	4,41 ^{Aa}	4,42 ^{Aab}
G4	4,47 ^{Aa}	4,37 ^{Aa}	4,34 ^{Aa}	4,39 ^{Aa}	4,54 ^{Aab}	4,41 ^{Aa}	4,45 ^{Aa}	4,44 ^{Ab}

G1: metades mamárias tratadas com extrato de *H. martiana*;

G2: metades mamárias não tratadas;

G3: metades mamárias tratadas com antibiótico comercial à base de gentamicina;

G4: metades mamárias não tratadas;

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

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

M0 - anterior à infecção (0h); M1 - 48 horas pós infecção; M2 - 72 horas pós infecção/início do tratamento; M3 - 06 dias pós infecção/03 dias após início do tratamento; M4 - 09 dias pós infecção/final do tratamento; M5 - 12 dias pós infecção/03 dias após o final do tratamento; M6 - 25 dias pós infecção/16 dias após o final tratamento; M7 - 41 dias pós infecção/32 dias após o final do tratamento;

Para o percentual de sólidos totais, observou-se maior percentual ao longo dos momentos experimentais. Este percentual não apresentou variação entre os grupos tratados e controle (Tabela 4).

Tabela 4. Média de cinco repetições do teste de composição de leite para a variável percentual sólidos totais em cabras infectadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
G1	9,93 ^{Aa}	10,92 ^{ABa}	10,83 ^{ABa}	10,79 ^{ABa}	11,14 ^{ABa}	11,05 ^{ABa}	11,44 ^{Ba}	11,40 ^{Ba}
G2	10,03 ^{Aa}	11,02 ^{ABa}	10,74 ^{ABa}	10,97 ^{ABa}	11,28 ^{Ba}	11,15 ^{ABa}	11,56 ^{Ba}	11,41 ^{Ba}
G3	10,51 ^{Aa}	10,72 ^{Aa}	10,68 ^{Aa}	10,69 ^{Aa}	11,60 ^{Aa}	11,37 ^{Aa}	11,42 ^{Aa}	11,51 ^{Aa}
G4	10,66 ^{Aa}	10,93 ^{Aa}	10,76 ^{Aa}	10,78 ^{Aa}	12,31 ^{Aa}	11,45 ^{Aa}	11,42 ^{Aa}	11,61 ^{Aa}

G1: metades mamárias tratadas com extrato de *H. martiana*;

G2: metades mamárias não tratadas;

G3: metades mamárias tratadas com antibiótico comercial à base de gentamicina;

G4: metades mamárias não tratadas;

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

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

M0 - anterior à infecção (0h); M1 - 48 horas pós infecção; M2 - 72 horas pós infecção/início do tratamento; M3 - 06 dias pós infecção/03 dias após início do tratamento; M4 - 09 dias pós infecção/final do tratamento; M5 - 12 dias pós infecção/03 dias após o final do tratamento; M6 - 25 dias pós infecção/16 dias após o final tratamento; M7 - 41 dias pós infecção/32 dias após o final do tratamento;

Os dados obtidos no controle leiteiro demonstraram um decréscimo na produção em todos grupos ao longo do período pós infecção. Entre os grupos não foram observadas alterações significativas (Tabela 5).

Tabela 5. Média de cinco repetições do controle leiteiro (L/dia) realizado em cabras infectadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
G1/G2	0,94 ^{Ca}	0,78 ^{ABa}	0,74 ^{Aa}	0,83 ^{ABCa}	0,91 ^{BCa}	0,84 ^{ABCa}	0,81 ^{ABCa}	0,74 ^{Aa}
G3/G4	1,012 ^{Aa}	0,9 ^{Aa}	0,92 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	1,0 ^{Aa}	0,99 ^{Aa}	1,08 ^{Aa}	0,88 ^{Aa}

G1: metades mamárias tratadas com extrato de *H. martiana*;

G2: metades mamárias não tratadas;

G3: metades mamárias tratadas com antibiótico comercial à base de gentamicina;

G4: metades mamárias não tratadas;

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

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

M0 - anterior à infecção (0h); M1 - 48 horas pós infecção; M2 - 72 horas pós infecção/início do tratamento; M3 - 06 dias pós infecção/03 dias após início do tratamento; M4 - 09 dias pós infecção/final do tratamento; M5 - 12 dias pós infecção/03 dias após o final do tratamento; M6 - 25 dias pós infecção/16 dias após o final tratamento; M7 - 41 dias pós infecção/32 dias após o final do tratamento;

DISCUSSÃO

A utilização de antimicrobianos naturais na Medicina Veterinária vem crescendo, devido, principalmente, ao fenômeno da resistência aos antimicrobianos comerciais (Schuch *et al.*, 2008). O potencial antimicrobiano de extratos de plantas do gênero *Hymenaea* já foi comprovado em alguns estudos (Fernandes *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2005), em função da presença de flavonoides e terpenos (Cruz Silva *et al.*, 2012).

É sabido que a mastite é um dos principais fatores que afetam a composição e qualidade do leite enviado à indústria de laticínios, sendo o *Staphylococcus aureus* um dos patógenos mais importantes da mastite em fêmeas caprinas (Shearer e Harris, 2003). Além disso, a realização do presente delineamento experimental foi motivada pela ausência de informações acerca da estabilidade das concentrações dos principais constituintes do leite de cabras, após a infecção e terapia com extratos naturais e fármacos comerciais.

Foi observado aumento nos percentuais logo após a infecção experimental, com manutenção dos valores ao longo dos momentos experimentais para os teores de gordura, proteína e sólidos totais. Quanto à comparação dos grupos em cada momento experimental, não foram observadas variações, à exceção da variável lactose que apresentou maior percentual no grupo tratado com antibiótico comercial (G3), quando comparado ao grupo tratado com o antimicrobiano natural (G1) em um dos momentos experimentais. Estes resultados não diferiram daqueles encontrados por Vilanova *et al.* (2008), em trabalho realizado com a mesma raça e período de lactação similar, porém com animais negativos para a mastite.

Isto indica que estes fatores não foram afetados pela inoculação experimental dos animais com o *S. aureus*. De modo geral, as inferências acerca das variações dos principais componentes do leite devem ser feitas com bastante cautela, em virtude da existência de outras variáveis que influenciam o percentual destes constituintes no leite, tais como genética, manejo alimentar, regime de ordenha, estágio de lactação e ordem de parto (Aganga *et al.*, 2002; Queiroga *et al.*, 2007; Vilanova *et al.*, 2008).

Neste trabalho, foi observado o aumento dos componentes gordura e sólidos totais no grupo tratado com a pomada contendo extrato de *H. martiana* (G1) e seu respectivo controle (G2), mostrando-se constante até o final da terapia antimicrobiana. O teor de proteína também apresentou aumento significativo logo após a infecção em todos os grupos avaliados, com manutenção dos valores ao longo da terapia. Karzis *et al.* (2007) realizando um estudo similar em cabras leiteiras, não observaram diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de gordura, proteína e lactose antes, durante e após o tratamento com antibióticos.

Para os constituintes gordura, proteína e sólidos totais pesquisados, não foram observadas alterações entre os grupos tratados com a pomada à base de *H. martiana* e o grupo que recebeu antimicrobiano comercial, corroborando com os achados de Karzis *et al.* (2007). Isto constitui um achado relevante, uma vez que vários grupos de pesquisa estão desenvolvendo estudos com antimicrobianos naturais, dada a elevada resistência dos patógenos envolvidos na mastite aos diversos antimicrobianos comerciais.

Neste estudo, a concentração média de gordura aumentou imediatamente após a infecção. Ma *et al.* (2003); Ogola *et al.*, (2007) também observaram aumento de ácidos graxos durante os processos infecciosos da mastite. O aumento na concentração de ácidos graxos afeta negativamente as características sensoriais como sabor, odor e cor (Park *et al.* 2007), além de afetar outras propriedades tecnológicas, tais como a estabilidade durante a armazenagem (Slacanac *et al.*, 2010).

O aumento do percentual de gordura no grupo tratado com a pomada de *H. martiana* (G1) e seu respectivo controle (G2) pode estar relacionado com a redução da produção leiteira também observada nestes dois grupos. Este achado concorda com os achados de Leitner *et al.* (2003). Estes realizaram estudos sobre a mastite subclínica em ovinos, e observaram que a percentagem de gordura era mais baixa em glândulas não infectadas do que nas infectadas, atribuindo esta alteração à redução no volume de leite.

Para o percentual de lactose, não foram observadas variações ao longo dos momentos experimentais. Quando comparou-se os grupos, teve-se maior percentual de lactose em G3, contudo, esta diferença foi observada em apenas um momento experimental. Alguns estudos demonstraram a redução dos teores de lactose após a mastite infecciosa (Mungatana *et al.*, 2011; Bruckmaier *et al.*, 2004), devido a injúria no tecido mamário. Este é um resultado indesejável devido aos benefícios da lactose à saúde humana (Kunz *et al.* 2000). De modo geral, a lactose é considerada um dos nutrientes mais estáveis na composição química do leite, estando diretamente relacionada à regulação da pressão osmótica, de modo que, maior produção de lactose, determina maior produção de leite (Queiroga *et al.*, 2007).

Com relação aos dados do controle leiteiro, não foram observadas alterações entre os grupos experimentais. Por outro lado, observou-se um decréscimo na produção de leite oriunda dos animais que formaram os grupos G1 e G2 (tratados com a pomada de *H. martiana* e controle, respectivamente), sendo este um achado comum durante o curso das infecções intramamárias, em decorrência das alterações na fisiologia da glândula mamária, resultando, por conseguinte, na diminuição na produção de leite e modificações na composição do leite (Mungatana *et al.*, 2011). Contudo, tendo em vista que não houve variação da produção de

leite entre os quatro grupos, a redução da produção em G1 e G2 ao longo dos momentos experimentais pode estar relacionada ao fator animal.

CONCLUSÕES

Os trabalhos acerca das alterações que ocorrem na composição do leite de cabras fornecem informações importantes sobre o processo infeccioso da mastite e podem revelar-se bons bioindicadores da doença. Observou-se aumento das concentrações de gordura, proteína e sólidos totais após a infecção experimental, mantendo-se constante antes, durante e após a terapia. A ausência de diferenças para os percentuais dos principais constituintes do leite entre os grupos experimentais (pomada a base de *H. martiana*, antimicrobiano comercial e controles) avaliados constitui um achado relevante, dada a quantidade de estudos conduzidos na área de produtos naturais. Este estudo demonstra a possibilidade do uso de terapias alternativas sem o comprometimento de parâmetros que são utilizados pela indústria de laticínios.

AGRADECIMENTOS

À FACEPE pela concessão da bolsa de pós-graduação e ao MCT-INSA/CNPq pelo auxílio financeiro na compra de materiais e equipamentos utilizados nesta Pesquisa, via projeto aprovado no edital MCT-INSA/CNPq/CT-Hidro/Ação Transversal N ° 35/2010.

REFERÊNCIAS

- AGANGA, A.A.; AMARTEIFIO, J.O.; NKILE, N. Effect of stage of lactation on nutrient composition of Tswana sheep and goat's milk. *J. Food Compos. Anal.*, v.15, p.533-543, 2002.
- BRUCKMAIER, R.M.; OHTSOUKA, E.; BLUM, C.E. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *Vet. Med. Czech*, v.8, p.283-290, 2004.
- CRUZ SILVA, M.E.G.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P. *et al.* HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). *J. Chem. Pharm. Res.*, v.4, n.2, p.1160-1166, 2012.
- DAS, M.; SINGH, M. Variation in blood leucocytes, somatic cell count, yield and composition of milk of crossbred goats. *Small Rumin. Res.*, v.35, n.2, p. 169-174, 2000.
- ERSKINE, R.J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F.J. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet. Clin. Food Anim.* v.19, p.109-138, 2003.
- FERNANDES, T.T.; SANTOS, A.T.F.; PIMENTA, F.C. Atividade antimicrobiana das plantas – *Plathymenia reticulate*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Rev. de Pat. Trop.*, v.34, n.2, p.113-122, 2005.

- GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, n.3, p.353-358, 2005.
- HAENLEIN, G. F. W. Status and prospects of the dairy goat industry in the United States. *J. Anim Sci*, v.74, n.2, p. 1173-118, 1996.
- HOLT, J.G. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
- IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. 2012. Disponível na Internet: <http://www.sidra.ibge.gov.br>, capturado em 24/03/2014, On line.
- KARZIS, J.; DONKIN, E.F.; PETZER, I.M. Intramammary antibiotics in dairy goats: effect of stage of lactation, parity and milk volume on withdrawal periods, and the effect of treatment on milk compositional quality. *Onderstepoort J. Vet. Res.* v.74, 243-249, 2007.
- KOOP, G.; VAN WERVEN, T.; SCHUILINH, H.J. *et al.* The effect of subclinical mastitis on milk yield in dairy goats. *J. Dairy Sci.*, v.93, p.5809-5817, 2010.
- KUNZ, C.; RUDLOFF, S.; BAIER, W. *et al.* Oligosaccharides in human milk: Structural, functional and metabolic aspects. *Ann. Rev. Nutr.*, v.20, p.699-722, 2000.
- LEITNER, G.; CHAFFER, M.; CARASO, Y. *et al.* Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition - fat, protein and lactose- in Israeli-Assaf and Awassi sheep. *Small Rum. Res.*, v.49, p.157-164, 2003.
- LEITNER, G; MERIN, U E SILANIKOVE, N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.1719-1726, 2004.
- MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D.M. *et al.* Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.*, v.83, p.264-274, 2003.
- MORGAN, F.; MASSOURAS, T.; BARBOSA, M. *et al.* Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Rumin. Res.*, v.47, n.1, p. 39-49, 2003.
- MUNGATANA, N.K.; NGURE, R.M.; SHITANDI, A. *et al.* Effect of experimental *Staphylococcus aureus* mastitis on compositional quality of goat milk. *Int. J. Dairy Technol.* v.64, n.3, 360-364, 2011.
- OGOLA, H.; SHITANDI, A.; NANUA, J. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *J. Vet. Sci.*, v.8, p.237-242, 2007.
- PARK, Y.W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M. *et al.* Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.*, v.68, p.88-113, 2007.
- PRASAD, H.; SENGAR, O. P. S. Milk yield and composition of the Barbari goat breed and its crosses with Jamunapari, Beetal and Black Bengal. *Small Rumin. Res.*, v.45, n. 1, p. 79-83, 2002.
- QUEIROGA, R.C.R.E.; COSTA, R.G.; BISCONTINI, T.M.B. *et al.* Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. *Rev. Bras. Zootec.*, v.36, p.430-437, 2007.

- SANTOS, R.A.; MENDONÇA, C.L.; AFONSO, J.A.B. *et al.* Aspectos clínicos e características do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, n.1, p.6-12, 2007.
- SCHUCH, L.F.D.; WIEST, J.M.; COIMBRA, H.S. *et al.* Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microorganismos relacionados à mastite bovina. *Ciênc. Ani. Bras.*, v.9, n.1, p.161-169, 2008.
- SHEARER, J.K.; HARRIS, J. Mastitis in dairy goats. *J. University of Florida*, v.120, p.13-17, 2003.
- SLACANAC, V.; BOZANIC', R.; HARDI, J. *et al.* Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *Int. J. Dairy Technol.*, v.63, p.171-189, 2010.
- SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. *et al.* Composition and bulk tank somatic cell counts of milk from dairy goat herds in Southeastern Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.46, n.1, p.19-24, 2009.
- SUNG, Y. Y.; WU, T. I.; WANG, P. H. Evaluation of milk quality of Alpine, Nubian, Saanen and Toggenburg breeds in Taiwan. *Small Rumin. Res.*, v.33, n.1, p.17-23, 1999.
- VILANOVA, M.S.; GONÇALVES, M.; OSÓRIO, M.T.M. *et al.* Aspectos sanitários do úbere e composição química do leite de cabras saanen. *Acta Sci. Vet.*, v.36, p.235-240, 2008.
- WINTER, P.; SCHILCHER F.; FUCHS K. *et al.* Dynamics of experimentally induced *Staphylococcus epidermidis* mastitis in East Friesean milk ewes. *J. Dairy Res.*, v.70, p.157-164, 2003.
- ZENG, S. S.; ESCOBAR, E. N. Effect of breed and milking method on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk. *Small Rumin. Res.*, v.19, n.2, p.169-175, 1996.

Artigo a ser submetido para Veterinary Microbiology

Tratamento da mastite caprina induzida experimentalmente por *Staphylococcus aureus* utilizando uma formulação contendo extrato de *Hymenaea martiana*

R. M. Peixoto ^a, M. M. Costa ^{b*}, J. R. G. S. Almeida^c

^a Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambuco, *Câmpus* Floresta, Rua Projetada, s/n, Caetano II, Floresta, PE 56400-000, Brazil.

^b Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Rod. BR 407, Km 12, Lote 543. Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n, Petrolina, PE 56300-000, Brazil.

^c Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56.304-205, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

Abstract

This study aimed to evaluate the *in vivo* potential of the therapy based on extract of *Hymenaea martiana* Hayne in the caprine mastitis experimentally induced with strains of *Staphylococcus aureus*. The phytochemical characterization of the plant extract was performed using HPLC-DAD. Ten female goats were used for experimental infection with a clinical strain of *S. aureus* in 20 mammary glands. Experimental infection was performed in 20 mammary glands, forming four groups, each consisting of five mammary glands. One group was treated with commercial antimicrobial and another with ointment the base of natural plant extract. The other groups were constituted controls. The diagnosis of mastitis was performed using the bacteriological culture, SCC, UFC/mL e CMT. The animals were monitored for nine experimental moments. Three milk samples were subjected to chromatography to survey constituents present in the ointment prepared with the plant extract. In the phytochemical screening of crude ethanol extract was observed the presence of phenolic compounds, flavonoids, steroids and terpenoids. In the results obtained by the HPLC was observed the presence of phenolic compounds in the chloroform and ethyl acetate. With respect to SCC and UFC/ml, the analysis of variance performed between experimental moments, there was a higher score at the first gathering held after infection (M1) in all experimental groups. After treatment with ointment containing the extract of *H. martiana* and commercial antimicrobial, these variables returned to values indicative of absence of intramammary infection by international standards for raw milk goat. In our study, the ointment prepared from the extract of the plant *H. martiana* (jatobá) showed the ability to reduce total bacterial counts in halves experimentally infected with *S. aureus*. The antibacterial activity may be related to the classes of secondary metabolites found.

Keywords: antibacterial activity, dairy goat, natural extract, therapy.

* Corresponding author. Tel.: +55 87 3986 3800, mateus.costa@univasf.edu.br

Resumo

Objetivou-se avaliar o potencial *in vivo* do extrato da *Hymenaea martiana* Hayne na terapia da mastite caprina induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. Fez-se a caracterização fitoquímica do extrato da planta utilizando a técnica HPLC-DAD. Foram utilizadas dez fêmeas caprinas, sendo realizada a infecção experimental com uma cepa clínica de *S. aureus* em 20 glândulas mamárias. Assim, foram formados quatro grupos experimentais, cada qual constituído por cinco glândulas mamárias. Dois grupos foram considerados controle e nos demais, procedeu-se o tratamento com fármaco comercial e em outro, utilizou-se o extrato de *H. martiana*. O diagnóstico da mastite foi realizado utilizando-se a cultura bacteriológica, CCS, UFC/mL e o CMT. Os animais foram monitorados durante nove momentos experimentais. Três amostras de leite foram submetidas à cromatografia para pesquisa de constituintes presentes na pomada preparada com o extrato da planta. Na triagem fitoquímica do extrato etanólico bruto foi observada a presença de substâncias fenólicas, flavonoides, esteroides e terpenoides. Nos resultados obtidos com o HPLC observou-se a presença de compostos fenólicos nas frações clorofórmica e acetato de etila. Com relação à CCS e UFC/mL, nas análises de variância realizadas entre os momentos experimentais, observou-se maior contagem logo na primeira coleta realizada após a infecção (M1), em todos os grupos experimentais. Após o tratamento com pomada contendo o extrato de *H. martiana* e o antimicrobiano comercial, estas variáveis retornaram para valores indicativos de ausência de infecção intramamária segundo padrões internacionais para o leite cru de cabra. Nas condições deste estudo, a pomada elaborada a partir do extrato etanólico da planta *H. martiana* (jatobá) apresentou a capacidade de reduzir as contagens bacterianas totais nas metades infectadas experimentalmente com *S. aureus*. A atividade antibacteriana pode estar relacionada às classes de metabólitos secundários encontradas.

Palavras-chave: atividade antibacteriana, cabras leiteiras, extrato natural, terapia.

1. Introdução

Ao longo do tempo a utilização da antibioticoterapia proporcionou o controle de inúmeras doenças bacterianas (Kümmerer, 2004). No entanto, as bactérias, conhecidas pela sua capacidade de adaptação, foram capazes de desenvolver uma série de mecanismos que permitiram torná-las resistentes aos antibióticos. Desta forma, a disseminação da resistência a antibióticos tornou-se inevitável, sendo considerada um sério problema de saúde pública (Levy, 2002).

Alguns pesquisadores têm voltado a atenção as terapias alternativas nas diversas áreas da saúde. Especificamente na Medicina Veterinária, estudos vêm demonstrando a atividade antibacteriana de extratos naturais de plantas e de alguns de seus compostos (Poppenga, 2002, Viegi et al., 2003; Cos et al., 2006; Schuch et al., 2008; Baskaran et al., 2009; Mubarack et

al., 2011) frente aos isolados obtidos de casos de mastite. Alguns criadores e veterinários têm utilizado os fitoterápicos, tanto para a prevenção como para tratamento da mastite. Observa-se uma predominância das práticas voltadas para o tratamento, com a utilização de soluções ou pomadas medicinais à base de ervas para uso local ou a administração de plantas verdes ou secas por via oral (Schuch et al., 2008).

Silva et al. (2004) observaram que em 37% das mastites subclínicas em caprinos leiteiros, o patógeno envolvido era o *Staphylococcus aureus*. Estes mesmos autores relataram a ocorrência de multirresistência em micro-organismos isolados destes pequenos ruminantes. Com relação ao tratamento das mastites, poucos fármacos são especificamente licenciadas para uso em pequenos ruminantes, particularmente em cabras. O uso de antibióticos ou outras drogas de bovinos em pequenos ruminantes constituem um alto risco, uma vez que a segurança e eficácia destes produtos para espécie caprina são desconhecidos (Mavrogianni et al., 2011).

Estudos *in vitro* visando determinar o potencial antimicrobiano de plantas pertencentes à flora brasileira têm demonstrado resultados satisfatórios (Fernandes et al., 2005; Gonçalves et al., 2005; Oliveira et al., 2007; Ushimaru et al., 2007), porém observa-se a descontinuidade destes estudos e uma fragmentação dos resultados, não permitindo muitos avanços na área.

A utilização de medicamentos fitoterápicos tem demonstrado resultados satisfatórios na terapia dos casos de mastite, porém os estudos são voltados em sua maioria para espécie bovina. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial *in vivo* do extrato de *Hymenaea martiana* Hayne na terapia da mastite caprina induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*.

2. Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Estudos Humanos e Animais (CEUA), da Universidade Federal do Vale do São Francisco, sob número de protocolo 0005/131211.

2.1. Obtenção do extrato etanólico de *Hymenaea martiana* Hayne

O material vegetal foi coletado no município de Petrolina-PE e identificado no Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD) da Universidade Federal do

Vale do São Francisco. Uma exsicata da planta (21868) foi depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF).

Após a secagem e pulverização, as cascas da planta foram submetidas à maceração exaustiva com etanol 95% em um recipiente de aço inoxidável. Foram feitas várias extrações num intervalo de 72 horas entre cada extração, até completo esgotamento do material vegetal. A solução extrativa obtida passou por um processo de destilação do solvente em evaporador rotativo à pressão reduzida a uma temperatura média de 50 °C. Após este processo de evaporação do solvente, obteve-se o extrato etanólico bruto (EEB). Uma pequena porção deste EEB foi particionada com solventes em gradiente crescente de polaridade (hexano, clorofórmio e acetato de etila) e as respectivas fases foram utilizadas para pesquisa dos principais compostos químicos.

2.2. Screening fitoquímico

Para a triagem fitoquímica do EEB foram realizadas análises por cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 com suporte de alumínio e fluorescência F254, em diferentes sistemas de solventes, seguindo a metodologia descrita por Wagner e Bladt (1996) para verificação de alcaloides, derivados antracênicos, cumarinas, flavonoides, taninos, lignanas, monoterpênicos, diterpênicos, naftoquinonas, triterpênicos e esteroides.

2.3. Análise por cromatografia líquida de alta performance com detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD)

A análise por HPLC-DAD foi realizada para identificar o perfil de compostos fenólicos das frações obtidas por partição. A análise dos compostos fenólicos foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu Prominence HPLC LC20AT, equipado com um detector de arranjo de diodos SPD20 e uma coluna de fase reversa (Luna – Phenomenex (250 mm x 4.6 mm, 5 µm). Para análise, a fase móvel foi água:ácido fórmico (99:1, solvente A) e metanol (solvente B). A condição cromatográfica foi: 0-15 min 20% B, 15-20 min 30% B, 20-30 min 40% B, 30-40 min 40% B, com o fluxo de 1.0 mL/min com temperatura de 35 °C. A injeção de volume foi de 10 µL e para monitoramento foi utilizado o comprimento de onda de 290 nm.

2.4. Animais e infecção experimental com *S. aureus*

Foram utilizadas 10 fêmeas caprinas da raça Saanen, com faixa etária variando entre 1,5 e 4 anos, entre primeira e segunda lactação. No total, fez-se a infecção experimental em 20 metades mamárias. Antes da inoculação foram estabelecidas características bacteriológicas e celulares do leite. Os animais foram negativos em três lactoculturas consecutivas, sendo adotado um intervalo de sete dias entre estas coletas realizadas na fase pré-infecção.

As fêmeas eram ordenhadas manualmente, seguindo normas de controle higiênico-sanitário nas ordenhas. Após obter os índices das variáveis do momento inicial, as duas metades mamárias de cada fêmea foram infectadas, utilizando a via intramamária, por meio de uma sonda uretral nº 4 acoplada a uma seringa plástica estéril. Antes da inoculação, fez-se ordenha completa e antissepsia em ambos os tetos com álcool 70° GL. Após a inoculação (1 mL) na parte proximal da cisterna foi realizada massagem com movimentos ascendentes para o inóculo se distribuir na glândula mamária. Utilizou-se uma cepa de *Staphylococcus aureus*, numa dose infectante de $1,2 \times 10^8$ UFC/mL. Esta cepa de campo foi oriunda de um caso de mastite subclínica em cabra. A amostra utilizada na infecção dos animais teve seu DNA extraído, sendo submetida ao sequenciamento de DNA utilizando Kit ABI PRISM® Big Dye terminator v. 3.1 cycle sequencing da Applied e corrida em um sequenciador automático ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems). A análise de alinhamento do sequenciamento da cepa utilizada na infecção dos animais confirmou a espécie como sendo *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*.

Foram estabelecidos os seguintes momentos experimentais: M0 - anterior à infecção (0h); M1 - 24 horas pós infecção; M2 - 48 horas pós infecção; M3 - 72 horas pós infecção/início do tratamento; M4 - 06 dias pós infecção/03 dias após início do tratamento; M5 - 09 dias pós infecção/final do tratamento; M6 - 12 dias pós infecção/03 dias após final do tratamento; M7 - 25 dias pós infecção/16 dias após o final do tratamento; M8 - 32 dias pós infecção/23 dias após o final do tratamento; M9 - 41 dias pós infecção/32 dias após o final do tratamento.

Os animais foram acompanhados diariamente, mediante avaliação clínica (temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória e dinâmica ruminal).

2.5. Preparação da pomada intramamária

Avaliou-se a compatibilidade do extrato com as bases creme e pomada, sendo observado melhor resultado com a base de pomada. Esta base foi observada como sendo o veículo de algumas formulações comerciais de drogas intramamárias.

Foram utilizadas estratégias farmacotécnicas objetivando melhor incorporação do extrato na base pomada de vaselina/lanolina. Uma destas estratégias foi a utilização do propilenoglicol como co-solvente, para posterior incorporação na base pomada (veículo). Em seguida, procedeu-se com a incorporação gradativa do extrato etanólico bruto de *H. martiana*.

Para garantir uniformidade na formulação e permitir a retirada de resíduos, fez-se o processo de tamização. O pH da formulação apresentou-se na faixa de 5,0 – 6,0.

Fórmula:

Componentes	Quantidade (g)
Extrato etanólico bruto de <i>H. martiana</i> (jatobá)	2,5
Lanolina	15,0
Vaselina sólida q.s.p.	50,0

2.6. Diagnóstico da mastite

A cultura bacteriológica foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo National Mastitis Council (1999). Para detecção da mastite subclínica foi utilizado o California Mastitis Test (CMT) de acordo com as descrições de Schalm & Noorlander (1957). Os resultados do CMT foram classificados em escores (negativo, traço, 1+ e 2+). Para a determinação da CCS, as amostras de leite foram coletadas após a eliminação dos três primeiros jatos de leite em frascos contendo pastilhas de bronopol para contagem de células somáticas (CCS), utilizando medidor de fluorescência por citometria de fluxo – SomaScope MKII, fabricado pela Delta Instruments.

Foi realizada a contagem bacteriana total em equipamento automático que utiliza citometria de fluxo para contagem de bactérias no leite cru – Bactocount IBC, fabricado pela

Bentley Instruments®, sendo o resultado em UFC/mL. Estas análises foram realizadas no laboratório oficial de qualidade do leite, localizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

2.7. Protocolo terapêutico

O tratamento foi instituído 36 horas após a infecção. No grupo experimental tratado com a pomada de *H. martiana* (G1), utilizou-se uma dose de 5 mL/animal/dia, via intramamária, durante seis dias consecutivos, após a ordenha realizada no horário da manhã. A metade esquerda do mesmo animal (G2) foi considerada controle e recebeu 5 mL de solução fisiológica (0,9% NaCl). O grupo tratado com o antimicrobiano comercial (G3), recebeu a aplicação de uma droga intramamária à base de gentamicina, na mesma dose e por igual período (seis dias). A metade esquerda de cada animal pertencente a este grupo foi considerada controle (G4) e também recebeu a solução fisiológica

2.8. Pesquisa de resíduos no leite

Três amostras de leite foram submetidas à cromatografia (CLAE-DAD descrito no item 2.3) para pesquisa de constituintes presentes na pomada preparada com o extrato da planta. As amostras foram identificadas como: 1 - leite proveniente de metade mamária que não foi tratada com a pomada (controle); 2 - leite proveniente de animal tratado com a pomada (5.º dia de tratamento); 3 - leite proveniente de metade mamária tratada com a pomada (30.º dia após o término do tratamento). Os cartuchos foram previamente condicionados pela adição sucessiva de 10 mL de metanol e 10 mL de água. As amostras de leite (n.º 1, 2 e 3), com 105,0, 140,8 e 25,7 mg, respectivamente) e o extrato etanólico de jatobá 15,0 mg, foram solubilizados em 600 µL de H₂O (pH = 2 com HCl) e 400 µL de metanol. Um (01) mL da solução foi adicionada ao cartucho de SPE, em seguida a fase sólida foi eluída com 5 mL de água, que foi desprezado. Os analitos retidos foram eluídos com 10 mL de metanol que foi evaporado em rotavapor, obtendo-se 1,0 mg (amostra leite 1), 1,2 mg (amostra leite 2), 1,0 mg (amostra leite 3) e 4,7 mg (extrato jatobá). Foram preparadas soluções de 12 mg/mL para as amostras de leite e de 0,5 mg/mL do extrato de jatobá em metanol:H₂O 1% ácido fórmico (80:20), para serem injetadas em CLAE-DAD.

O gradiente de eluição da análise por CLAE-DAD foi realizado utilizando como fase móvel solução aquosa 1% ácido fórmico (Solvente A) e metanol (Solvente B) a um fluxo de 1 mL/min. A separação cromatográfica foi realizada com o seguinte gradiente: 0.0 – 15.0 min, 30 - 40% B; 15.0 – 30.0 min, 40 – 60% B; 30.0 min, 60% B. A coluna foi mantida a 35 °C. A análise foi monitorada em 290 nm.

2.9. Análise estatística dos dados

Os valores obtidos para CCS foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 (log10) para análise estatística, e a função antilogarítmica para apresentação dos resultados. A ausência de normalidade dos dados foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores obtidos para CCS, UFC e CMT foram comparados entre os momentos experimentais pela análise de variância de Friedman, e entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, usando o teste de Dunn para comparação dos postos. Os resultados da cultura bacteriológica foram analisados entre os momentos experimentais pelo teste Q de Cochran e para comparação entre os grupos usou-se o teste Exato de Fisher. Para análise dos dados, foi utilizado o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20.0 para Windows.

3. Resultados

Na triagem fitoquímica do EEB foi observada a presença de substâncias fenólicas, flavonoides, esteroides e terpenoides (Tabela 1). Os resultados obtidos no HPLC demonstraram a presença de compostos fenólicos no EEB e nas frações CHCl₃ e AcOEt (Figuras 1, 2 e 3).

Durante a fase de monitoramento dos animais no período pós infecção, não foram observadas alterações nos parâmetros clínicos. Após a infecção experimental com *S. aureus*, observou-se positividade das amostras de leite em ao menos uma ferramenta diagnóstica utilizada. De modo geral, observou-se ampla variação na frequência de recuperação do patógeno após a infecção nos diferentes momentos e grupos experimentais, sendo observado um percentual de positividade acumulada ao final de três primeiros dias de coleta igual a 100,0 e 60,0% para os grupos tratados com jatobá e controle, respectivamente, e 80,0 e 60,0%

para os grupos tratados com gentamicina e controle. Não foram observadas diferenças estatísticas para estes resultados pelo teste Exato de Fisher.

Com relação ao número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), nas análises de variância realizadas entre os momentos experimentais, observou-se maior contagem logo na primeira coleta realizada após a infecção (M1), em todos os grupos experimentais, sendo observada uma diferença significativa entre o M0 e o sexto dia pós infecção (M4) ($p \leq 0,05$). Embora sem diferença estatística, nos momentos seguintes a infecção, observou-se uma tendência de aumento da quantidade de UFC/mL (Tabela 2). Na comparação realizada entre os grupos, considerando o momento quatro (06 dias pós infecção/03 dias após início do tratamento), observou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o grupo tratado com a pomada (G1) daquele tratado com o antimicrobiano comercial, com contagens iguais a $70,76 \times 10^5$ e $11,00 \times 10^5$, respectivamente. Contudo, não foram observadas variações entre os grupos nos demais momentos experimentais.

Para a CCS, nas análises de variância realizadas entre os momentos experimentais, no grupo tratado com a pomada contendo o extrato de *H. martiana* (G1), observou-se maior contagem logo na primeira coleta realizada após a infecção (M1), sendo observada uma diferença significativa entre o M0 e o nono dia pós infecção (M5) ($p \leq 0,05$). Embora sem diferença estatística, nos momentos seguintes a infecção, observou-se uma tendência de aumento das contagens de células somáticas em todos os grupos (Tabela 3). Na comparação realizada entre os grupos, no momento quatro (06 dias pós infecção/03 dias após início do tratamento), observou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o grupo tratado com a pomada (G1) daquele tratado com o antimicrobiano comercial no momento, com contagens iguais a $67,61 \times 10^5$ e $6,86 \times 10^5$. Contudo, não foram observadas entre os grupos ao longo dos demais momentos experimentais.

Para a variável CMT, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p \geq 0,05$) nas análises de variância realizadas entre momentos e grupos experimentais (Tabela 4).

Na pesquisa de compostos químicos provenientes do extrato no leite, a análise por CLAE-DAD evidenciou a presença das substâncias, contidas no extrato de *H. martiana*, na amostra de leite do animal tratado com a pomada contendo o extrato natural. Foi observada maior concentração das substâncias presentes no extrato quando comparou-se a amostra coletada no quinto dia após o início do tratamento, com aquela obtida no trigésimo dia após o término da terapia (Figura 4).

4. Discussão

Na triagem fitoquímica do EEB foi observada a presença de substâncias fenólicas, flavonoides, esteroides e terpenoides. Os produtos naturais derivados de bactérias, algas, plantas e animais são conhecidos por produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, sendo promissoras fontes dos novos agentes terapêuticos (Mishra e Tiwari, 2011). Entre estes metabólitos secundários estão os flavonoides, sendo estes encontrados em moderada concentração no extrato utilizado neste estudo.

Estudos fitoquímicos detectaram a presença de diterpenos na resina exsudada pelo tronco e em extratos da casca de *H. courbaril* (Nogueira et al., 2001). Os terpenos apresentam várias atividades biológicas, como proteção contra infecções e ataques de insetos (Robbers et al., 1997). Os resultados do HPLC-DAD indicaram a presença de três compostos na fração acetato de etila. Entre os vários métodos disponíveis para a análise de compostos fenólicos, o HPLC é o preferido para a separação e quantificação de compostos polifenólicos. Baseados nos espectros UV-Vis obtidos e seu tempo de retenção, os compostos apresentaram bandas UV típicos da presença de derivados de flavonoides. O flavonoide astilbina tem sido considerado o principal composto fenólico encontrado nessa espécie (Silva et al., 2012). Estudos mais específicos, com o isolamento e testes *in vivo*, devem ser realizados com o objetivo de comprovar a atividade antibacteriana destas substâncias observadas na técnica do HPLC.

Na cultura bacteriológica, observou-se que 55% (11/20) foram positivas na primeira cultura realizada após 24 horas da infecção. Três dias após o término do tratamento (M6), observou-se positividade na cultura bacteriológica em apenas uma unidade experimental tanto no grupo tratado com a pomada contendo extrato de *H. martiana* quanto no grupo tratado com o antimicrobiano comercial à base de gentamicina (G3). Estes resultados sugerem atividade biológica *in vivo* dos compostos presentes no extrato natural. O sinergismo dos compostos presentes em extratos naturais é um dos motivos que vêm motivando o interesse por pesquisas correlatas, embora, muitas delas permaneçam apenas nos ensaios pré-clínicos.

Quanto à contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), observou-se que em apenas um dos 10 momentos experimentais avaliados, teve-se uma maior contagem no grupo tratado com a pomada quanto comparado com o grupo tratado com o antimicrobiano comercial ($p \leq 0,05$). Nos demais momentos, as medianas obtidas não apresentaram diferenças estatísticas significativas. No 23º e 32º dia após o término do tratamento com a pomada de jatobá (G1), observou-se uma tendência para baixas contagens (UFC/mL), quando estes resultados foram comparados com o respectivo controle (G2). Para a variável CCS,

também foi observada a mesma tendência, ou seja, menores contagens de células foram obtidas para os dias (23 e 32^o) após a última aplicação da pomada. Estes resultados indicam atividade antibacteriana dos compostos presentes no extrato e que foram identificadas neste estudo, como sendo compostos fenólicos.

Analisando o 32.^o dia após o término do tratamento (M9), observou-se que as medianas do grupo tratado com a pomada ($15,0 \times 10^3$ UFC/mL), estavam bem abaixo daquelas encontradas no grupo controle ($766,0 \times 10^3$ UFC/mL). Os valores obtidos para o grupo tratado com a gentamicina (G3) apresentaram contagens iguais a $66,0 \times 10^3$ UFC/mL. No Brasil e na Europa o limite máximo para a contagem bacteriana total em leite cru é de 500×10^3 UFC/mL (Brasil, 2000; European Economic Community, 1992). Isto demonstra que o leite proveniente das metades mamárias tratadas com a pomada de jatobá e com o antimicrobiano comercial, estavam dentro dos padrões preconizados pela legislação no que concerne a inocuidade do produto à saúde pública.

Embora sem diferença estatística significativa, para as medianas obtidas para UFC e CCS, analisando o grupo tratado com a pomada contendo o extrato de *H. martiana*, observou-se elevação das contagens ao longo dos momentos, com redução a partir do nono dia após a infecção, correspondendo ao último dia de aplicação da pomada. O inverso foi observado no grupo controle. A mesma dinâmica ocorreu no grupo tratado com antibiótico. Isto pode indicar um processo de cura, uma vez que o prazo decorrido entre o fim do tratamento e a realização dos exames foi superior a três semanas, fase que pode demonstrar a persistência ou ausência da infecção após a instituição da terapia (Mavrogianni et al., 2011).

Em estudo recente, a utilização da concentração inibitória mínima de $256 \mu\text{g/mL}$ do extrato hidroalcoólico de uma planta do mesmo gênero (*H. stigonocarpa*) foi capaz de provocar alterações em várias estruturas celulares de *S. aureus*. As alterações nos componentes intracelulares, tais como ácidos nucleicos, proteínas, assim como a presença de múltiplos septos foram visualizados. Os resultados obtidos neste estudo indicam que as cascas da *H. stigonocarpa* têm flavonoides e taninos e estes compostos são, possivelmente, a razão para a atividade antimicrobiana contra os cocos Gram-positivos (Dimech et al., 2013). Estes autores afirmam que a *H. stigonocarpa* pode ser uma terapia alternativa relevante para doenças infecciosas causadas por micro-organismos resistentes a múltiplas drogas.

A mastite causada por *Staphylococcus aureus* é de difícil eliminação, e a presença de animais positivos para este patógeno representa uma séria ameaça aos demais animais do rebanho (Sears e McCarthy, 2003). O sucesso do tratamento depende de vários fatores, entre estes, a escolha do composto antimicrobiano, a suscetibilidade da cepa, duração do tratamento

e otimização da dose da droga, e o estado imunológico do animal (Erskine et al., 1993). Como a terapia durante o período seco é bem sucedida em 40 a 70 % dos casos. Este é considerado o melhor período para tratamento (Nickerson, 1993). Assim, novas pesquisas realizadas em período seco deverão ser feitas, visando comprovar o potencial antibacteriano do extrato de *H. martiana*.

Para a variável CMT, apesar da ausência de diferença estatística, observou-se que durante o período de tratamento com a pomada (G1), quatro metades mamárias apresentaram-se reagentes no CMT, com reação 2+. No terceiro dia após o tratamento apenas duas unidades amostrais apresentaram reações 2+. No 23 e 32º dia após tratamento nenhuma metade mamária apresentou reações 2+. Nestes mesmos dias, no grupo controle (G2), apenas uma unidade experimental apresentou reação 2+. O aumento gradativo na celularidade de acordo com o aumento no score do CMT é um resultado esperado, devido à utilização de princípios similares para detecção de células, ou seja, detecção de células somáticas (Contreras et al., 1996).

Diversos estudos de pesquisa têm demonstrado a presença de atividade antibacteriana *in vitro* para preparações obtidas de plantas do gênero *Hymenaea* (Marsaioli, 1975; Nogueira et al., 2001; Novais et al., 2003; Fernandes et al., 2005; Gonçalves et al., 2005; Dimech et al., 2013). No entanto, testes *in vivo* como este que foi realizado não estão descritos na literatura. Estes testes são fundamentais para comprovação das evidências obtidas em condições de laboratório, onde diversas variáveis são controladas. Os estudos envolvendo animais constituem uma etapa importante para elucidação de algumas perguntas relacionadas à atividade antibacteriana dos extratos naturais. Este estudo serve como ponto de partida para outras pesquisas que visam a utilização de produtos naturais na terapia da mastite. Marinho et al. (2007), investigaram a utilização de plantas medicinais na veterinária, sendo observado que todos os entrevistados não só utilizavam plantas medicinais na terapêutica dos animais domésticos, como também aceitariam esta forma de tratamento como prescrição do Médico Veterinário.

Observou-se uma menor concentração das substâncias presentes no extrato de jatobá nas amostras de leite decorridos 30 dias do final do tratamento. Isto demonstra a capacidade de eliminação das substâncias. Baseados nos espectros UV-Vis obtidos e seu tempo de retenção, os compostos apresentaram bandas UV típicos da presença de derivados dos flavonoides. Tem sido sugerido que, como flavonoides são amplamente distribuídos em plantas comestíveis e bebidas e foram anteriormente utilizados na medicina tradicional, estes apresentam o mínimo de toxicidade (Cushnie e Lamb, 2005).

O antibiótico comercial utilizado neste trabalho apresenta um período de carência de 96 horas para ingestão ou comercialização do leite (Mastifin[®]). A ocorrência de resíduos de antibióticos nos alimentos tem se tornado uma grande preocupação para consumidores, indústria e produtores. Os efeitos negativos dos resíduos foram inicialmente identificados pela indústria de laticínios e têm representando um perigo a saúde pública. Estes são encontrados no leite em concentrações muito baixas, geralmente sendo medidos em ppb (partes por bilhão).

Os limites legais permitidos para resíduos no leite estão definidos em cada país, sendo que no caso de não haver ainda estes limites estabelecidos, usa-se como referência os limites internacionalmente aceitos pelo *Codex Alimentarius*. Dessa forma, estudos ainda deverão ser conduzidos para quantificação das substâncias presentes no leite e prazo para completa eliminação, tendo em vista a importância das informações quantitativas.

A resistência a antibióticos é um problema mundial e existe uma necessidade urgente de desenvolver novos agentes terapêuticos. Os flavonoides são uma família de compostos derivados de plantas com atividades potencialmente exploráveis, incluindo atividade direta antibacteriana, sinergismo com antibióticos, e supressão de virulência bacteriana. Estudos *in vivo* têm demonstrado a capacidade dos flavonoides em interferir no processo de patogênese do *S. aureus* (Cushnie e Lamb, 2011).

A avaliação dos mecanismos envolvidos na atividade antibacteriana ainda precisa ser esclarecida para a o extrato utilizado neste estudo. Para Otto (2004), as pesquisas envolvendo os sistemas de *quorum - sensing* podem, em princípio, constituir uma forma relevante para descoberta de potenciais antimicrobianos. Contudo, esta abordagem exige uma investigação cuidadosa para cada patógeno e infecção específica.

Testes de toxicidade aguda realizados com extrato de *H. stigonocarpa* não demonstraram nenhuma alteração em animais de laboratório (Orsi et al., 2012). Vale et al. (2013) também realizaram testes de toxicidade com a seiva de uma planta pertencente ao gênero *Hymenaea*, não sendo observada atividade citotóxica em células de camundongos. Pesquisas ainda devem ser conduzidas com o objetivo de elucidar a ação do extrato nas células do tecido mamário.

5. Conclusões

Nas condições deste estudo, a pomada elaborada a partir do extrato etanólico da planta *H. martiana* (jatobá) apresentou a capacidade de reduzir as contagens bacterianas totais nas metades infectadas experimentalmente com *S. aureus*. A atividade antibacteriana pode estar relacionada às classes de metabólitos secundários encontrados. Tendo em vista as vantagens dos protocolos terapêuticos com extratos naturais e a obtenção de resultados similares à antibioticoterapia convencional, outros estudos devem ser conduzidos no sentido de avaliar outras concentrações do extrato e outros momentos de tratamento, principalmente no período seco.

Agradecimentos: à FACEPE pela concessão da bolsa de pós-graduação (R.M. Peixoto) e ao MCT/INSA/CNPq pelo auxílio financeiro para compra de materiais e equipamentos.

Referências

- Baskaran, S.N., Kazmer, G.W., Hinckley, L., Andrew, S.M., Venkitanarayanan, K., 2009. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 92, 1423–1429.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n.º 37 de 31 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra (Diário Oficial da República Federativa do Brasil), Brasília. Publicado em 08/11/2000. Seção 01, p.23. Acesso em 24 de abril de 2014.
- Contreras, A., Sierra, D., Corrales, J.C., Sanchez, A., Marco, J. 1996. Physiological threshold of somatic cell count and California Mastitis Test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. *Small Rumin Res.* 21, 259-264.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* ‘proof-of-concept’. *J. Ethnopharmacol.* 106, 290-302.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* 38, 99-107.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* 27, 343-356.
- Dimech, G.S., Soares, L.A.L., Ferreira, M.A., Oliveira, A.G.V., Carvalho, M.C., Ximenes, E.A. 2013. Phytochemical and Antibacterial Investigations of the Extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. *Scientific World Journal.* 2013, 1-8.

- Erskine, R.J., Kirk, J.H., Tyler, J.W., DeGraves, F.J. 1993. Advances in the therapy of mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 9, 499–526.
- Fernandes, T.T., Santos, A.T.F., Pimenta, F.C., 2005. Atividade antimicrobiana das plantas - *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. Antimicrobial activity of plants - *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia* (in Portuguese) *Rev Patol Trop.* 34, 113-122.
- Gonçalves, A.L., Alves Filho, A., Menezes, H., 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Comparative study antimicrobial activity of some native tree extracts. (in Portuguese, with English abstract) *Arq Inst Biol.* 72, 353-358.
- Kümmerer, K. 2004. Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemotherapy* 54, 311-320.
- Levy, S.B. 2002. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemotherapy* 49, 25-30.
- Marinho, M.L., Alves, M.S., Rodrigues, M.L.C., Rotondano, T.E.F., Vidal, I.F., Silva, W.W., Athayde, A.C.R., 2007. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. The use of medicinal plants in veterinary medicine: rescuing the popular knowledge. (in Portuguese, with English abstract). *Rev. Bras. Pl. Med.* 9, 64-69.
- Marsaioli, A.J. 1975. Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry.* 14, 1882-1883.
- Mavrogianni, V.S., Menzies, P.I., Fragkou, I.A., Fthenakis, G.C. 2011. Principles of Mastitis Treatment in Sheep and Goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 27,115–120.
- Mishra, B.B., Tiwari, V.K. 2011 Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem.* 46, 4769–4807.
- Mubarack, H.M., Doss, A., Dhanabalan, R., Venkataswamy, R. 2011. Activity of some selected medicinal plant extracts against bovine mastitis pathogens. *J Anim Vet Adv.* 10, 738-741.
- National mastitis council: 1999, (US). Laboratory handbook on bovine mastitis. Arlington, VA: WD Hoard & Sons, 222p.
- Nickerson, S.C. 1993. Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis infections. *Vet Med.* 33, 368–373.
- Nogueira R.T., Shepherd G.J., Laverde Júnior A., Marsaioli A.J. & Iamamura P.M. 2001. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *Phytochemistry.* 58:1153-1157.
- Novais, T.S., Costa, J.F.O., David, J.P.L., David, J.M., Queiroz, L.P., França, F., Giulietti, A.M., Soares, M.B.P., Santos, R.R., 2003. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. Antibacterial activity in some vegetable extracts semiarid Brazilian (in Portuguese, with English abstract) *Rev Bras Farmacogn.* 14,5-8.

- Oliveira, D.F., Pereira, A.C., Figueiredo, H.C.P., Carvalho, D.A., Silva, G., Nunes, A.S., Alves, D.S., Carvalho, H.W.P. 2007. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. *Fitoterapia*. 78, 142-145.
- Orsi, P.R.; Bonamin F.; Severi J.A.; Santos R.C.; Vilegas W.; Hiruma-Lima C.A.; Di Stasi L.C. 2012. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: a Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. *J Ethnopharmacol*. 143, 81-90.
- Otto M. 2004. Quorum-sensing control in Staphylococci -- a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiol Lett*. 241, 135-141.
- Poppenga, R.H. 2002. Herbal Medicine: Potential for Intoxication and Interactions With Conventional Drugs. *Clin Tech Small Anim Pract*. 17, 6-18.
- Schalm, O.W., Noorlander, D.O. 1957. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *J Am Vet Med Assoc*. 130, 199-207.
- Schuch, L.F.D., Wiest, J.M., Coimbra, H.S., Prestes, L.S., Toni, L., Lemos, J.S. 2008. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microorganismos relacionados à mastite bovina. Antibacterial activity kinetics of medicinal plants extracts against bovine mastitis pathogens. (in Portuguese, with English abstract) *Ciênc Anim Bras*. 9, 161-169.
- Sears, P.M., McCarthy, K.K. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 19, 171-185.
- Silva, E.R., Siqueira, A.P., Martins, J.C.D., Ferreira, W.P.B., Silva N. 2004. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. *Small Rumin Res*. 55, 45-49.
- Silva, M.E.G.S., Guimarães, A.L., Oliveira, A.P., Araújo, C.S., Siqueira Filho, J.A., Fontana, A.P., Damasceno, P.K.F., Branco, C.R.C., Branco, A., Almeida, J.R.G.S. 2012. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). *J. Chem. Pharm. Res*. 4, 1160-1166.
- Ushimaru, P.I., Silva, M.T.N., Di Stasi, L.C., Barbosa, L., Fernandes Junior, A. 2007. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. *Braz J Microbiol*. 38, 717-719.
- Vale, C.R., Silva, C.R., Oliveira, C.M., Silva, A.L., Carvalho, S., Chen-Chen, L. 2013. Assessment of toxic, genotoxic, antigenotoxic, and recombinogenic activities of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice. *Genet Mol Res*. 12, 2712-2724.
- Viegi, L., Pieroni, A., Guarrera, P.M., Vangelisti, R. 2003. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *J Ethnopharmacol*. 89, 221-244.
- Wagner, H., Bladt, S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2nd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 384p.

Legendas

Tabela 1. Triagem fitoquímica do EEB de *H. martiana*

Tabela 2. Mediana de cinco repetições para a UFC ($\times 10^3$) avaliada em cabras infectadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*

Tabela 3. Mediana de cinco repetições para a CCS ($\times 10^3$) avaliada em cabras infectadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*

Tabela 4. Estatística descritiva dos resultados do CMT obtidos após infecção experimental de cabras leiteiras com *Staphylococcus aureus*

Figura 1 – HPLC-DAD de compostos fenólicos da fração CHCl_3 em 290 nm.

Figura 2 – HPLC-DAD de compostos fenólicos da fração AcOEt em 290 nm.

Figura 3 – Espectro UV de três componentes presente na fração de AcOEt.

Figura 4 - Cromatogramas e espectros UV das amostras de leite e do extrato.

Tabela 1. Triagem fitoquímica do EEB de *H. martiana*

Classes de Metabólitos	EEB
Alcaloides	-
Cumarinas	-
Derivados Antracênicos	+++
Flavonoides	++
Lignanas	+
Mono e diterpenos	+
Naftoquinonas	+++
Saponinas	-
Triterpenos/Esteroides	+

EEB - extrato etanólico bruto, +++ Forte presença, ++ Moderada presença, + Fraca presença, - Ausência.

Tabela 2. Mediana de cinco repetições para a UFC ($\times 10^3$) avaliada em cabras infectadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
G1	6 ^{Aa}	2478 ^{Aab}	4107 ^{Aab}	5339 ^{Aab}	7076 ^{Ab}	3594 ^{Aab}	653 ^{Aab}	31 ^{Aab}	37 ^{Aab}	15 ^{Aab}
G2	6 ^{Aa}	547 ^{Aa}	130 ^{Aa}	14 ^{Aa}	2051 ^{ABa}	36 ^{Aa}	592 ^{Aa}	49 ^{Aa}	337 ^{Aa}	766 ^{Aa}
G3	2 ^{Aa}	13 ^{Aa}	5192 ^{Aa}	1541 ^{Aa}	11 ^{Ba}	32 ^{Aa}	9 ^{Aa}	10 ^{Aa}	170 ^{Aa}	66 ^{Aa}
G4	4 ^{Aa}	249 ^{Aa}	504 ^{Aa}	200 ^{Aa}	1158 ^{ABa}	13 ^{Aa}	9 ^{Aa}	12 ^{Aa}	84 ^{Aa}	14 ^{Aa}

G1: metades mamárias tratadas com extrato de *H. martiana*; G2: metades mamárias não tratadas; G3: metades mamárias tratadas com antibiótico comercial à base de gentamicina; G4: metades mamárias não tratadas;

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

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

M0 - anterior à infecção (0h); M1 - 24 horas pós infecção; M2 - 48 horas pós infecção; M3 - 72 horas pós infecção/início do tratamento; M4 - 06 dias pós infecção/03 dias após início do tratamento; M5 - 09 dias pós infecção/final do tratamento; M6 - 12 dias pós infecção/03 dias após final do tratamento; M7 - 25 dias pós infecção/16 dias após o final do tratamento; M8 - 32 dias pós infecção/23 dias após o final do tratamento; M9 - 41 dias pós infecção/32 dias após o final do tratamento.

Tabela 3. Mediana de cinco repetições para a CCS ($\times 10^3$) avaliada em cabras infectadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
G1	60 ^{Aa}	3311 ^{Aab}	6060 ^{Ab}	6588 ^{Aab}	6761 ^{Bab}	3727 ^{Ab}	1129 ^{Bab}	926 ^{Aab}	269 ^{Aab}	276 ^{Aab}
G2	59 ^{Aa}	729 ^{Aa}	1252 ^{Aa}	1081 ^{Aa}	1918 ^{ABa}	563 ^{Aa}	1104 ^{ABa}	662 ^{Aa}	934 ^{Aa}	911 ^{Aa}
G3	76 ^{Aa}	260 ^{Aa}	6000 ^{Aa}	2985 ^{Aa}	686 ^{Aa}	726 ^{Aa}	346 ^{ABa}	267 ^{Aa}	494 ^{Aa}	512 ^{Aa}
G4	68 ^{Aa}	464 ^{Aab}	2604 ^{Aab}	1929 ^{Ab}	1898 ^{ABb}	437 ^{Aab}	147 ^{Aab}	141 ^{Aab}	379 ^{Aab}	173 ^{Aab}

G1: metades mamárias tratadas com extrato de *H. martiana*; G2: metades mamárias não tratadas; G3: metades mamárias tratadas com antibiótico comercial à base de gentamicina; G4: metades mamárias não tratadas;

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

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

M0 - anterior à infecção (0h); M1 - 24 horas pós infecção; M2 - 48 horas pós infecção; M3 - 72 horas pós infecção/início do tratamento; M4 - 06 dias pós infecção/03 dias após início do tratamento; M5 - 09 dias pós infecção/final do tratamento; M6 - 12 dias pós infecção/03 dias após final do tratamento; M7 - 25 dias pós infecção/16 dias após o final do tratamento; M8 - 32 dias pós infecção/23 dias após o final do tratamento; M9 - 41 dias pós infecção/32 dias após o final do tratamento.

Tabela 4. Estatística descritiva dos resultados do CMT obtidos após infecção experimental de cabras leiteiras com *Staphylococcus aureus*

		Número (n) de amostras reagentes									
		M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
G1	T	0	1	0	1	0	0	2	3	1	3
	≥ 1+	0	3	3	2	1	1	1	0	2	1
	≥ 2+	0	1	2	2	4	4	2	1	0	0
G2	T	0	2	1	3	2	2	3	2	0	4
	≥ 1+	0	3	2	1	3	1	1	2	3	0
	≥ 2+	0	0	2	1	1	2	1	0	0	1
G3	T	0	4	2	1	0	1	5	2	4	5
	≥ 1+	0	0	2	3	2	4	0	0	0	0
	≥ 2+	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
G4	T	0	3	3	2	0	1	5	3	4	5
	≥ 1+	0	0	1	3	4	0	0	0	0	0
	≥ 2+	0	2	1	0	1	1	0	0	0	0

G1: metades mamárias tratadas com extrato de *H. martiana*; G2: metades mamárias não tratadas; G3: metades mamárias tratadas com antibiótico comercial à base de gentamicina; G4: metades mamárias não tratadas; T – Traços no CMT

M0 - anterior à infecção (0h); M1 - 24 horas pós infecção; M2 - 48 horas pós infecção; M3 - 72 horas pós infecção/início do tratamento; M4 - 06 dias pós infecção/03 dias após início do tratamento; M5 - 09 dias pós infecção/final do tratamento; M6 - 12 dias pós infecção/03 dias após final do tratamento; M7 - 25 dias pós infecção/16 dias após o final do tratamento; M8 - 32 dias pós infecção/23 dias após o final do tratamento; M9 - 41 dias pós infecção/32 dias após o final do tratamento.

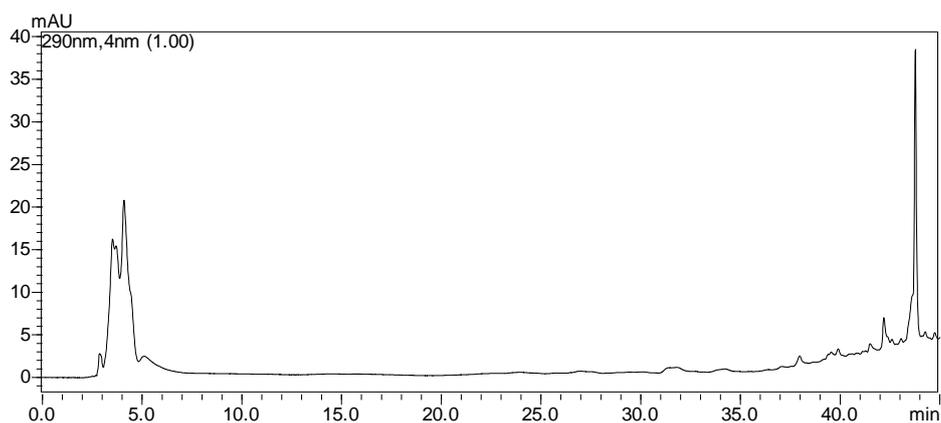


Figura 1 – HPLC-DAD de compostos fenólicos da fração CHCl_3 em 290 nm.

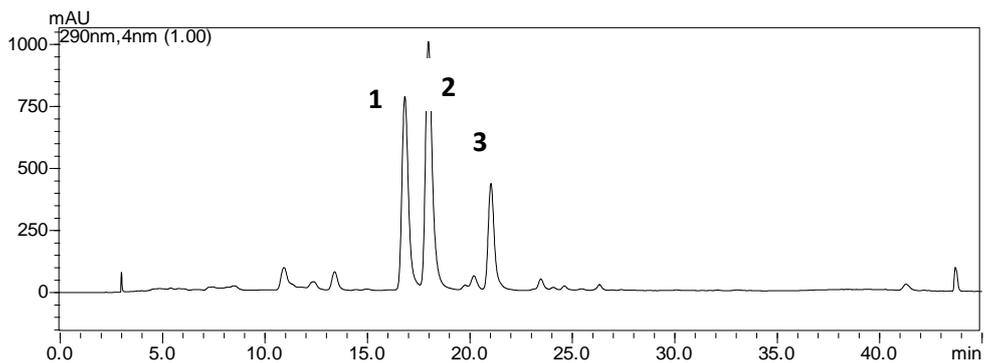


Figura 2 – HPLC-DAD de compostos fenólicos da fração AcOEt em 290 nm.

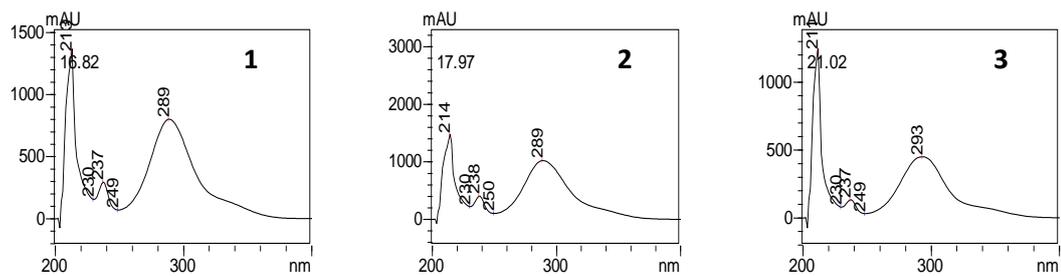


Figura 3 – Espectro UV de três componentes presente na fração AcOEt.

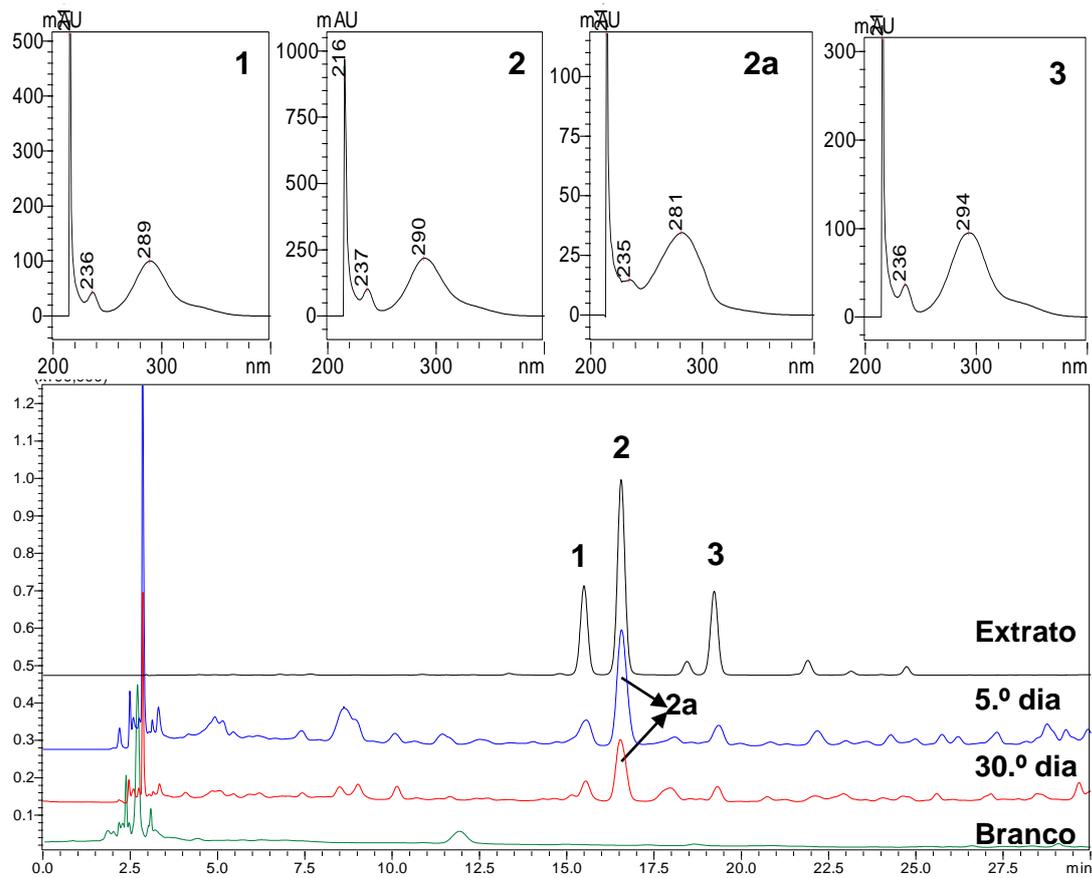


Figura 4 - Cromatogramas e espectros UV das amostras de leite e do extrato.

5. Conclusões

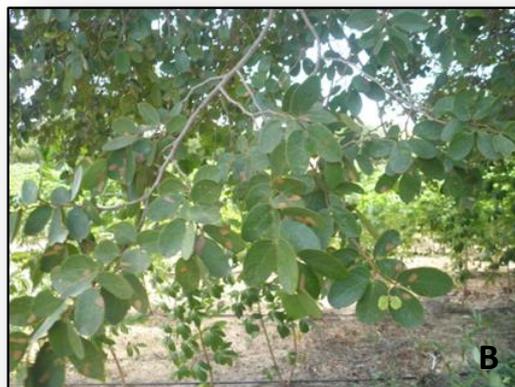
A baixa frequência dos genes envolvidos na produção de biofilme demonstra que os mecanismos para produção desta matriz são bastante complexos, sendo fundamental a continuidade dos estudos na referida área molecular. Entre os isolados avaliados neste estudo, observou-se ampla produção de biofilme, sendo relevante o resultado que demonstra redução na produção desta matriz extracelular quando o isolado estava em contato com o extrato de *H. martiana*.

Neste estudo, foi possível demonstrar que a utilização de pontos de corte elevados, tais como considerar apenas as reações 2+ no CMT ou contagens superiores a $1,0 \times 10^6$ na CCS, não constitui uma boa alternativa para triagem dos casos de mastite na propriedade, tendo em vista que estas ferramentas diagnósticas apresentaram boa sensibilidade e especificidade com pontos de corte inferiores ao recomendado por alguns estudos. A concordância dos resultados da cultura bacteriológica realizada antes e após o congelamento das amostras, demonstra a possibilidade de armazenamento das amostras sem comprometimento da viabilidade da amostra.

Os trabalhos acerca das alterações que ocorrem na composição do leite de cabras fornecem informações importantes sobre o processo infeccioso da mastite e podem revelar-se bons bioindicadores da doença. Observou-se aumento das concentrações de gordura, proteína e sólidos totais após a infecção experimental, mantendo-se constante antes, durante e após a terapia. Este estudo demonstra a possibilidade do uso de terapias alternativas sem o comprometimento de parâmetros que são utilizados pela indústria de laticínios.

Nas condições deste estudo, a pomada elaborada a partir do extrato etanólico da planta *H. martiana* (jatobá) apresentou a capacidade de reduzir as contagens bacterianas totais nas metades infectadas experimentalmente com *S. aureus*. A atividade antibacteriana pode estar relacionada às classes de metabólitos secundários encontradas. Considerando o baixo custo desta terapia, outros estudos objetivando a identificação e isolamento dos compostos ativos no extrato, além da determinação de aspectos toxicológicos do extrato são ainda necessários.

Apêndice 1 - Exemplar de *Hymenaea martiana* Hayne (Exsicata depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF) sob nº 21868).



(A) Exemplar de *Hymenaea martiana* Hayne; (B) Detalhe da parte aérea da planta; (C) Fruto; (D) Planta após o corte (retirada de cascas).



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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “EXTRATO ETANÓLICO DA AMBURANA CEARENSIS (FR. ALLEM.) A.C.SMITH E HYMENAEA MARTIANA HAYNE NO TRATAMENTO DA MASTITE CAPRINA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE COM STAPHYLOCOCCUS SPP”, Protocolo nº 0005/131211, sob a responsabilidade de MATEUS MATIUZZI DA COSTA, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Comitê de Ética em Estudos Humanos e Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

(We certify that the Research “ETHANOL EXTRACT OF AMBURANA CEARENSIS (FR. ALLEM.) A.C. SMITH AND HYMENAEA MARTIANA HAYNE AND TREATMENT OF MASTITIS IN GOATS EXPERIMENTALLY INDUCED WITH STAPHYLOCOCCUS SPP” protocol number 0005/131211, under the responsibility of MATEUS MATIUZZI DA COSTA, is agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by The Ethics Committee in Human and Animal Studies of Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Petrolina, 24 de fevereiro de 2011.

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