

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO SERTÃO PERNAMBUCANO
CAMPUS PETROLINA ZONA RURAL**

CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE JUREMA PRETA E
UMBURANA DE CAMBÃO, ESPÉCIES NATIVAS DO BIOMA
CAATINGA, FRENTE A ISOLADOS PROVENIENTES DE CASOS DE
MASTITE EM PEQUENOS RUMINANTES**

MAURA MARINETE DE SOUSA

**PETROLINA, PE
2019**

MAURA MARINETE DE SOUSA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE JUREMA PRETA E
UMBURANA DE CAMBÃO, ESPÉCIES NATIVAS DO BIOMA
CAATINGA, FRENTE A ISOLADOS PROVENIENTES DE CASOS
DE MASTITE EM PEQUENOS RUMINANTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao IF SERTÃO-PE *Campus* Petrolina Zona Rural, exigido para a obtenção de título de Engenheiro Agrônomo. Sob orientação do professor Rodolfo de Moraes Peixoto, e escrito de acordo com as diretrizes para publicação na revista “Semina: Ciências Agrárias”.

**PETROLINA, PE
2019**

S725

Sousa, Maura Marinete de.

Potencial antimicrobiano de jurema preta e umburana de cambão, espécies nativas do bioma caatinga, frente a isolados provenientes de casos de mastite em pequenos ruminantes / Maura Marinete de Sousa. - 2019.

18 f.: il.; 30 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia)-Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Petrolina, 2019.

Bibliografia: f. 08-12.

1. Plantas medicinais. 2. Bioma caatinga. 3. Caprinos. I. Título.

CDD 633.88

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	06
2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	07
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
4 – CONCLUSÕES.....	13
5 – AGRADECIMENTOS.....	13
6 – REFERÊNCIAS.....	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Susceptibilidade de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. aos extratos etanólicos de <i>Mimosa tenuiflora</i> e <i>Commiphora leptophloeos</i>	18
Tabela 2 - Avaliação da toxicidade em <i>A. salina</i> (DL50) dos extratos etanólicos da umburana de cambão e jurema preta e seus respectivos limites do intervalo de confiança de 95%.....	19
Tabela 3 - Perfil fenólico de extratos etanólicos de <i>Mimosa tenuiflora</i> e <i>Commiphora leptophloeos</i>	20
Tabela 4 - Número de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. e suas classificações quanto a produção de biofilme.....	21

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Cromatogramas do extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora* com detecção em comprimentos de onda de 280, 220, 320 e 360 nm..... 22
- Figura 2** - Cromatogramas do extrato etanólico de *Commiphora leptophloeos* com detecção em comprimentos de onda de 280, 220, 320 e 360 nm..... 23

Potencial antimicrobiano de jurema preta e umburana de cambão, espécies nativas do bioma caatinga, frente a isolados provenientes de casos de mastite em pequenos ruminantes

Resumo

A mastite é responsável por danos à saúde animal e prejuízos financeiros ao produtor. Na busca por alternativas eficazes no controle da mastite, destacam-se os produtos naturais extraídos de diversas plantas que possuem ação antibacteriana. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* do extrato etanólico de duas espécies do bioma caatinga frente a bactérias isoladas de casos de mastite subclínica em pequenos ruminantes. As folhas de jurema preta e umburana de cambão foram secas e processadas para obtenção dos extratos etanólicos bruto para o estudo da composição fenólica. Foram utilizados 33 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes da bacterioteca do Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos do IF SERTÃO-PE. Com os isolados de *Staphylococcus* spp. realizou-se a análise de quantificação da produção de biofilme. Além disso, empregou-se o teste de sensibilidade antimicrobiana, utilizando-se a técnica da concentração bactericida mínima (CBM) frente aos dois extratos etanólicos. Para conhecer o potencial tóxico, utilizou-se o teste de toxicidade com *Artemia salina*. A análise de quantificação dos compostos fenólicos demonstrou que os extratos etanólicos de jurema preta e umburana de cambão apresentaram a miricetina em quantidades bastante elevadas, 43,2 e 294,9 mg 10g respectivamente, em relação aos demais compostos detectados. Na pesquisa do gene nuc, observou-se uma positividade de 39,4%. A análise da produção de biofilme revelou que 96,9% dos isolados apresentava a capacidade de produção do biofilme, evidenciando a evolução destes micro-organismos quanto ao desenvolvimento de mecanismos de resistência. Os resultados referentes à concentração bactericida mínima indicaram uma faixa de inibição entre 195,30 a 3125,00 e 781,20 a 6250,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos de jurema preta e umburana de cambão, respectivamente. Observou-se maior atividade para o extrato de jurema preta, que inibiu 100% dos isolados bacterianos (n=26), enquanto o extrato de umburana de cambão apresentou um percentual de inibição de 69,23%. Evidenciou-se a atividade tóxica do EEB de jurema preta que apresentou uma DL50 de 118, 356 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado, o EEB de umburana de cambão apresentou-se como atóxico (DL50 = 1527, 430 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Considerando que as duas espécies nativas da caatinga apresentaram atividade antibacteriana e que a miricetina foi o composto majoritário tem-se a possibilidade de desenvolvimento de novas linhas de investigação, visando a obtenção produtos antimastíticos a base de extrato natural.

Palavras-chave: atividade antibacteriana, caprinovinocultura, *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett, mastite, *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.

Introdução

A caprinovinocultura no nordeste brasileiro sempre desempenhou um importante papel na economia regional, e constituiu-se em uma das principais atividades da agricultura familiar (Ribeiro & Alencar, 2018).

Nesta região localiza-se mais de 90% e 60% dos rebanhos nacionais de caprinos e ovinos, respectivamente (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE], 2017).

Embora o nordeste apresente um significativo rebanho destes animais, alguns problemas constituem sérios entraves para o crescimento da atividade na região, podendo-se citar, aqueles de origem sanitária. Dentre estes, destaca-se a mastite, uma inflamação da glândula mamária ocasionada, geralmente, por bactérias. Quanto à etiologia, em cabras leiteiras, as infecções intramamárias são, em sua maioria, causadas por diversas espécies do gênero *Staphylococcus* (Contreras et al., 2007) (Santos Júnior et al., 2019).

As perdas decorrentes da mastite nos rebanhos são diversas. Ocasionalmente causam danos desde a saúde do animal à prejuízos financeiros ao produtor (Peixoto, Mota, & Costa, 2010). Para o controle, emprega-se uma variedade de medicamentos químicos, os chamados antibióticos, e o seu uso constante e indiscriminado é um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública devido aos resíduos gerados no leite quando o período de carência não é respeitado, e que mesmo este produto passando pelo processo de pasteurização não os elimina, e, além disto, tem-se a resistência bacteriana que pode ser ocasionada (Cades et al., 2017) (Oliveira et al., 2019).

Alguns problemas como a não comercialização do leite produzido por animais tratados, o alto custo devido à dependência de antibióticos 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). Pereira et al. (2015) afirmam que os produtos naturais constituem uma opção terapêutica mais econômica no controle de doenças para países em desenvolvimento.

Apesar da diversidade genética em espécies de plantas que o Brasil possui, menos de 10% tiveram suas características biológicas avaliadas e, menos de 5% foram submetidas a estudos fitoquímicos detalhados. Mesmo com um recente aumento de pesquisas nesta área, as plantas ainda constituem uma fonte relativamente subutilizada e, com grande potencial para descoberta de novas substâncias biologicamente ativas (Luna et al., 2005).

Neste contexto, na busca por alternativas eficazes no controle da mastite, destaca-se o uso de diversas plantas que possuem ação antibacteriana. O estudo de fitoterápicos tem sido considerado mundialmente importante, em virtude da presença de substâncias menos tóxicas e mais eficazes contra a resistência bacteriana (Oliveira et al., 2019). Portanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* do extrato etanólico de duas plantas nativas da caatinga, frente a bactérias do gênero *Staphylococcus*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Química, Controle de Qualidade de Alimentos e Laboratório de Cromatografia Líquida do IF SERTÃO-PE e no Laboratório Microbiologia Imunologia Animal do *Campus* Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco, respectivamente.

Coleta e identificação do material vegetal

As folhas da *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Jurema preta) e *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett (Umburana de cambão) foram coletadas no município de Petrolina-PE, nas seguintes coordenadas: 09°20'14,9" S, 040°41'30,3" W e 09°20'37,6" S, 040°41'25,3" W, respectivamente. Com o material botânico foram confeccionadas exsicatas com o número de registro: 5.276 para *M. tenuiflora* e 5.277 para *C. leptophloeos*.

Processamento do material vegetal

O material vegetal (folhas) foi submetido à secagem em estufa com circulação forçada de ar, a temperatura de 40 °C por três dias, e em seguida triturado em moinho de facas, até obtenção de um material pulverizado. Após isto, iniciou-se o preparo dos extratos etanólicos bruto (EEB), onde o material pulverizado foi submetido à maceração exaustiva em etanol 99,3%. Foram feitas quatro extrações num intervalo de 72 horas entre cada uma.

Análise de compostos fenólicos – HPCL-DAD

A metodologia utilizada para a determinação do perfil de compostos fenólicos dos extratos foi validada por Padilha et al. (2017), com adaptações feitas por Dutra, Rodrigues, Oliveira, Pedreira e Lima (2018). Os compostos fenólicos individuais foram determinados por HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography), usando um sistema LC Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara - EUA), cromatógrafo líquido acoplado a uma bomba de solvente quaternário modelo (G1311C) e desgaseificador, coluna termostatizada compartimento (G1316A), amostrador automático (G1329B) e um detector de arranjo de diodo (DAD) (modelo G1315D) e amostrador automático (G1329B).

Os dados foram processados usando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies, Santa Clara - EUA). A coluna usada foi Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (100 × 4,6 mm, 3,5 µm) e a pré-coluna era Zorbax C18 (12,6 × 4,6 mm, 5 µm) (Zorbax, EUA). A temperatura do forno foi 35 °C e o volume de injeção foi de 20 µL de uma solução da amostra, previamente diluído na fase A (10 mg mL⁻¹) e filtrado através de membrana de 0,45 µm (Millipore, Barueri, SP, Brasil). O fluxo de solvente foi de 0,8 mL por minuto. O gradiente utilizado na separação foi de 0 a 5 minutos: 5% B; 5 a 14 minutos: 23% B; 14 a 30 minutos: 50% de B; 30–33 minutos: 80% B, em que o solvente A era uma solução de ácido fosfórico (0,1 M, pH = 2,0) e o solvente B foi metanol acidificado com 0,5% de H₃PO₄. A detecção dos compostos foi feita em 220, 280, 320, 360 e 520 nm, e a identificação e quantificação em comparação com padrões externos.

Identificação genotípica dos isolados de *Staphylococcus* spp.

Utilizou-se 33 isolados bacterianos, fenotipicamente identificados como *Staphylococcus* spp., provenientes da bacterioteca do Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos do IF SERTÃO-PE. O DNA desses isolados foi extraído e purificado de acordo com metodologia proposta por Aldous, Pounder,

Cloud, e Woods (2005), com adaptações. A identificação genotípica dos isolados de *Staphylococcus* spp. foi realizada por meio do gene *nuc* (Kateete et al., 2010).

Quantificação de biofilme

O teste foi realizado por meio da técnica de adesão em microplaca (Merino et al., 2009), e utilizou-se a ATCC 25923 como controle positivo e caldo *Tryptone Soya Broth* (TSB) estéril como controle negativo. Com cada isolado foi feita uma suspensão bacteriana, com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, em seguida, fez-se a inoculação em 3 mL de caldo TSB enriquecido com 0,25% de glicose e incubou-se a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, adicionou-se 195 µL de TSB glicosado nas microplacas de 96 poços, juntamente com solução bacteriana incubada anteriormente. Novamente a microplaca foi incubada a 37 °C por 24 horas e após esse período, a microplaca foi lavada com 200 µL de água destilada estéril por três vezes. Em seguida os poços foram corados com 100 µL de violeta genciana (0,25%) por cinco minutos e lavou-se novamente com água destilada estéril por três vezes. Para finalizar, adicionou-se 200 µL de álcool-acetona (80:20). As microplacas foram submetidas a análise da absorbância através de um leitor de microplaca modelo EXPERT PLUSUV com comprimento de onda de 620 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e de acordo com os valores de Densidade Óptica (D.O.) obtidos na leitura, os isolados foram classificados quanto a produção de biofilme como: negativo, fraco, moderado ou forte.

Teste de sensibilidade antimicrobiana

Para os testes de sensibilidade aos extratos de plantas foram utilizados 25 isolados, sendo oito *Staphylococcus aureus* e 17 *Staphylococcus* spp.. Também foi utilizada a cepa “*Methicillin sensitive Staphylococcus aureus*” (MSSA), linhagem ATCC 25923. Cepa de referência *American Type Culture Collection*, conforme recomendado por Cos, Vlietinck, Berghe e Maes (2006).

Os testes de sensibilidade foram iniciados com a pesagem de 0,25 g de cada extrato etanólico, diluído em 10 mL do diluente definido (etanol 40% para o EEB de jurema preta e etanol 92, 3% para o de umburana de cambão), para obtenção de uma solução estoque na concentração de 25 mg mL⁻¹. A determinação da concentração bactericida mínima (CBM), baseada no documento M7-A7 (Clinical and Laboratory Standard Institute [CLSI], 2006), constituiu-se na distribuição de 200 µL de caldo Muller-Hinton em placas de microtitulação; em seguida, 200 µL da solução estoque do extrato foram acrescidos ao primeiro poço e, após homogeneização, foi transferida para o segundo e assim sucessivamente, para a obtenção das seguintes concentrações finais: 12.500; 6.250; 3.125; 1.562,5; 781,2; 390,6; 195,3 e 97,6 µg mL⁻¹. Procedeu-se igualmente para controle do diluente, onde a solução estoque foi substituída pelo solvente utilizado, considerando a CBM aquela menor que a obtida pelo diluente.

Na preparação do inóculo, colônias obtidas em Ágar Muller-Hinton (MH), foram utilizadas na obtenção de uma suspensão bacteriana, com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland, posteriormente, ajustados em espectrofotômetro a 625 nm. 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. Após esse período, fez-se a repicagem do conteúdo da microplaca com um repicador estéril semeando-se na superfície de ágar MH, incubando por 48 horas a 37°C, para a determinação da CBM como a menor concentração do extrato etanólico em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O tratamento dos dados foi realizado através de análise estatística descritiva e inferencial, com distribuição dos valores em números absolutos e relativos. As médias da CBM foram analisadas por meio do teste de Mann-Whitney.

Teste de toxicidade com *Artemia salina*

Utilizou-se a metodologia de Meyer et al. (1982) com adaptações. Preparou-se uma solução salina (com sal marinho e água destilada estéril) na concentração de 30 g L⁻¹, esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições. Os ovos eclodiram em solução salina, por 24 horas em um aquário com divisórias contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura, e em um dos lados deste aquário, adicionou-se de 40 mg de cistos de *Artemia salina*, tomando-se o cuidado para que os mesmos não ultrapassassem a divisória. A parte do aquário contendo os cistos foi coberta com papel alumínio, para que os organismos, ao nascerem, fossem atraídos pela luz artificial colocada do outro lado, forçando-os a atravessar a divisória. Após a eclosão dos ovos, cerca de dez náuplios de *Artemia salina* foram transferidas com uma micropipeta para recipientes contendo a solução salina e as amostras a serem testadas em diferentes concentrações (1000 µg mL⁻¹; 100 µg mL⁻¹; 10 µg mL⁻¹; 1 µg mL⁻¹). O teste foi acompanhado de controle negativo. Após 24 horas em contato com as substâncias testadas, fez-se a contagem de náuplios mortos e vivos. As substâncias testadas foram dois extratos etanólicos bruto (EEB): de umburana de cambão e de jurema preta. Cada concentração testada foi realizada em triplicata. A obtenção da dose que causa letalidade de 50% dos náuplios (DL50) foi feita por cálculos do método PROBIT de análise, com 95% de confiança.

Resultados e Discussão

As extrações dos compostos das espécies jurema preta e umburana de cambão apresentaram rendimentos de 14, 34 % e 6,3 %, respectivamente. Fatores como o método de extração utilizado, solvente, temperatura, bem como as características do material vegetal, são fundamentais para a qualidade e maximização da extração de compostos de uma planta. Tais fatores influenciam significativamente o teor de metabólitos secundários extraídos e, assim, influenciam no rendimento e composição final dos extratos (Karabegović et al., 2014).

Nos cromatogramas obtidos para o extrato etanólico de jurema preta, observou-se que os principais picos foram das seguintes substâncias: ácido gálico, no comprimento de onda de 280 nm; Epigallocatequina galato em 220 nm; trans-resveratrol em 320 e Miricetina em 360 nm (Figura 1).

Já no extrato etanólico de umburana de cambão, os principais picos apresentaram as seguintes substâncias: hesperidina, no comprimento de onda de 280 nm; epicatequina galato em 220 nm; trans-resveratrol em 320 e miricetina e quercetina3-glicosídeo em 360 nm (Figura 2).

A análise de quantificação dos compostos fenólicos demonstrou que os extratos etanólicos de jurema preta e umburana de cambão apresentaram a miricetina em quantidades bastante elevadas, 43,2 e 294,9 mg 10g, respectivamente, em relação aos demais compostos detectados. Em estudo realizado sobre a atividade antibacteriana de 38 flavonoides diferentes, alguns flavonoides apresentaram atividade frente ao *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), sendo eles: miricetina, datiscetina, quercetina, luteolina e campferol (Xu & Lee, 2001).

Para o extrato etanólico de jurema preta, o grupo flavonol, se destacou com relação à somatória dos compostos (56,5 mg 10g), seguido dos ácidos fenólicos (39,06 mg 10g). No extrato etanólico umburana de cambão o grupo flavonol também se destacou, com uma somatória de 357,4 mg 10g, sendo a miricetina o composto majoritário nos dois extratos.

Na pesquisa do gene nuc, observou-se uma positividade de 39,4% (13/33), sendo, portanto, identificados como *Staphylococcus aureus*. Em estudo realizado no Brasil *S. aureus* apareceu como um dos principais agentes envolvidos em casos de mastite em caprinos (Peixoto, França, Souza Júnior, Veschi, & Costa, 2010).

A análise da produção de biofilme revelou que a maioria dos isolados (96,9%) apresentou-se com potencial para produção de biofilme. Sendo 19 fracos produtores de biofilme, 8 moderados, 5 fortes produtores e apenas um não apresentou formação. Evidenciando assim a evolução destes micro-organismos quanto ao desenvolvimento de mecanismos de resistência, corroborando com Dibbern, Botaro, Viziack, Silva e Santos (2015), que afirmam que em maioria os casos de mastite são ocasionados por bactérias, destacando-se o *Staphylococcus aureus*, como um micro-organismo capaz de produzir biofilme. Scherr, Heim, Morrison e Kielian (2014) definem biofilme como um conjunto de células aderidas a uma superfície biótica ou abiótica e embutidas em uma matriz extracelular protetora, sendo esta uma das características que poderá conferir-lhe resistência às drogas antimicrobianas utilizadas no tratamento desta enfermidade. Assim como a desinfetantes e ao sistema imune do hospedeiro, tornando a infecção de caráter crônico (Arciola, Campoccia, Speziale, Montanaro & Costerton, 2012) (Guimarães et al., 2012) (Tremblay, Caron, Blondeau, Messier, & Jacques, 2014).

As plantas utilizadas na medicina popular estão sendo cada vez mais estudadas por serem possíveis fontes de substâncias com atividades antimicrobianas, frente à micro-organismos prejudiciais à saúde do homem (Mendes et al., 2011), a agricultura e a pecuária (Corrêa & Salgado, 2011). Isso devido aos metabólitos secundários encontrados nas plantas terem como principais funções a defesa contra herbívoros e micro-organismos, a proteção contra os raios ultravioleta, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes bem como produção de substâncias alelopáticas (Simões, Schenkel, Gosmann, Melo, Mentz, & Petrovick, 2010).

Quanto aos testes de sensibilidade das cepas bacterianas aos extratos etanólicos, os resultados referentes à concentração bactericida mínima indicaram que a faixa de inibição foi de 195,30 a 3125,00 e 781,20 a 6250,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos de jurema preta e umburana de cambão, respectivamente.

Observou-se maior atividade para o extrato de *M. tenuiflora*, inibindo 100% dos isolados bacterianos (n=26), incluindo a ATCC (25923) *Staphylococcus aureus*. De acordo com Pereira et al. (2015), soluções tânicas isoladas de jurema preta apresentaram potencial atividade antibacteriana *in vitro* sobre as linhagens de *S. aureus*, merecendo um estudo mais aprofundado e possível sugestão para usos terapêuticos.

Pesquisas sobre a atividade antimicrobiana da umburana de cambão são escassas na literatura. O extrato etanólico desta planta apresentou um percentual de inibição de 69,23%. Segundo Ribeiro et al. (2014), sobre o estudo do potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área da caatinga, a umburana de cambão foi indicada popularmente para o tratamento de diversas enfermidades, dentre elas inflamações em geral.

Neste estudo, pode-se constatar que não houve diferença significativa entre as médias de CBM, demonstrando assim, o potencial terapêutico das duas espécies estudadas, possibilitando a continuidade de investigação científica sobre a atividade antimicrobiana destas duas plantas, relacionando outras propriedades, e desta forma, possibilitando o desenvolvimento de novas linhas de investigação, tendo em vista que ambas apresentaram resultados positivos quanto à hipótese levantada.

A avaliação da toxicidade em *Artemia salina* dos extratos etanólicos seguiu a classificação estabelecida por Meyer et al. (1982), na qual, amostras que apresentam $DL50 > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ são consideradas atóxicas e amostras que $DL50 < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados tóxicas frente ao microcrustáceo.

Foi evidenciado a atividade tóxica do EEB de jurema preta que apresentou uma $DL50$ de 118, 356 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo este valor muito inferior ao de referência. Bezerra e Falcão-Silva (2019) realizaram um levantamento de plantas relatadas como tóxicas para ruminantes no semiárido nordestino, os entrevistados mencionaram casos de intoxicações causadas pela ingestão das folhas da jurema preta por caprinos e ovinos prenhes. Ainda, segundo a pesquisa, os entrevistados relataram que intoxicações causadas por esta planta causam malformações congênitas durante o desenvolvimento embrionário, causando sérios problemas na reprodução destes pequenos ruminantes.

Por outro lado, o extrato de umburana de cambão apresentou-se como atóxico ($DL50 = 1527, 430 \mu\text{g mL}^{-1}$) revelando seu potencial promissor e contribuindo para o avanço da pesquisa visando a utilização na fabricação de produtos a base desta planta. Contudo, o bioensaio com náuplios de *Artemia salina* é considerado apenas um teste de triagem, sendo relevante a realizações de outros testes recomendados para verificação do potencial tóxico de potenciais terapêuticos.

Ensaio com *Artemia salina* sugerem alto potencial para atividades biológicas, sendo, portanto, muito útil a utilização deste bioensaio no direcionamento de estudos fitoquímicos para busca de substâncias bioativas (Amarante, Müller, Póvoa, & Dolabela, 2011).

Conclusões

Considerando que as duas espécies vegetais apresentaram atividade biológica frente ao *Staphylococcus* spp., e que a miricetina foi o composto majoritário nos dois extratos, tem-se a oportunidade de desenvolver novas linhas de investigação científica, relacionando outras propriedades, a exemplo da toxicidade, buscando o controle do patógeno sem causar efeitos indesejáveis ao hospedeiro, bem como subsidiar estudos para produção de produtos terapêuticos a base de extratos de plantas, a fim de permitir o estabelecimento de uma específica e planejada terapia com mais chances de sucesso.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa e ao IF SERTÃO-PE E UNIVASF pelo apoio nas análises laboratoriais.

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. *Journal Clinical Microbiology*, 43(5), 2471–2473. doi: 10.1128/JCM.43.5.2471-2473.2005
- Amarante, C. B., Müller, A. H., Póvoa, M. M., & Dolabela, M. F. (2011). Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amazonica*, 41(3), 431 – 434. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672011000300015>
- 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. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.031
- Bezerra, J. J. L., & Falcão-Silva, V.S. (2019). Plantas relatadas como tóxicas para ruminantes no semiárido nordestino. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 18(2). doi: 10.5965/223811711812019202
- Cades, M., Zanini, D. S., Souza, H. L., Silva, J. D., Fink, A. A. B., & Muniz, I. M. (2017). Perfil de resistência antimicrobiana de mastite bovina em propriedade leiteira no município de Monte Negro/RO. *Revista Brasileira de Ciências da Amazônia*, 6(1), 1 – 62. Recuperado de <http://www.periodicos.unir.br/index.php/rolimdemoura/article/view/1940/2068>
- Clinical and Laboratory Standard Institute. CLSI .(2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standards. Document CLSI M7-A7, CLSI, Wayne, Pennsylvania.

- Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J.C., Marco, J.C., Paape, M. J., & Gonzalo, C. (2007). Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68, 145–153. doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.011
- Corrêa, J.C.R., & Salgado, H.R.N. (2011). Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13(4), 500-506. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000400016>
- 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’. *Journal of ethnopharmacology*, 106(3), 290-302. doi: 10.1016/j.jep.2006.04.003
- Dibbern, A. G., Botaro, B.G., Viziack, M. P., Silva, L. F. P., & Santos, M. V. (2015). Evaluation of methods of dna extraction from staphylococcus aureus in milk for use in real-time PCR. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 227–233. doi: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.January.16.6>
- Dutra, M. C. P., Rodrigues, L. L., Oliveira, D., Pereira, G. E., Lima, M. S. (2018). Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian organic and conventional grape juices and wines: Validation of a method for determination of Cu, Fe and Mn. *Food Chemistry*, 269, 157-165. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.014>
- 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. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(12), 1219–1224. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012001200002>
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (BR). (2017). Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Recuperado de <http://www.sidra.ibge.gov.br>
- Karabegovic, I.T., Stojicevic, S. S., Velickovic, D. T., Todorovic, Z. B., Nikolic, N. C., & Lazic, M. L. (2014). The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. *Industrial Crops and Products*, 54, 142-148. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.047>
- Kateete D. P., Kimani C. N., Katabazi F. A., Okenga A., Okeel M., 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. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9(23), 1-7. doi: 10.1186/1476-0711-9-23

- 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. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(2), 347-349. Recuperado em <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/7144/4189>
- Luna, J.S., Santos, A.F., Lima, M.R.F., Omena, M.C., Mendonça, F.A.C., Bieber, L.W., & Sant'Ana, A.E.G. (2005). A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 199- 206. doi: 10.1016/j.jep.2004.10.004
- Mendes, L.P.M. , Maciel, K.M., Vieira, A.B.R., Mendonça, L.C.V., Silva, R.M.F., Rolim Neto, P.J., Barbosa, W.L.R., & Vieira, J.M.S. (2011). Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 32(1),121-125. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/679b/6d966a1af4b446678527c4397a952f0f6d53.pdf>
- Merino, N., Arana, A. T., Irigaray, M. V., Valle, J., Solano, C., Calvo, E., Lopez, J. A., Foster, T. J., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2009). Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 191(3), 832–843. doi: 10.1128/JB.01222-08
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnan, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D.E., & Mclaughlin, J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, 45(1), 31-34. doi: 10.1055/s-2007-971236
- Oliveira, S. C.C., Nishi, L., Mantovani, D., Mateus, G. A. P., Santos, T. R. T., Baptist, A. T. A., Gomes, R. G., & Bergamasco, R. (2019). Extratos de plantas brasileiras no controle da bactéria *Staphylococcus aureus* causadora da mastite contagiosa em bovinos leiteiros. *Revista Tecnológica*, 27(1), 48-58. doi: 10.4025/revtecnol.v27i1.43745
- Padilha, C. V. S., Miskinis, G. A., Souza, M. E. A. O., Pereira, G. E., Oliveira, D., Bordignon-Luiz, M. T., & Lima, M. S. (2017). Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chemistry*, 228, 106-115. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>
- Peixoto R. M., França C. A., Souza Júnior A. F., Veschi J. L. A., & Costa M. M. (2010). Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância

de técnicas empregadas no diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(9), 734-740. Recuperado de http://www.pvb.com.br/portal/download_artigo/Nzk5fDIwMTkxMTI3MTgyNTIz

Peixoto, R. M., Mota, R. A., & Costa, M. M. (2010). Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(9), 754-762. Recuperado de <http://www.pvb.com.br/portal/pesquisa?term=Mastite+em+pequenos+ruminantes+no+Brasil>

Pereira, A. V., Azevedo, T. K. B., Santana, G. M., Trevisan, L. F. A., Higino, S. S. S., Costa, R. M., Pereira, M. S. V., & Azevedo, S. S. (2015). Análise da atividade antimicrobiana de taninos totais de plantas aromáticas do Nordeste brasileiro. *Revista Agropecuária Técnica*, 36(1), 109-114. doi: <https://doi.org/10.25066/agrotec.v36i1.23009>

Ribeiro, D.A., Macêdo, D.G., Oliveira, L.G.S., Saraiva, M.E., Oliveira, S.F., Souza, M.M.A., & Menezes, I.R.A. (2014). Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 16(4), 912-930. doi: 10.1590/1983-084X/13_059

Ribeiro, K. A., & Alencar, C. M. M. (2018). Desenvolvimento territorial e a cadeia produtiva da caprinovinocultura no semiárido baiano: o caso do município de Juazeiro-BA. *Revista Brasileira de Assuntos Regionais e Urbanos*, 4(1), 144-179. doi: 10.18224/baru.v4i1.6571

Santos Júnior, D. A., Matos, R. A. T., Melo, D. B., Júnior Garino, F., Simões, S. V. D., & Miranda, E. G. (2019). Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro de bactérias isoladas de cabras com mastite no Sertão e Cariri paraibano. *Ciência Animal Brasileira*, 20, 1-11. doi: 10.1590/1089-6891v20e-44848

Scherr, T. D., Heim, C. E., Morrison, J. M., & Kielian, T. (2014). Hiding in plain sight: Interplay between staphylococcal biofilms and host immunity. *Frontiers in Immunology*, 5(37), 1-7. doi: 10.3389/fimmu.2014.00037

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Melo, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2010). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis, SC: UFSC.

Tremblay, Y. D., Caron, V., Blondeau, A., Messier, S., & Jacques, M. (2014). Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: Impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Veterinary Microbiology*, 172(3-4), 511-518. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.06.007

Xu, H. X., Lee, S. F. (2001). Activity of Plant Flavonoids Against Antibiotic – Resistant Bacteria. *Phytotherapy Research*, 15, 39 – 43. doi: 10.1002/1099-1573(200102)15:1<39::AID-PTR684>3.0.CO;2-R.

Tabela 1. Susceptibilidade de isolados de *Staphylococcus* spp. aos extratos etanólicos de *Mimosa tenuiflora* e *Commiphora leptophloeos*.

Espécie	Atividade observada (%)	Concentração Bactericida Mínima	
		Faixa	Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Mimosa tenuiflora</i>	100 (26/26)	195,3 – 3.125	1.682,68 ^a
<i>Commiphora leptophloeos</i>	69,23 (18/26)	781,2 – 6.250	2.734,37 ^a

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Avaliação da toxicidade em *A. salina* (DL50) dos extratos etanólicos da umburana de cambão e jurema preta e seus respectivos limites do intervalo de confiança de 95%.

Amostras	DL50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Intervalo de confiança 95%	
		Limite inferior	Limite superior
EEB Umburana	1527,430	60,110	38812,798
EEB Jurema	118,356	20,042	698,952

Tabela 3. Perfil fenólico de extratos etanólicos de *Mimosa tenuiflora* e *Commiphora leptophloeos*.

Compostos fenólicos	<i>Mimosa tenuiflora</i> (mg 10g)	<i>Commiphora leptophloeos</i> (mg 10g)
<i>Flavanols</i>		
(+)-Catequina	6,9	2,6
(-)-Epicatequina	0,71	0,73
(-)- Epicatequina galato	0,29	4
(-)- Epigallocatequina galato	18	2,3
Procianidina A2	3	0,64
Procianidina B1	3	0,32
Procianidina B2	6,7	2,6
Σ <i>Flavanols</i>	38,6	13,19
<i>Flavonol</i>		
Quercetina3-glicosideo	5,1	52,1
Rutina	1	3,4
Caempferol 3- <i>O</i> -glicosideo	7,2	7
Miricetina	43,2	294,9
Σ Flavonol	56,5	357,4
<i>Flavononas</i>		
Hesperidina	1,6	18,8
Naringenina	7,9	1,3
Σ <i>Flavononas</i>	9,5	20,1
<i>Ácidos fenólicos</i>		
Ácido galico	36,2	0,34
Ácido siringico	1,6	0,28
Ácido <i>p</i> -Cumárico	0,51	1,2
Ácido cafeico	0,24	0,22
Ácido trans-caftárico	0,51	1,8
Ácido Clorogênico	ND	3,4
Σ <i>Ácidos fenólicos</i>	39,06	7,24
<i>Estilbenos</i>		
trans-resveratrol	0,86	8,7
cis-resveratrol	2,6	2,1
Σ <i>estilbenos</i>	3,46	10,8

ND = Não Detectado.

Tabela 4 – Número de isolados de *Staphylococcus* spp. e suas classificações quanto a produção de biofilme

Classificação	Nº de Isolados	Percentual (%)
Fraca Produção	19	57,6
Moderada Produção	8	24,24
Forte Produção	5	15,16
Sem Produção	1	3,03
Total	33	100,00

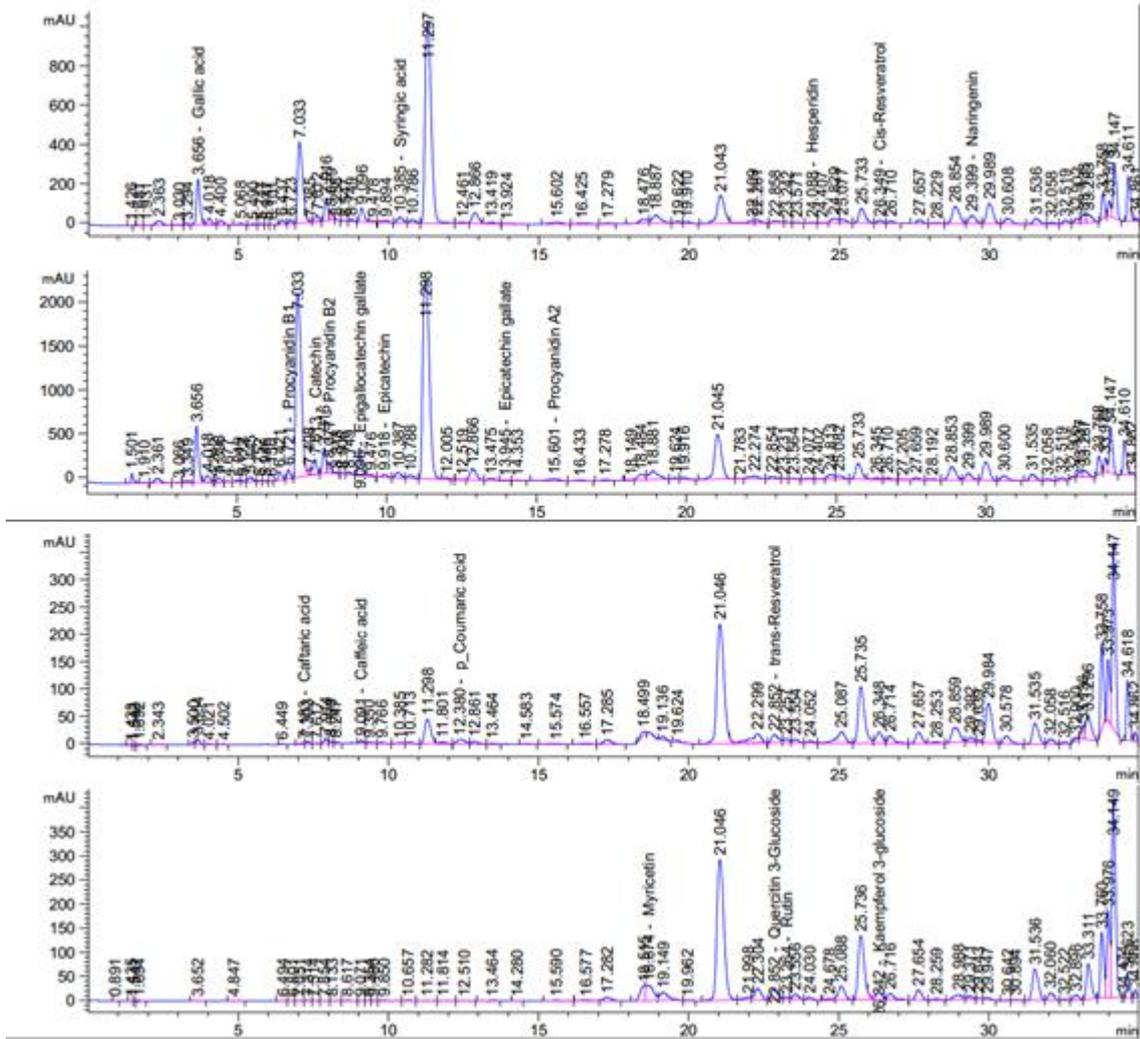


Figura 1. Cromatogramas do extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora* com detecção em comprimentos de onda de 280, 220, 320 e 360 nm.

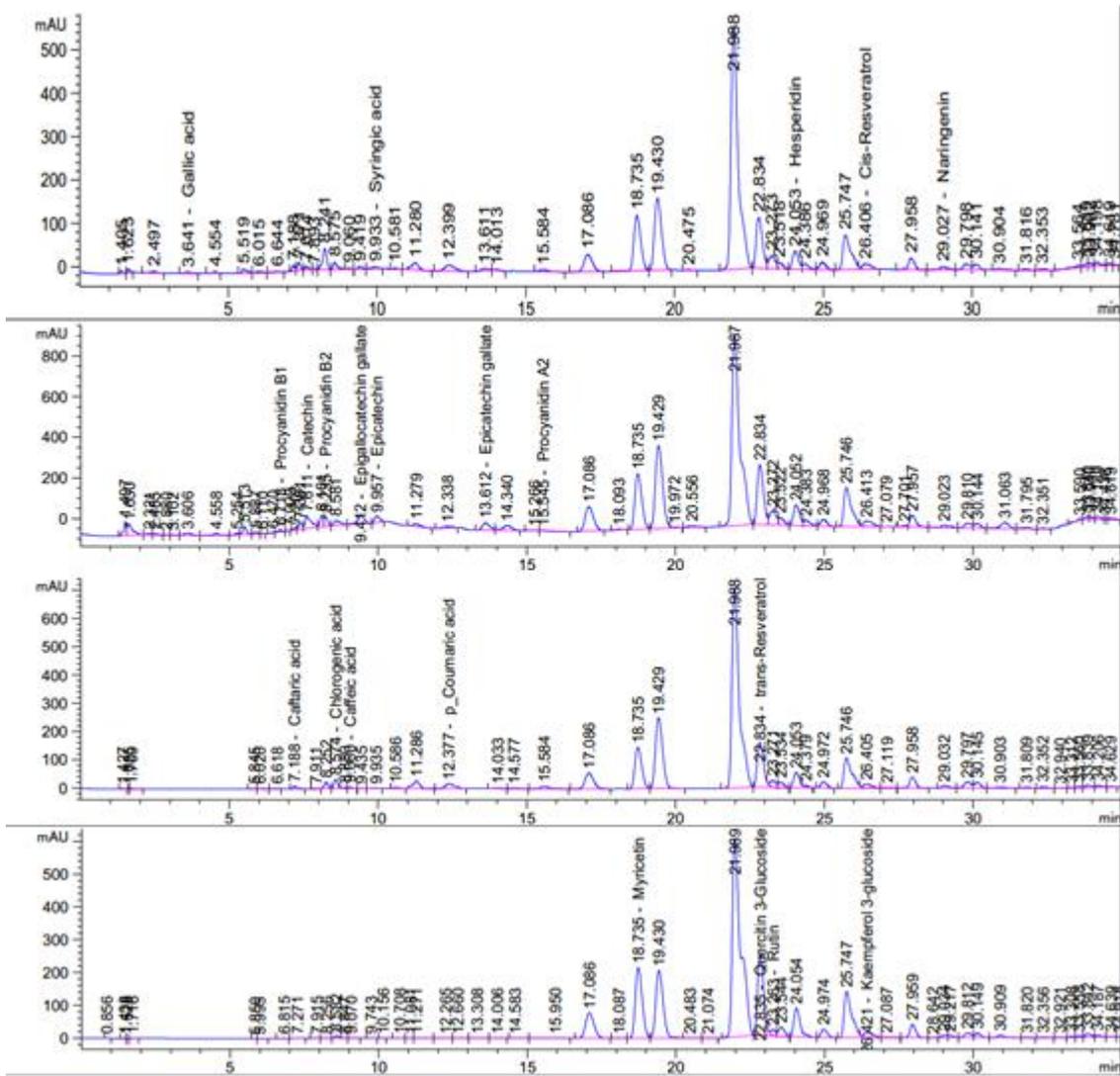


Figura 2. Cromatogramas do extrato etanólico de *Commiphora leptophloeos* com detecção em comprimentos de onda de 280, 220, 320 e 360 nm.