

**Diego Bardal**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BARBATIMÃO  
*Stryphnodendron adstringens* (MARTIUS) COVILLE EM  
AGENTES CAUSADORES DA MASTITE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Igor Viana Brandi

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Anna Christina de Almeida

Montes Claros

2011

Bardal, Diego.

B245a Atividade antimicrobiana de barbatimão *Stryphnodendron*  
2011 *adstringens* (Martius) Coville em agentes causadores da mastite /  
Diego Bardal. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2011.

180 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

Orientador: Prof. Igor Viana Brandi.

Banca examinadora: Neide Judith de Faria Oliveira, Anna Christina de Almeida, Roberta Torres Careli, Dario Alves Oliveira, Igor Viana Brandi

Inclui bibliografia: f. 144-161

1. Mastite – Uso barbatimão. 2. Microbiologia – Veterinária. 3. Plantas medicinais – Cerrado. I. Brandi, Igor Viana II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 636.09

Elaborada pela BIBLIOTECA COMUNITÁRIA DO ICA/UFMG

**DIEGO BARDAL**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BARBATIMÃO *Stryphnodendron adstringens* (MARTIUS) COVILLE EM AGENTES CAUSADORES DA MASTITE**

---

Prof. Dario Alves Oliveira  
(Unimontes)

---

Prof.<sup>a</sup> Neide Judith de Faria Oliveira  
(ICA/UFMG)

---

Prof.<sup>a</sup> Roberta Torres Careli  
(ICA/UFMG)

---

Prof.<sup>a</sup> Anna Christina de Almeida  
Coorientadora (ICA/UFMG)

---

Orientador Prof. Igor Viana Brandi  
Orientador (ICA/UFMG)

**Aprovada em 05 de agosto de 2011**

Montes Claros  
2011

## DEDICATÓRIA

Principalmente aos meus pais

Ana Maria Jurisckha Bardal e Miguel Bardal,  
pelo amor incondicional, pelo exemplo de vida e o  
forjar do meu caráter, a primorosa educação e a  
dádiva da vida.

A minha esposa Fernanda Brant Caldeira Bardal,  
pelo amor, compreensão, paciência e  
companheirismo nesta etapa da edificação de  
minha educação e trajetória de vida.

Aos meus irmãos Gabriel Bardal e Fábio Bardal.  
Alicerces importantes da minha existência e  
exemplos vivos da força de caráter e retidão  
recebida de nossos pais.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, que, pelo programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* de Mestrado em Ciências Agrárias, permitiu a realização deste trabalho.

À Doutora Neide Judith de Faria Oliveira, pelo exemplo de vida, de humildade e de sucesso; pela amizade, respeito profissional, compreensão, competência; pela paciência e a liberdade de criação oferecida, as quais me ajudaram a entender melhor o universo médico veterinário e a forjar todo o conhecimento adquirido nesses dois anos de excelente e pacífica convivência.

Ao Senhor Ramon Aparecido Brito, Engenheiro de Produção e Coordenador do Setor de Formulação e Envase da VALLÉE S.A. Amigo e companheiro em todos os momentos e para todos os problemas. Porto seguro do Setor de Formulação e Envase e motivo tranquilidade, em meus poucos momentos de ausência.

À VALLÉE S.A. Empresa na qual trabalho e exemplo para o mundo, de Indústria Farmacêutica Veterinária. Um empreendimento 100% nacional, 100% mineiro e presidida por um guerreiro Doutor Ronan de Freitas Pereira. Agradeço a maior Indústria Farmacêutica Veterinária Nacional e uma das maiores do mundo, pelo emprego; pelo excelente ambiente de trabalho; pelas dispensas para cumprimento dos créditos e apresentação das dezenas de aulas, de trabalhos e seminários; pelo fornecimento das cepas padrões; pela disponibilização do Laboratório de Controle Biológico e equipamentos; e pela minha formação e firmação como profissional Farmacêutico Industrial.

Ao Tamir Calcagnotto da Silva e Alessandro Pereira Silva, Supervisor de Controle Biológico e Analista de Laboratório Pleno da VALLÉE S.A., respectivamente, os quais me ajudaram nos experimentos e realização desta dissertação.

Aos funcionários do Setor de Formulação e Envase de Produção de Vacinas Antiaftosa e Antirrábica da VALLÉE S.A., os quais eu gerencio, pela amizade incondicional, pelo apoio nos meus momentos de ausência e por constituírem a minha “família” em Montes Claros.

Ao Doutor Igor Viana e à Doutora Anna Christina de Almeida que aceitaram a orientação e coorientação desse trabalho.

Ao Gerente de Produção de Vacinas Antiaftosa e Antirrábica da VALLÉE S.A., Luciano da Silva Machado, pela confiança e liberdade para a realização do mestrado.

Ao Senhor Augusto Andrade Pereira, proprietário da Fazenda Rancho Nossa Senhora da Conceição, local onde foram coletadas as amostras vegetais utilizadas neste trabalho, pela paciência e companheirismo. Um grande homem e excelente pessoa.

Ao Doutor Cândido Alves da Costa pela sabedoria, disponibilidade e capacidade de comunicação como lecionador estatístico. As aulas por ele ministradas e preciosa ajuda foram de grande valia para a conclusão deste trabalho.

Às Faculdades Santo Agostinho pela concessão dos materiais e equipamentos, na realização dos experimentos botânicos e químicos, da identificação fitoquímica do vegetal. E a oportunidade de “ouro” de trabalhar como professor e educador das disciplinas de Farmacognosia, Operações Unitárias e Tecnologia Farmacêutica do Curso de Farmácia da Faculdade, e Deus, abrindo mais essa porta aberta para minha carreira.

Ao Mestrando do Instituto de Ciências Agrárias – ICA/UFMG, Thiago Meireles Félix, pelo suporte no processo de moagem do Barbatimão e nos experimentos com a planta, e a Mestranda Vanessa Amaro Vieira, também do ICA, que juntos à Prof.<sup>a</sup> Neide Judith formaram um excelente e produtivo grupo de trabalho, no qual imperou acima de tudo respeito e companheirismo.

Que Deus abençoe a todos.

*“Não queiras ser como aquele cata-vento dourado do grande edifício; por muito que brilhe e por mais alto que esteja, não conta para a solidez da obra. Oxalá seja sempre como um velho silhar, oculto nos alicerces, debaixo da terra, onde ninguém te veja; por ti não desabar a casa”.*

*“Não julgues nada pela pequenez dos começos. Uma vez fizeram-me notar que, não se distinguem pelo tamanho as sementes, que darão ervas anuais, das que vão produzir árvores centenárias”.*

*(Padre Josemaría Escrivá)*

## RESUMO

As plantas medicinais ressurgiram como opções aos protocolos existentes para tratar doenças. Nesse contexto, pesquisou-se a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae-Mimosoidae, frente aos micro-organismos associados à mastite bovina. Usaram-se cepas padrão (ATCC) de *Staphylococcus aureus* (6538), *Escherichia coli* (8739), *Streptococcus pyogenes* (19615), *Pseudomonas aeruginosa* (9027) e *Candida albicans* (10231). Para as cascas do barbatimão, procedeu-se a identificação e a confirmação botânica; após cominuídas e padronizadas, realizaram-se a triagem físico-química e a extração dos bioativos por turbólise, na mistura hidrometanólica (1:1 p/v) com *S. adstringens*. Depois da destilação fracionada e recomposição, obteve-se o extrato aquoso com 328,18 mg/ml e 38,81% de taninos totais, os quais foram empregados em testes de macrodiluição em caldo e de disco de difusão em ágar. Investigou-se a ação antimicrobiana pelas concentrações inibitórias (CIM) e bactericida/fungicida (CBM/CFM) mínimas do extrato. No delineamento inteiramente casualizado realizaram-se contagens de colônias viáveis em triplicata, para cada micro-organismo nos tempos 0, 6, 12, 18 e 24 h, frente às concentrações de 1, 5, 25, 50 e 75 mg/ml de extrato de barbatimão. Analisaram-se, por ANOVA com o teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ), os dados da macrodiluição e da difusão no modelo fatorial triplo e duplo, respectivamente. Usou-se a regressão ( $p \leq 0,01$ ) para construir os gráficos de cinética de inativação do crescimento microbiano. As CIM (mg/ml) frente ao extrato aquoso de *S. adstringens* foram 75, 1, 5 a 25 e 25, respectivamente, para *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. O extrato aquoso do barbatimão não apresentou efeito antibacteriano sobre *E. coli*. As CBM na presença do extrato de *S. adstringens* foram 25 mg/ml para *S. pyogenes* e *P. aeruginosa* e 50 mg/ml para a *C. albicans*. O barbatimão verdadeiro apresentou efeito antimicrobiano frente patógenos causadores da mastite. Portanto, estudos adicionais devem ser realizados para o futuro uso *in vivo*.

**Palavras-chave:** Concentrações. Extrato. Tempo. Infecção. *Stryphnodendron adstringens*. Patógenos.



## ABSTRACT

Medicinal plants re-emerged as options to existing protocols to treat diseases. In this context, it was investigated the antimicrobial activity *in vitro* of aqueous extract of *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae-Mimosoidae, compared to micro-organisms associated with bovine mastitis. They used standard strains (ATCC) of *Staphylococcus aureus* (6538), *Escherichia coli* (8739), *Streptococcus pyogenes* (19615), *Pseudomonas aeruginosa* (9027) and *Candida albicans* (10 231). To stem-bark of barbatimao, we proceeded to the identification and botanical confirmation, after comminuted and standardized they held the physical chemistry screening and extraction of bioactive by turbo-extraction in hydromethanol mixture (1:1 w/v) with *S. adstringens*. After fractionated distillation and recombination was obtained the aqueous extract with 328.18 mg/ml and 38.81% of total tannins, which were used in tests of broth macrodilution and disk of agar diffusion. It was investigated the antimicrobial activity by inhibitory concentrations (MIC) and bactericidal/fungicidal (CBM/CFM) minimum of the extract. In a completely randomized design were carried out scores of colonies viable in triplicate for each micro-organism at times of 0, 6, 12, 18 and 24 h, compared to concentrations of 1, 5, 25, 50 and 75 mg/ml of extract of barbatimao. They were analyzed by ANOVA with Tukey test ( $p \leq 0.01$ ); the data of the macrodilution and of the diffusion in factorial model double and triple, respectively. It was used regression ( $p \leq 0.01$ ) to construct the graphics of kinetics of inactivation of the microbial growth. The MICs (mg/ml) compared to aqueous extract of *S. adstringens* were 75, 1, 5 to 25 and 25, respectively, for *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. The aqueous extract of barbatimao did not show antibacterial effect on *E. coli*. The CBM in the presence of the extract of *S. adstringens* were 25 mg/ml for *S. pyogenes* and *P. aeruginosa* and 50 mg/ml for *C. albicans*. The real barbatimao showed antimicrobial effect against pathogens causing mastitis. Therefore, further studies should be undertaken for the future use *in vivo*.

**Key words:** Concentrations. Extract. Time. Infection. *Stryphnodendron adstringens*. Pathogens.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| FIGURA 1 -  | Expressão matemática utilizada para o cálculo da quantificação dos taninos totais, a partir da detecção das absorvâncias dos grupos cromóforos das amostras.....   | 70  |
| FIGURA 2 -  | Expressão matemática utilizada para transformação logarítmica dos dados que possuem distribuição exponencial. Y = corresponde ao valor transformado e X = é o valor exponencial obtido no experimento a ser transformado.....  | 81  |
| GRÁFICO 1 - | Curvas das cinéticas de inativação, calculadas pelas equações resultantes das análises das regressões, dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias do <i>Staphylococcus aureus</i> - UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica, Log (X+1), relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h) sobre o micro-organismo..... | 93  |
| GRÁFICO 2 - | Curvas das cinéticas de inativação, calculadas pelas equações resultantes das análises das regressões, dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de <i>Escherichia coli</i> - UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica, Log (X+1), relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h) sobre o micro-organismo.....      | 104 |

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| GRÁFICO 3 - | <p>Curvas das cinéticas de inativação, calculadas pelas equações resultantes das análises das regressões, dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de <i>Streptococcus pyogenes</i> - UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica, <math>\text{Log}(X+1)</math>, relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h) sobre o micro-organismo.....</p> | 115 |
| GRÁFICO 4 - | <p>Curvas das cinéticas de inativação, calculadas pelas equações resultantes das análises das regressões, dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica, <math>\text{Log}(X+1)</math>, relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h) sobre o micro-organismo.....</p> | 125 |
| GRÁFICO 5 - | <p>Curvas das cinéticas de inativação, calculadas pelas equações resultantes das análises das regressões, dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de <i>Candida albicans</i> - UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica, <math>\text{Log}(X+1)</math>, relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h) sobre o micro-organismo.....</p>       | 134 |
| QUADRO 1 -  | <p>Relação entre o resultado do <i>California Mastitis Test</i> - CMT e a estimativa da contagem de células somáticas - CCS em número de células por mililitro - cél./ml prevista para cada observação.....</p>   | 36  |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| QUADRO 2 - | Relação entre os resultados do <i>California Mastitis Test</i> - CMT, <i>Wisconsin Mastitis Test</i> - WMT, e contagem de células somáticas - CCS em número de células por mililitro - cél./mℓ e perdas estimadas na produção de leite do rebanho..... | 37 |
| QUADRO 3 - | Principais agentes etiológicos, metas de controle e características das mastites contagiosa e ambiental.....   | 39 |
| QUADRO 4 - | Espécies e nomes populares de plantas medicinais, tipos de testes utilizado no tratamento da mastite bovina <i>in vitro</i> , patógenos sensíveis e referências.....   | 53 |
| QUADRO 5 - | Espécies e nomes populares de plantas medicinais e vias de administração utilizadas no tratamento da mastite bovina <i>in vivo</i> , patógenos sensíveis e referências.....  | 59 |
| QUADRO 6 - | Valores para a diluição da solução original do extrato aquoso do <i>S. adstringens</i> (328,18 mg/mℓ) em 15 mℓ de meio <i>BHI</i> e 100 μℓ de inóculo dos micro-organismos testados neste trabalho.....  | 75 |
| QUADRO 7 - | Diluição da solução original do extrato aquoso do <i>S. adstringens</i> (328,18 mg/mℓ) em frascos de vidro estéreis de 30 mℓ, para as concentrações definidas no experimento em mg/mℓ, obtendo o volume final de 30 mℓ por frasco e diluição.....      | 78 |

## LISTA DE TABELAS

- 1 - Valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias, na alíquota de 100  $\mu\text{l}$  de *Staphylococcus aureus*, transformadas pela expressão logarítmica,  $\text{Log}(X+1)$ , frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de contato em horas (h)..... 90
  
- 2 - Equações ajustadas pelas análises de regressão dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* - UFC/100 $\mu\text{l}$ , transformados pela expressão logarítmica,  $\text{Log}(X+1)$ , relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de contato do micro-organismo em horas (h)..... 92
  
- 3 - Diâmetro médio dos halos de inibição, em milímetros (mm), do crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), após incubação de 24 horas..... 96
  
- 4 - Resultados do teste de disco difusão, em função dos diâmetros em milímetros dos halos de inibição, médias e desvios padrão obtidos pela verificação da sensibilidade de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), frente aos antimicrobianos (oxacilina 1 $\mu\text{g}$ , penicilina G 10 $\mu\text{g}$ , imipenem 10 $\mu\text{g}$  e ceftazidima 30 $\mu\text{g}$ )..... 98
  
- 5 - Valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias, na alíquota de 100  $\mu\text{l}$  de *Escherichia coli*, transformadas pela expressão logarítmica,  $\text{Log}(X+1)$ , frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h)..... 100

- 6 - Equações ajustadas pelas análises de regressão dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* - UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica, Log (X+1), relacionando, a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de contato do micro-organismo em horas (h)..... 103
- 7 - Diâmetro médio dos halos de inibição, em milímetros (mm), do crescimento de *Escherichia coli* (ATCC 8739) frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), após incubação de 24 horas..... 107
- 8 - Resultados do teste de disco difusão, em função dos diâmetros em milímetros (mm) dos halos de inibição, médias e desvios padrão obtidos pela verificação da sensibilidade de *Escherichia coli* (ATCC 8739), frente aos antimicrobianos (oxacilina 1µg, penicilina G 10µg, imipenem 10µg e ceftazidima 30µg)..... 109
- 9 - Valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias, na alíquota de 100 µl de *Streptococcus pyogenes*, transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h)..... 111
- 10 - Equações ajustadas pelas análises de regressão dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Streptococcus pyogenes* - UFC/100 µl, transformados pela expressão logarítmica, Log (X+1), relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de contato do micro-organismo em horas (h)..... 114
- 11 - Diâmetro médio dos halos de inibição, em milímetros (mm), do crescimento de *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), após incubação de 24 horas..... 118

- 12 - Resultados do teste de disco difusão, em função dos diâmetros em milímetros (mm) dos halos de inibição, médias e desvios padrão obtidos pela verificação da sensibilidade de *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), frente aos antimicrobianos (oxacilina 1µg, penicilina G 10µg, imipenem 10µg e ceftazidima 30µg)..... 120
- 13 - Valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias, na alíquota de 100 µl de *Pseudomonas aeruginosa*, transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h)..... 122
- 14 - Equações ajustadas pelas análises de regressão dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Pseudomonas aeruginosa* - UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica, Log (X+1), relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de contato do micro-organismo em horas (h)..... 124
- 15 - Diâmetro médio dos halos de inibição, em milímetros (mm), do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), após incubação de 24 horas..... 127
- 16 - Resultados do teste de disco difusão, em função dos diâmetros em milímetros (mm) dos halos de inibição, médias e desvios padrão obtidos pela verificação da sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) frente aos antimicrobianos (oxacilina 1µg, penicilina G 10µg, imipenem 10µg e ceftazidima 30µg)..... 129
- 17 - Valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias, na alíquota de 100 µl de *Candida albicans*, transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h)..... 131

- 18 - Equações ajustadas pelas análises de regressão dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Candida albicans* - UFC/100  $\mu\text{l}$ , transformados pela expressão logarítmica,  $\text{Log}(X+1)$ , relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de contato do micro-organismo em horas (h)..... 133
- 19 - Diâmetro médio dos halos de inibição, em milímetros (mm), do crescimento de *Candida albicans* (ATCC 10231) frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), após incubação de 24 horas..... 136
- 20 - Resultados do teste de disco difusão, em função dos diâmetros em milímetros (mm) dos halos de inibição, médias e desvios padrão obtidos pela verificação da sensibilidade de *Candida albicans* (ATCC 10231) frente aos antimicrobianos (oxacilina 1 $\mu\text{g}$ , penicilina G 10 $\mu\text{g}$ , imipenem 10 $\mu\text{g}$  e ceftazidima 30 $\mu\text{g}$ )..... 138
- 21 - Diâmetro médio dos halos de inibição, em milímetros (mm), do crescimento de amostras de *Staphylococcus aureus*; de *Escherichia coli*, de *Streptococcus pyogenes*; de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Candida albicans* frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml) junto aos inóculo de  $1,00 \times 10^8$  a  $9,00 \times 10^8$  UFC/ml , em meio Müller Hinton, após incubação de 24 horas..... 141



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|            |   |  |
|------------|---|--|
| ANOVA      | - | Análise de variância   |
| ANVISA     | - | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                                     |
| ATCC       | - | <i>American Type Culture Collection</i>                                      |
| BHCB       | - | Herbário do Departamento de botânica da Universidade Federal de Minas Gerais |
| BHI        | - | <i>Brain hearth infusion</i>   |
| BRIC       | - | Brasil; Rússia; Índia e China  |
| C.V.       | - | Coeficiente de variação  |
| CAZ        | - | Ceftazidima  |
| CBM        | - | Concentração bactericida mínima  |
| CCS        | - | Contagem de células somáticas  |
| CCSTL      | - | Contagem de células somáticas totais do leite                                |
| CDB        | - | Convenção da Diversidade Biológica   |
| Cél.       | - | Célula   |
| CFM        | - | Concentração fungicida mínima  |
| CIM        | - | Concentração inibitória mínima   |
| CMT        | - | <i>California mastitis test</i>  |
| DIC        | - | Delineamento inteiramente casualizado  |
| EUA        | - | Estados Unidos da América  |
| FAO        | - | <i>Food and Agriculture Organization of United Nations</i>                   |
| g          | - | Grama  |
| h          | - | Hora   |
| IMS Health | - | <i>Intercontinental Marketing Services – Health</i>                          |
| IN         | - | Instrução Normativa  |
| IPM        | - | Imipenen   |
| kg         | - | Quilograma   |

|                |   |
|----------------|---|
| Log            | - Logaritmo   |
| LPS            | - Lipopolissacarídeo  |
| MAPA           | - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento          |
| mg             | - Miligrama   |
| mg/ml          | - miligrama por mililitros                                    |
| ml             | - Mililitros  |
| mm             | - Milímetro   |
| MRSA           | - <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>          |
| NCCLS          | - <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i> |
| OMS            | - Organização Mundial da Saúde                                |
| OXA            | - Oxacilina   |
| PEN-G          | - Penicilina G  |
| R <sup>2</sup> | - Coeficiente de determinação                                 |
| RDC            | - Resolução da Diretoria Colegiada                            |
| RE             | - Resolução Específica  |
| RPM            | - Rotações por minuto   |
| SAEG           | - Sistema para análises estatísticas e genéticas              |
| SUS            | - Sistema Único de Saúde                                      |
| TSA            | - <i>Tryptic Soy agar</i>                                     |
| TSB            | - Tryptic Soy Broth   |
| UFC            | - Unidade formadora de colônia                                |
| WFI            | - Water for injectable  |
| WMT            | - <i>Winscosin mastitis test</i>                              |
| β              | - Coeficiente de regressão                                    |
| μg             | - Micrograma  |
| μm             | - Micrometro  |

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>3</b> | <b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>   | <b>23</b> |
| 3.1      | Utilização das plantas medicinais para promoção da saúde primária.....  | 23        |
| 3.2      | A mastite bovina.....   | 31        |
| 3.3      | O emprego das plantas medicinais na mastite bovina.....   | 46        |
| 3.4      | <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....  | 61        |
| <b>4</b> | <b>PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....</b>   | <b>63</b> |
| 4.1      | Locais de realização dos experimentos e desenvolvimento do trabalho.....  | 63        |
| 4.2      | Planta.....   | 64        |
| 4.3      | O extrato.....  | 66        |
| 4.4      | Identificação e doseamento.....   | 68        |
| 4.5      | Micro-organismos.....   | 71        |
| 4.6      | Determinação da cinética de inativação das concentrações, inibitória e bactericida/fungicida, mínimas do extrato aquoso de <i>S. adstringens</i> frente aos micro-organismos teste..... | 72        |
| 4.6.1    | Micro-organismos e elaboração do inóculo.....   | 73        |
| 4.6.2    | Montagem dos tubos, diluições do extrato aquoso, aplicação do inóculo, incubação e leitura das placas.....  | 74        |
| 4.7      | Sensibilidade dos micro-organismos frente ao extrato aquoso de <i>S. adstringens</i> , pelo teste de disco difusão.....   | 76        |
| 4.7.1    | Micro-organismos e elaboração do inóculo.....   | 77        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 4.7.2    | Montagem da técnica do antibiograma em discos de papel, diluições do extrato aquoso, aplicação do inóculo, incubação e leitura das placas.....   | 77         |
| 4.7.3    | Análise estatística.....   | 79         |
| 4.7.3.1  | Análise estatística para o teste da sensibilidade em macrodiluição em tubos.....   | 80         |
| 4.7.3.2  | Análise estatística do teste de sensibilidade pelo método do disco-difusão em ágar.....  | 83         |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>84</b>  |
| 5.1      | Planta e extrato.....  | 84         |
| 5.2      | Micro-organismos - Análise dos agentes infecciosos frente à interação das diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>S. adstringens</i> (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/m) em diferentes tempos de exposição (0, 6, 12, 18 e 24 horas)..... | 88         |
| 5.2.1    | <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 88         |
| 5.2.2    | <i>Escherichia coli</i> .....  | 99         |
| 5.2.3    | <i>Streptococcus pyogenes</i> .....  | 110        |
| 5.2.4    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....  | 120        |
| 5.2.5    | <i>Candida albicans</i> .....  | 130        |
| 5.3      | Teste de sensibilidade de disco difusão em ágar, analisando a interação entre os micro-organismos frente às crescentes concentrações do extrato aquoso de <i>S. adstringens</i> (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml).....                          | 140        |
| 5.3.1    | Avaliações dos micro-organismos.....   | 140        |
| 5.3.2    | Avaliações das concentrações.....  | 142        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>  | <b>143</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>144</b> |
|          | <b>APÊNDICES.....</b>  | <b>162</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A humanidade sempre usou os recursos naturais em benefício próprio e dos seus rebanhos (WANZALA *et al.*, 2005; SCHUCH, 2007). Porém, o conhecimento sobre plantas medicinais evoluiu aleatoriamente, como as preparações aplicáveis à saúde (SCHUCH, 2007).

Administrar vegetais para curar é prática antiga, pois, o homem estabeleceu relações estreitas com o ambiente e os animais, fornecedores dos suportes básicos à vida, como a alimentação, a proteção e o trabalho (WALLER *et al.*, 2001; TOYANG *et al.*, 2007).

A pesquisa fitoterápica veterinária é crescente, em função dos seus benefícios potenciais, como a menor probabilidade de selecionar resistência em micro-organismos e de gerar resíduos medicamentosos nos alimentos, além de, possivelmente, possuir formas farmacêuticas mais simples e acessíveis aos consumidores e proporcionar a inclusão do saber local na terapêutica (WALLER *et al.*, 2001; TOYANG *et al.*, 2007).

Economicamente, a mastite é a principal doença dos bovinos destinados à produção leiteira no mundo e os prejuízos para produtores, laticínios e consumidores são diretos. A infecção inicia-se quando os patógenos atravessam o canal do teto, instalam-se, multiplicam, sintetizam toxinas e desencadeiam a inflamação na glândula mamária (AYYAPPA *et al.*, 2009).

Na alopatia, antibióticos são as principais substâncias empregadas para tratar a mastite. Porém, a eficácia pode ser pequena e a resistência dos agentes aos antimicrobianos é crescente. Portanto, o emprego isolado ou associado dos fitoterápicos, pode ser estratégico para melhorar os resultados clínicos a campo (COSTA; WATANABE, 1999; PYÖRÄLÄ, 2002).

Nativo do cerrado brasileiro, a espécie *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae-Mimosoidae, ou barbatimão verdadeiro, tem sido usado etnofarmacologicamente. Extratos da planta são empregados como adstringente, antimicrobiano, hemostático, antidiarreico, anti-hipertensivo e ainda no tratamento da leucorreia, das hemorroidas e em

inflamações (SOARES *et al.*, 2008; HOLETZ *et al.*, 2005; OLIVEIRA; FIGUEIREDO, 2007; ISHIDA *et al.*, 2009; MELLO, 1997).

Extratos brutos e purificados oriundos do córtex de *S. adstringens* possuem taninos e revelaram *in vitro* e *in vivo* atividade cicatrizante (LOPES *et al.*, 2005), anti-inflamatória (LIMA *et al.*, 1998), antiulcerinogênica (AUDI *et al.*, 1999), antiprotozoária e anti-helmíntica (HERZOG-SOARES, *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2002; VINAUD *et al.*, 2005; ISHIDA *et al.*, 2005; HOLETZ *et al.*, 2005), além de ser antiviral e antifúngica (FELIPE *et al.*, 2006; ISHIDA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009; ISHIDA *et al.*, 2009).

Buscou-se, portanto contextualizar o regresso às atividades complementares no tratamento veterinário, com a aplicação de testes de ações antimicrobianas *in vitro*, no uso de concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, frente aos patógenos comumente associados à mastite.

## 2 OBJETIVOS

Em virtude das lacunas científicas a respeito da utilização de *Stryphnodendron adstringens*, pelo retorno às práticas tradicionais na terapia veterinária e por demanda de produtores rurais, objetivou-se desenvolver a extração dos princípios ativos de *Stryphnodendron adstringens* e determinar a ação antimicrobiana *in vitro* de concentrações crescentes do extrato aquoso de *S. adstringens*, em diferentes tempos, frente aos patógenos associados à mastite bovina: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Escherichia coli* (ATCC 8739); *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

### **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Utilização das plantas medicinais para promoção da saúde primária**

Todas as culturas e épocas, desde os tempos antigos até a atualidade, têm utilizado as plantas medicinais como matéria-prima para confecção de medicamentos. O homem busca recursos que melhorem a sua saúde na natureza, para aumentar suas chances de sobrevivência. Nesse contexto, de utilização do material natural para o benefício humano e dos seus rebanhos, advém a utilização das plantas medicinais na medicina tradicional, para a promoção da saúde primária humana e veterinária (BRASIL, 2004a; BRASIL, 2006a).

Grande parte da população mundial ainda depende das plantas medicinais como acesso à saúde primária, porém, muitos vegetais com potencial terapêutico ainda não foram estudados. Mundialmente, vários cientistas pesquisam a importância dessas plantas, com foco especialmente na descoberta de novos medicamentos (TOMLINSON; AKERELE, 1998).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, de acordo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população dos países em desenvolvimento usam práticas tradicionais e 85% desta utilizam plantas medicinais ou preparações dessas na saúde (BRASIL, 2006a; OMS, 2002). Assim, nesses países, os governos encaram a fitoterapia, como uma maneira de estender os benefícios para a saúde, dentro de um espectro economicamente viável. Nos países desenvolvidos, entretanto, os consumidores e produtores rurais buscam nessa terapia alternativas viáveis para as lacunas deixadas pela medicina moderna (TOMLINSON; AKERELE, 1998).

A medicina veterinária tradicional evoluiu paralelamente com a humana, pois, ainda podem ser encontradas práticas de manejo e terapêuticas, aplicadas por comunidades tradicionais aos seus rebanhos. Esse conhecimento popular, forjado pela experiência adquirida e passada de geração por geração, resiste ao modelo impositivo da produção do conhecimento ocidental (SCHUCH, 2007).



O emprego da medicina tradicional na terapêutica veterinária é originário do Programa de Medicina Tradicional, promovido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o qual visava à promoção, à conservação e à utilização de plantas medicinais nos cuidados à saúde primária. Os encontros promovidos pela OMS na antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (1978), na Tailândia (1988), na Alemanha (1991) e nos Estados Unidos da América (1993), entre outros, solidificaram o conceito de medicina tradicional e a prática do emprego das plantas medicinais na saúde animal (TOMLINSON; AKERELE, 1998; BRASIL, 2006b).

Na década de 70, a OMS (1979) determinou que a promoção, o desenvolvimento e a utilização de plantas medicinais são essenciais para as estratégias internacionais de saúde primária. Assim, as políticas sobre as plantas medicinais, como uma unidade integrada à medicina tradicional passaram do reconhecimento da função das plantas nos cuidados médicos primários, para a promoção ativa de sua identificação, conservação e exploração (TOMLINSON; AKERELE, 1998; BRASIL, 2006b).

Em 1987, reiteraram-se as recomendações feitas anteriormente pela OMS e iniciaram-se efetivamente os programas associados às plantas medicinais, desde a identificação até a conservação daquelas mais comumente empregadas na medicina tradicional. Salientou-se ainda, a necessidade do emprego de novas tecnologias e das boas práticas de manejo às plantas medicinais e à fabricação dos medicamentos fitoterápicos (TOMLINSON; AKERELE 1998; BRASIL, 2006b).

Em 1991, a importância da medicina tradicional na assistência social, especialmente às populações de baixa renda foi reforçada pela OMS, que, em 2002/2005, propõe o desenvolvimento de políticas públicas para inserir as plantas medicinais no sistema oficial de saúde dos seus 191 estados-membros. Desses, 25 desenvolveram e programaram políticas públicas nacionais de medicina tradicional, para o fortalecimento da saúde primária, porém, o Brasil ainda não promoveu essas reformas efetivamente (BRASIL, 2006b).

Com o estímulo da OMS à medicina tradicional, especialmente no uso das plantas medicinais, da biodiversidade estrutural e das propriedades físico-químicas e biológicas das plantas, proporcionaram ao material vegetal ampla importância econômica. Destacam-se os fitoterápicos e fitofármacos, que representam os produtos oriundos de material vegetal com maior valor agregado (NODARI; GUERRA, 2007).

No início dos anos oitenta, juntamente com as conferências e os lançamentos dos textos bases da OMS, para a promoção da saúde primária, com a medicina tradicional. Manifestou-se o interesse mundial, por resgatar, fundamentar e documentar as práticas etnoveterinárias, uma vez que essas quase desapareceram em função da introdução de novas tecnologias na terapêutica veterinária, desmatamento, degradação ambiental, perda da biodiversidade e a obsolescência do conhecimento, em função do tempo e o envelhecimento das populações locais (CONFESSOR *et al.*, 2009; GIDAY *et al.*, 2009; TOYANG *et al.*, 2007).

Na medicina veterinária contemporânea, as práticas complementares persistem principalmente nas áreas rurais, onde a atenção primária a saúde veterinária, bem como os serviços prestados pelos especialistas, são dispendiosos, escassos e mesmo inexistentes. Desse modo, verifica-se um flagrante contraste, quando são relacionados os problemas de sanidade na pecuária e a restrição ao acesso regular aos medicamentos essenciais. Fato esse, que prejudica consideravelmente a produtividade, principalmente nas zonas rurais de países emergentes e subdesenvolvidos (CONFESSOR *et al.*, 2009).

De acordo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), a carência de medicamentos, no tratamento de doenças e infecções dos rebanhos, provoca perdas de 30 a 35% no setor de reprodução animal, sobretudo nos países subdesenvolvidos, onde a precária saúde veterinária continua a representar a causa raiz dos problemas na produção animal (CONFESSOR *et al.*, 2009; FAO, 2002).

Atualmente a inserção das plantas medicinais na terapêutica veterinária é de fundamental relevância e importância para a sociedade. Uma vez que, os insumos alimentares adicionados às rações, os

medicamentos sintéticos ministrados aos rebanhos, a aplicação de parasiticidas e saneantes e o uso dos desinfetantes, em nome da saúde animal, acabam por causar sérios prejuízos ao meio ambiente, aos consumidores e à saúde pública em geral. Portanto, o emprego das matérias-primas vegetais no bem estar animal, deve resgatar a compreensão, os conhecimentos e as práticas tradicionais e agroecológicas, na pecuária. Desse modo, a produção animal e sua sanidade, são alçadas sob os aspectos ecológicos, socioeconômicos, culturais e políticos, sempre por uma perspectiva holística (SOUZA; WIEST, 2007).

Segundo a consultoria - *Intercontinental Marketing Services – Health - IMS HEALTH*, o mercado mundial de medicamentos movimentou em 2010 entre US\$ 820 bilhões e US\$ 830 bilhões, um crescimento de 4% a 6% em relação a 2009. Nos anos de 2006 ao atual, as vendas globais das indústrias farmacêuticas cresceram cerca de 40%. Os países do BRIC (Brasil, Rússia, Índia e China) serão os responsáveis pela expansão do segmento nos próximos anos. O crescimento esperado é de aproximadamente US\$ 300 bilhões no mercado global de medicamentos, em quatro anos, atingindo uma receita de US\$ 1,1 trilhão em 2014 (GATYAS; SAVAGE, 2010).

A perspectiva é que até 2013 o mercado brasileiro cresça entre 8% e 11%. As taxas são altas, se comparadas com a expectativa de expansão global, entre 4% e 7%, entre 2008 e 2013. Os chamados mercados consolidados, os quais incluem os EUA, Japão, França e Alemanha, o índice deverá ficar entre 2% e 5%. As altas taxas de crescimento anual refletem o impacto da expiração das patentes dos princípios ativos, protegidos pelos mercados desenvolvidos, em função do elevado crescimento global de forma constante, especialmente nos países emergentes e a adoção, nesses países, de políticas consistentes, relacionadas à qualidade, comercialização e o uso dos medicamentos (GATYAS; SAVAGE, 2010).

O mercado fitoterápico é crescente, seguindo a tendência do faturamento do setor farmacêutico mundial. Porém contrasta com os

medicamentos sintéticos, uma vez que os derivados vegetais estão mais bem difundidos nos países desenvolvidos em relação aos emergentes. As cifras movimentadas anualmente se aproximam de US\$ 23 bilhões. Em 2000, o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa, sendo a Alemanha, o maior mercado mundial de fitoterápicos (NUNNENKAMP, 2007). Os fitoterápicos e fitofármacos são responsáveis por 25% do receituário médico dos países desenvolvidos, quase 80% nos países em desenvolvimento. Em 1996, no Brasil, estimou-se que 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento da indústria farmacêutica sejam originados de medicamentos derivados de plantas (NODARI; GUERRA, 2007).

O Brasil é o país com a maior diversidade vegetal do mundo, contendo aproximadamente 22% da biodiversidade do planeta, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Em grande parte esse “patrimônio” genético encontra-se concentrado na floresta amazônica e na escassa faixa de mata atlântica existente. Porém, no mercado de fitoterápicos, o país contribui, com apenas US\$ 500 milhões, cerca de 2,5% do mercado mundial, o panorama brasileiro nessa área mostra que 84% da totalidade dos fármacos são importados e que 78% da produção é realizada por multinacionais, sendo que a maioria importam as matérias-primas vegetais (ARARIPE, 2008; GATYAS; SAVAGE, 2010; NODARI; GUERRA, 2007; SCHUCH, 2007).

Com o cenário apresentado, é possível e importante ressaltar que o setor de fitoterápicos nacional oferece um celeiro de oportunidades, para a diversificação da produção tradicional e para projetos sustentáveis de exploração de espécies nativas ou cultivadas. Dado que, somente 8% das plantas brasileiras foram estudadas em busca de ativos e apenas 590 foram registrados para a comercialização no órgão fiscalizador nacional. As chances para a identificação de produtos, com a sua possível utilização econômica, aumentam com a diversidade de espécies e, desse modo, é necessária a capacitação das comunidades científicas e tradicionais, visando o aproveitamento socialmente justo e sustentável da flora local e não somente o econômico (NODARI; GUERRA, 2007; SCHUCH, 2007).

Assim, a utilização das plantas medicinais, para o sistema de produção animal deve ser feita com critérios e atenção a disponibilidade dos recursos biológicos, levando em consideração processos exploratórios que possam exceder a capacidade regenerativa natural, sendo esses não sustentáveis. Esses princípios estão definidos no artigo primeiro da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), assinada durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (ECO-92), em que o objetivo foi à conservação da diversidade biológica, com a utilização sustentável dos componentes dos ecossistemas e a distribuição equitativa dos benefícios derivados da utilização dos recursos genéticos, mediante a utilização e financiamento de tecnologias pertinentes (BRASIL, 2000; NODARI; GUERRA, 2007; SCHUCH, 2007).

A CDB lançou as bases para a elaboração da Medida Provisória, MP 2.186-16, de 23 de agosto de 2001. Esse projeto com força de lei dispõe e regulamenta a utilização dos componentes que fazem parte do patrimônio genético e o acesso ao conhecimento tradicional relacionado ao mesmo, existentes em todo o território nacional e suas populações nativas respectivamente, seja para fins de pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico ou bioprospecção. Segundo a regulamentação é imperativo haver a transferência da tecnologia gerada pela exploração desse patrimônio a comunidade, bem como uma distribuição justa e equitativa dos benefícios por ela gerados. As receitas, informações, conhecimentos ou quaisquer ganhos obtidos deverão levar a ações concretas de conservação da diversidade biológica, manutenção da integridade do acervo genético, bem como a utilização de forma sustentada dos elementos nele presentes (BRASIL, 2001).

De acordo com o disposto na resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004, a qual diz respeito ao registro de medicamentos fitoterápicos, esse é definido como:

*Fitoterápico é o medicamento obtido com o emprego exclusivo de matérias-primas vegetal. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do uso, assim como pela reprodutibilidade e constância da qualidade. A eficácia e segurança são validadas por levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentação tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos de fase três. Não sendo considerado medicamento fitoterápico aquele que, na composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2004a).*

Segundo revisão realizada por Carvalho *et al.* (2007) e Machado Netto *et al.* (2006) os autores ressaltam a RDC nº 48, de 16 de março de 2004, a qual regulamenta o registro de fitoterápicos, onde são definidos os requisitos necessários para concessão, baseados na garantia da qualidade. As avaliações abrangem a matéria-prima vegetal, os derivados de droga vegetal e o produto final, o medicamento fitoterápico. Essa norma presume diferentes maneiras de se comprovar a segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos. Entre elas, há possibilidade de utilização das informações sobre a tradição de uso da planta, para as indicações propostas, ou seja, reconhece a etnografia como base para a obtenção do registro (CARVALHO *et al.*, 2007; MACHADO NETTO *et al.*, 2006; SCHUCH, 2007).

Com o mesmo objetivo de promover a produção de medicamentos fitoterápicos com segurança, eficácia e qualidade, foi publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a Resolução RDC nº 14/2010, essa norma atualizou os procedimentos de registro no País. As principais mudanças estão relacionadas ao controle de qualidade dos produtos derivados de origem vegetal, os quais foram organizados de forma racional. Segundo a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, conceitos e definições foram adequados, bem como a atualização da lista

de referência, para comprovação da segurança e efeito dos fármacos de origem vegetal (BRASIL, 2010a; CURY, 2010; MOLINA, 2010).

Promulgada no dia 10 de março de 2010, a Resolução RDC nº 10/2010 dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Essa norma instituiu a notificação de drogas vegetais, amparada no uso tradicional e na revisão dos dados disponíveis na literatura relacionados ao tema. Assim as plantas medicinais, ou suas partes, que contenham princípios ativos e geram ação terapêutica, após processos de coleta ou colheita, estabilização e secagem, de formas íntegras, rasuradas, trituradas ou pulverizadas, serão produtos passíveis de venda, isentos de prescrição e destinados ao consumidor final. A RDC nº 14/2010 e a RDC nº 10/2010, distinguem os termos drogas vegetais e medicamentos fitoterápicos, pois se obtêm ambos de plantas medicinais, porém são elaborados e comercializados de maneiras diferenciadas (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2010b; CURY, 2010; MOLINA, 2010).

Os órgãos reguladores como o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e ANVISA, editaram a instrução normativa nº 13/03 e a resolução RDC nº 17/10, respectivamente. A instrução e a resolução delegam total responsabilidade ao fabricante pelos produtos elaborados e comercializados, bem como determinam o cumprimento das boas práticas de fabricação e controle dos fármacos, onde lançam diretrizes à diminuição dos riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica. Essas ações visam assegurar ao usuário, que os produtos farmacêuticos sejam consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados, ao uso pretendido e requerido pelo registro e não coloquem os consumidores em risco, quanto à segurança, qualidade e ou eficácia (BRASIL, 2003, 2004b, 2010c).

Existem cinco importantes regulamentos, os quais apresentam critérios específicos para os medicamentos fitoterápicos, que são: as instruções normativas (IN), IN nº 05/08, atualiza a lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado; IN nº 05/10, que estabelece nova lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia dos

medicamentos fitoterápicos; as resoluções específicas (RE), RE nº 01/05, publica o guia para realização de estudos de estabilidade; RE nº 90/04, que determina a publicação do guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos e a resolução da diretoria colegiada RDC nº 95/08, que regulamenta o texto da bula dos medicamentos fitoterápicos (CARVALHO *et al.*, 2007; MACHADO NETTO *et al.*, 2006; BRASIL, 2004c, 2005, 2008a, 2008b, 2010c, 2010d).

Importantes políticas ligadas a Medicina Tradicional foram estabelecidas no País a partir do ano de 2006 aos dias atuais. A primeira foi a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), aprovada pela Portaria Ministerial MS/GM nº 971 de 03 de maio de 2006. A segunda foi a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada pelo Decreto 5.813, de 22 de junho de 2006. A terceira foi a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, pela de Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF/SCTIE/MS) do Ministério da Saúde (CARVALHO *et al.*, 2007; MACHADO NETTO *et al.*, 2006).

As políticas relacionadas apresentam como premissas o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento em relação à utilização das plantas medicinais e fitoterápicos, os quais devem ser disponibilizados com qualidade, segurança e eficácia aplicados aos consumidores. Reconhece a necessidade da preservação da biodiversidade, do uso sustentável das matérias-primas e do meio ambiente, da promoção à inclusão das comunidades locais na cadeia produtiva, para o manejo do material vegetal (CARVALHO *et al.*, 2007; MACHADO NETTO *et al.*, 2006; BRASIL, 2006c, 2006d, 2008c).

### **3.2 A mastite bovina**

Os consumidores, cada vez mais, exigem que os alimentos, inclusive o leite e seus derivados sejam seguros, nutritivos e com paladar adequado, semelhantes aos produtos frescos. Desta forma, é necessário assegurar



que o leite e seus subprodutos mantenham as qualidades nutritivas originais, o sabor e a aparência sejam preservados, e que micro-organismos patogênicos não estejam presentes no alimento que chega ao consumidor (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Embora a mastite ocorra em quase todas as espécies, a doença pode ser considerada a principal enfermidade do gado leiteiro e uma das mais dispendiosas no mundo. Na verdade, as perdas associadas à mastite são duas vezes mais elevadas àquelas relativas à infertilidade e às doenças reprodutivas. A importância econômica da mastite está associada aos prejuízos diretos aos produtores, aos laticínios e ao consumidor final, onerando toda a cadeia produtiva. A enfermidade apresenta maiores reflexos sobre os médios e pequenos produtores, uma vez que a matriz acometida pela doença poderia servir de fonte de subsistência e renda, pela venda do excedente produzido (SANTOS; FONSECA, 2007; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

É estimado que as perdas na produção de leite, em decorrência da mastite, ultrapassem US\$ 1 bilhão ao ano, nos Estados Unidos da América (EUA). Os prejuízos totais chegam a quase US\$ 2 bilhões, quando todos os custos são considerados. Para o médio e pequeno produtor de leite, o dano causado pela doença por animal é de aproximadamente US\$ 200. O custo anual da enfermidade no rebanho do gado leiteiro é calculado em 10% das vendas da propriedade. No Brasil são estimadas perdas na ordem de 15%, o que significa um total de 3,3 bilhões de litros ao ano. Deve ser enfatizado que os números citados acima não abrangem às perdas da indústria de laticínios, tais como: custos de processamento de leite, degradação das fazendas produtoras, redução do melhoramento genético dos rebanhos produtores e redução da qualidade nutricional dos produtos lácteos (RODOSTIST *et al.*, 2002; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

A mastite é uma inflamação do parênquima da glândula mamária e, independentemente de sua causa, caracteriza-se por alterações físicas e químicas do leite e modificações no tecido glandular, como resultado das lesões teciduais. Dessa forma, o leite das glândulas mamárias acometidas pela mastite possui conteúdo leucocitário aumentado, expressando a

reação tecidual à agressão. Assim, a doença causa a diminuição da qualidade do produto lácteo pelo aumento: de enzimas proteolíticas, dos íons (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) e da rancidez. A diminuição das propriedades nobres do leite ocorre pelo decréscimo: das proteínas totais, dos teores lipídicos, da lactose e das concentrações de íons cálcio e potássio, que determinam na matéria-prima o arrefecimento da estabilidade térmica e a depreciação na fabricação de derivados (RODOSTIST *et al.*, 2002; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

A inflamação da glândula mamária é proveniente de traumas ou lesões no úbere, irritações químicas e, sobretudo causadas por micro-organismos patogênicos como bactérias, fungos, leveduras e algas (RODOSTIST *et al.*, 2002; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

A doença inicia quando os agentes infecciosos atravessam o canal do teto e instalam-se nos tecidos e cavidades da glândula mamária, locais propícios para a sua multiplicação e síntese de toxinas. Nesse período tem início o processo inflamatório, o qual é traduzido pelo influxo de leucócitos e demais células de defesa, fluidos do sangue do organismo animal e alterações da permeabilidade vascular, para a área comprometida pelos micro-organismos que colonizam a estrutura mamária. Essas alterações configuram-se como a resposta imunológica do animal, responsável por tentar neutralizar a toxemia e ou regenerar os tecidos invadidos (RODOSTIST *et al.*, 2002; SANTOS; FONSECA, 2007; PHILPOT; NICKERSON, 2002; PINTO, 2000).

A ocorrência da mastite bovina envolve a resistência da vaca, o agente patogênico e o ambiente, sendo a enfermidade classificada em clínica e subclínica. A mastite clínica caracteriza-se por sintomas evidentes, como edema, hipertermia local, endurecimento e dor na glândula mamária e/ou aparecimento de grumos, pus ou alterações visíveis no leite. O quadro é acompanhado por sinais sistêmicos, como o aumento da temperatura retal, a depressão física, a desidratação e a diminuição do consumo de alimento e da produção de leite. Na mastite subclínica, as alterações no leite e úbere são praticamente imperceptíveis visualmente, porém ocorre redução na produção e mudanças na composição do leite (RODOSTIST *et al.*, 2002; SANTOS; FONSECA, 2007).

Testes e exames individuais são realizados para detecção e diagnóstico das diferentes formas de manifestação da mastite. Para a forma clínica é realizado o exame macroscópico do leite com o auxílio da caneca telada de fundo preto e brilhante, que permite a detecção da descoloração (sanguinolenta e/ou aquosa) e a presença de coágulos, grumos e pus. O úbere pode apresentar anormalidades visíveis de tamanho e consistência dos quartos mamários, as quais podem ser apalpadas. A palpação apresenta melhor resultado diagnóstico quando realizada após a ordenha e tem como finalidade detectar regiões com fibrose, edema inflamatório e atrofia do tecido mamário. Finalmente, a mastite clínica, dependendo da gravidade, duração e agente infeccioso envolvido virá acompanhado de sinais sistêmicos, caracterizados por toxemia, febre, taquicardia, estase ruminal, depressão física, decúbito e anorexia (RODOSTIST *et al.*, 2002).

Para o diagnóstico da mastite subclínica, devido às maiores perdas geradas por essa no rebanho bovino, foram desenvolvidos ao longo dos últimos anos, diversos métodos de detecção, desde a contagem de células somáticas - CCS, técnica mais comumente utilizada no mundo, por distintas técnicas analíticas, tais como: o *California Mastitis Test - CMT*, o *Wisconsin Mastitis Test - WMT*, *Coulter Counter Fossomatic*, passando por dosagem de lactose, *NAGasa* (detecção no leite de níveis elevados da enzima N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase), soroalbumina, antitripsina, plasminogênio plasmático, conteúdo de íons sódio e condutividade elétrica (RODOSTIST *et al.*, 2002; SANTOS; FONSECA, 2007; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Para a pesquisa, o desenvolvimento e a evolução de quaisquer dos métodos empregados, devem ser levados em consideração a especificidade, a sensibilidade, a exatidão e a precisão do procedimento proposto. Assim como o custo por amostragem e a adaptabilidade do teste para as grandes escalas laboratoriais, permitindo o processamento de um grande número de amostras no menor tempo possível. No entanto, a principal dificuldade encontrada nos exames é determinar valores limites consistentes para todos os rebanhos animais, a capacidade de ser empregado em qualquer fase da lactação ou do período seco, sem gerar muitos falsos positivos ou falsos negativos, ou seja, os mesmos devem

apresentar concomitantemente sensibilidade e especificidade (CORBELLINI, 1996; SANTOS; FONSECA, 2007; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

A detecção da mastite do rebanho pode ser realizada pela determinação da contagem de células somáticas totais do leite - CCSTL e dos tipos de bactérias (contagem diferencial de bactérias) no leite do tanque de resfriamento. Uma CCSTL do tanque maior que 200.000 células por mililitros sugerem uma prevalência significativa de mastite no rebanho e esse parâmetro é periodicamente monitorado pelas indústrias de laticínios e cooperativas, para assegurar a legalidade e a qualidade do leite recebido das fazendas (SANTOS; FONSECA, 2007; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Outro método que utiliza o conceito da amostragem do leite cru no tanque de resfriamento é contagem total e diferencial das bactérias. Os limites legais para o número de bactérias variam de acordo com a região, cooperativas de leite e usinas de processamento adotam ou possuem seus próprios padrões (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

No Brasil, o órgão que regulamenta os padrões de qualidade do leite, inclusive para as CCSTL é o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. A Instrução normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, traz em seu anexo IV, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado traz os seguintes valores máximos, para a região sudeste: 750.000 CCSTL/ml, em uma análise mensal, com a média geométrica sobre período de três meses e 750.000 unidade formadora de colônias - UFC/ml (em placas, no mínimo em um diagnóstico mensal, com a média geométrica sobre período de três meses). Porém, segundo a legislação, a partir de 2011, os valores serão reduzidos para 300.000 UFC/ml e 400.000 CCSTL/ml (BRASIL, 2002; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Nos QUADROS 1 e 2 são apresentados os resultados, as relações e os diagnósticos com base nos escores, das três principais técnicas analíticas, para detecção da mastite subclínica. A cultura microbiológica é utilizada por muitos analistas para determinar a prevalência dessa infecção no rebanho (SANTOS; FONSECA, 2007).

A maioria dos patógenos causadores da mastite pode ser facilmente isolada nos métodos rotineiros de cultura. A morfologia colonial, a presença e o modelo da hemólise, além das características de crescimento nesses meios, frequentemente permitem a identificação presuntiva do mesmo. Entretanto, o diagnóstico definitivo de um patógeno suspeito como causador de mastite pode ser realizado por meio de testes específicos para cada micro-organismo (QUINN *et al.*, 2005).

#### QUADRO 1

Relação entre o resultado do *California Mastitis Test - CMT* e a estimativa da contagem de células somáticas - CCS em número de células por mililitro - cél./mℓ, prevista para cada observação

| <b>Escore</b> | <b>Viscosidade</b> | <b>CCS (cél./mℓ)</b> |
|---------------|--------------------|----------------------|
| 0             | Ausente            | 100.000              |
| Traços        | Leve               | 300.000              |
| +             | Leve / moderada    | 900.000              |
| ++            | Moderada           | 2.700.000            |
| +++           | Intensa            | 8.100.000            |

Fonte: SANTOS; FONSECA, 2007, p. 18.

## QUADRO 2

Relação entre os resultados do *California Mastitis Test - CMT*, *Wisconsin Mastitis Test - WMT*, e contagem de células somáticas (CCS) em número de células por mililitro (cél./mℓ) e perdas estimadas na produção de leite do rebanho

| <b>CMT</b> | <b>WMT</b> | <b>CCS (cél./mℓ)</b> | <b>Perdas na produção de leite do rebanho</b> |
|------------|------------|----------------------|---|
| 0          | 3          | 140.000              | 5%  |
|            | 4          | 165.000              |   |
| Traços     | 5          | 195.000              | 8%  |
|            | 6          | 225.000              |   |
|            | 8          | 300.000              |   |
| 1          | 9          | 340.000              | 9%  |
|            | 12         | 465.000              |   |
|            | 21         | 990.000              |   |
|            | 24         | 1.200.000            |   |
| 2          | 25         | 1.280.000            | 19% a 25%                                     |
|            | 31         | 1.800.000            |   |
|            | 34         | 2.180.000            |   |

Fonte: Adaptado de SANTOS; FONSECA, 2007, p. 18.

Os agentes causadores da mastite podem ser classificados como ambientais ou contagiosos. Na forma contagiosa, a glândula mamária bovina é o principal reservatório dos micro-organismos patogênicos, pois, esses são adaptados a multiplicar-se no úbere e na pele dos tetos. A transmissão ocorre principalmente durante a ordenha e caracteriza-se pela menor incidência de casos clínicos e maior número de ocorrência subclínicas. As perdas econômicas provocadas pela mastite contagiosa estão associadas principalmente à redução na produção de leite. Geralmente esses casos são de longa duração e a CCS no leite é elevada (QUINN *et al.*, 2005; SANTOS; FONSECA, 2007).

A mastite ambiental, em contrapartida, é causada por patógenos encontrados no meio onde o animal vive, principalmente onde existe

acúmulo de esterco, urina, barro e camas orgânicas. Nessa manifestação os casos clínicos são altamente prevalentes, com curta duração e maior ocorrência no pré e pós-partos imediatos. Esse tipo de mastite é de difícil controle e erradicação, pois, os agentes infecciosos fazem parte da microbiota ambiental, sendo de controle difícil. Em termos econômicos as maiores perdas causadas pela mastite ambiental para o pecuarista são: a diminuição na produção leiteira, o descarte do leite com resíduos de antibióticos, o custo de medicamentos, o término da vida útil e o risco de morte dos animais (QUINN *et al.*, 2005; SANTOS; FONSECA, 2007).

Os principais agentes causadores, características e metas profiláticas da mastite contagiosa e ambiental são descritos no QUADRO 3.

QUADRO 3

Principais agentes etiológicos, metas de controle e características das mastites contagiosa e ambiental

|                              | <b>Mastite contagiosa</b>  | <b>Mastite Ambiental</b>  |
|------------------------------|--|---|
| <b>Agentes infecciosos</b>   | <i>Streptococcus agalactiae</i><br><i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Mycoplasma bovis</i><br><i>Corynebacterium</i> sp.   | Coliformes ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella</i> sp.<br><i>Enterobacter aerogenes</i> )<br>Estreptococos ambientais ( <i>S.uberis</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> )<br>Enterococos ( <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecalis</i> )<br><i>Arcanobacterium pyogenes</i><br><i>Bacillus</i> sp.<br>Sorovariades de <i>Leptospira</i> spp.<br><i>Mannheimia haemolytica</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Candida albicans</i><br><i>Serratia marcescens</i><br><i>Nocardia asteroides</i><br><i>Listeria monocytogenes</i><br><i>Prototheca zopfii</i> |
| <b>Fonte primária</b>        | Úbere de animais infectados  | O ambiente de criação   |
| <b>Forma de disseminação</b> | Dos quartos mamários infectados para sadios, no momento da ordenha   | Exposição do teto a contaminação ambiental ou equipamento de ordenha com funcionamento inadequado   |
| <b>Metas de controle</b>     | Eradicar <i>S. agalactiae</i> dos animais<br>Reduzir a infecção por <i>S. aureus</i> para menos de 5% das vacas do rebanho | Reduzir a taxa de mastite clínica na lactação, para menos de 1% ao mês  |

Fonte: Adaptado de SANTOS; FONSECA, 2007, p. 32.



Os médios e pequenos produtores de leite utilizam os rebanhos, principalmente para subsistência e para comercialização dos excedentes obtidos, como forma de complementar a renda no campo. O leite produzido e não utilizado na propriedade rural é fonte geradora de receitas, essa atividade caracteriza-se como permanente e estende-se ao longo da idade produtiva do animal. Desse modo, o rebanho leiteiro contrapõe-se a produção com a finalidade de corte, na qual a prática é destrutiva. Na intenção da venda do excedente, trabalhos com melhores rendimentos na cadeia leiteira podem ser alcançados, pela diminuição dos custos de produção, uma vez que o aumento de preços, nem sempre favorecem o proprietário. Os custos podem ser mitigados, pela melhoria da qualidade do leite, sem resíduos e pela eliminação da mastite do rebanho (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

O objetivo principal de um programa de qualidade do leite é assegurar as qualidades nutricionais, sabor e aparências originais do produto. Os consumidores exigem que os alimentos, incluindo os produtos lácteos, sejam seguros, sem resíduos, nutritivos e frescos ao consumo. Glândulas mamárias infeccionadas no rebanho, por micro-organismos patogênicos, são a principal causa da perda qualidade do leite e do descarte lácteo (ALMEIDA, 1998; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

A qualidade do leite recebido pelas indústrias de processamento é determinada pela condição do leite que sai das propriedades e das cooperativas coletoras, pois, os laticínios não melhoram as características do produto cru recebido. Mesmo a pasteurização e outros tratamentos realizados nas usinas processadoras, são incapazes de inativar enzimas e toxinas proteicas liberadas pelos agentes infecciosos. Assim, esses resíduos microbianos estarão presentes nos produtos lácteos e continuarão a degradar proteínas, carboidratos e substâncias lipídicas presentes no leite (ALMEIDA, 1998; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Na cadeia de processamento e consumo do leite, todos os envolvidos devem ser favorecidos. Os consumidores por ter acesso a produtos mais nutritivos, seguros, duráveis e com melhor aroma e sabor. Os laticínios, ao receber produtos de melhor qualidade, favorecem o aumento do consumo, a

adesão de clientes e maior lucratividade. Os fornecedores ou produtores de leite são beneficiados pelo aumento da demanda do produto, decorrendo em melhores preços, poder de negociação e maiores rendimentos (ALMEIDA, 1998; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

A mastite é a doença de maior importância nos sistemas de exploração pecuária e interfere acentuadamente em toda cadeia da produção leiteira mundial, pela redução da capacidade produtiva dos rebanhos contaminados. Além disso, é importante relacionar a patogenia com a saúde pública, pela veiculação de agentes infecciosos e suas toxinas, assim como os resíduos de antibióticos. As perdas na produção leiteira aproximam-se de 70% do total dos custos com a mastite, estão incluídos gastos com antibióticos, descarte do leite, o rejeito prematuro de animais, trabalho extra, decréscimo na qualidade do leite, reposição de animais, entre outros (SILVA, 1999).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, em setembro de 2002, na Instrução Normativa N° 51 (BRASIL, 2002), determinou os padrões de identidade e requisitos mínimos de qualidade para o leite cru refrigerado dos tipos A, B e C, produzidos nas propriedades rurais e para o leite cru refrigerado, bem como o transporte. A legislação engloba parâmetros físico-químicos e microbiológicos, a estrutura de produção, a higiene e a sanidade do rebanho (BRASIL, 2002).

A Instrução Normativa N° 51 (BRASIL, 2002), está em vigor. Desse modo, é imperativo que os produtores da bacia leiteira da região do Norte do Estado de Minas Gerais sigam as diretrizes descritas na lei, para alçar mercados consumidores exigentes e rentáveis, bem como entrar em um mercado extremamente competitivo, na busca de lucratividade. Atender às normas vigentes significa, para os produtores da região, a obtenção de um produto lácteo de qualidade e isento de contaminantes, sejam esses microorganismos infecciosos causadores da mastite e suas toxinas, causadoras de zoonoses. Procedimentos e cuidados específicos devem ser cumpridos, para garantir a isenção dos níveis residuais de tratamentos antibióticos, possíveis seletores de resistência dos patógenos e indutores das reações

de hipersensibilidade nos consumidores (ALMEIDA, 1998; PHILPOT; NICKERSON, 2002; SILVA, 1999).

O princípio norteador e catalisador dos esforços no controle das infecções intramamárias dentro de um rebanho é a adoção de medidas preventivas. Nesse programa de controle, uma série de etapas e ações devem ser seguidas, para evitar uma porcentagem substancial de novos casos da doença, a eliminação de novos focos e a flexibilidade para modificações do projeto, na medida em que novos métodos de controle forem sendo desenvolvidos pela pesquisa. Assim, as práticas de controle, para o pequeno e médio produtor têm como premissas serem eficazes para a maioria dos rebanhos, de aplicação simplificada sob uma ampla faixa de circunstâncias e não exigir investigações ou assistência de especialistas no local. Com os métodos objetiva-se fornecer ao produtor formas fáceis e práticas de controle contínuo, eficácia em ampla faixa de condições ambientais, redução de novos casos e, se possível, a obtenção de lucros (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Os programas de controle da mastite em animais de importância econômica baseiam-se no triângulo: ordenha, higiene, tratamento. Vários são os protocolos propostos para controlar a doença e esses devem ser práticos, efetivos, baratos e possuir como objetivo principal o controle ou erradicação das formas contagiosas e manter baixos os índices dos casos ambientais. De maneira grosseira, podemos separar as práticas de controle das infecções mamárias em preventivas e curativas (BEEKHUIS-GIBBON *et al.*, 2011a; BEEKHUIS-GIBBON *et al.*, 2011b; CAC/RCP, 2003; CAC/RCP, 2004; LESLIE, 2004; MÜLLER, 1999).

O tratamento da mastite deve ser um dos pontos chave de um programa global a ser realizado em cada propriedade rural, sendo imprescindível a visão holística da patologia, das suas causas e dos agentes infecciosos causadores. Suas metas são: o maior retorno econômico, a eficiência dos tratamentos, a redução das novas e a menor duração das infecções existentes e a diminuição dos casos clínicos e subclínicos de mastite (COSTA; WATANABE, 1999).

Dentro de um programa de erradicação da mastite, a prevenção e o controle dos novos casos devem ser as primeiras opções. Os principais pontos de controle da mastite são: a higienização dos tetos e das mãos do ordenhador, a manutenção dos equipamentos de ordenha, o uso de antisséptico antes e após as ordenhas, a ordenha dos animais infectados por último, o tratamento e a eliminação das lesões nos tetos, a separação das vacas persistentemente infectadas, a terapia apropriada dos casos clínicos e o uso de antibiótico em todos os tetos na secagem e o descarte das vacas com mastites crônicas recorrentes (QUINN *et al.*, 2005; COSTA; WATANABE, 1999; SANTOS; FONSECA, 2007).

Quando o animal não foi acometido pela doença as práticas preventivas são recomendadas, entre elas estão à contratação de mão de obra especializada e o treinamento dos ordenhadores em princípios de higiene, em fisiologia da lactação, no funcionamento e manutenção dos equipamentos de ordenha. O monitoramento dos índices de mastite é mandatório para a profilaxia no rebanho, sendo fundamental a contagem do número de células somáticas, o teste da caneca, os índices de mastite clínica e subclínica, além do perfil microbiológico e de resistência aos antibióticos (BEEKHUIS-GIBBON *et al.*, 2011a; BEEKHUIS-GIBBON *et al.*, 2011b; CAC/RCP, 2003; CAC/RCP, 2004; LESLIE, 2004; MÜLLER, 1999).

A manutenção da higiene e do manejo da ordenha e o conforto ambiental são outros pontos chaves da prática preventiva. O tratamento de todas as vacas do rebanho no dia da secagem é determinante da prevenção de novas infecções no período seco. A imersão dos tetos em solução antisséptica antes e após as ordenhas, técnica conhecida como pré e pós *dipping*. Higienização e manutenção dos equipamentos de ordenha. E por final a vacinação dos animais, principalmente contra a mastite ambiental por coliformes (BEEKHUIS-GIBBON *et al.*, 2011a; BEEKHUIS-GIBBON *et al.*, 2011b; CAC/RCP, 2003; CAC/RCP, 2004; LESLIE, 2004; MÜLLER, 1999).

A mastite causada por agentes infecciosos é relacionada aos maiores prejuízos para a produção leiteira no mundo. A antibioticoterapia é o único método comprovado para o tratamento dessa doença, porém, geralmente

as terapias são pouco eficazes e necessitam de grandes doses e um prolongado período de descarte do leite dos animais tratados. Ainda assim existe o risco do leite chegar ao consumidor final com resíduos de antibióticos, indutores de reações de hipersensibilidade, podendo ser os prováveis selecionadores de resistência dos patógenos aos agentes antimicrobianos (LIMA, 2001; MUKHERJEE, 2009).

Por isso é importante recomendar o uso racional dos antibióticos no tratamento da mastite, para obtenção da eficácia terapêutica e os benefícios econômicos para a cadeia de produção do leite, de forma a não acarretar presença de resíduos nos alimentos e inviabilizar a seleção de resistência dos micro-organismos, pois, o tratamento medicamentoso ideal contra a mastite, seria aquele que pudesse controlar todas as infecções do úbere e não deixassem resíduos no leite, porém esta situação é praticamente inalcançável (QUINN *et al.*, 2005; COSTA; WATANABE, 1999).

Nas práticas curativas, ou seja, quando a vaca esta infectada pelo patógeno, existem duas formas importantes de terapia: o tratamento da vaca seca, não como prevenção, mas quando o animal foi acometido pela doença, assim, esse deve ser tratado no dia seguinte à secagem, com finalidade de cura de infecções subclínicas possivelmente presentes. E o tratamento da mastite clínica, cujos casos devem ser tratados imediatamente, sob a prescrição e a orientação de um médico veterinário e levar em consideração o perfil microbiológico e de sensibilidade, a dose e a via de aplicação (BEEKHUIS-GIBBON *et al.*, 2011a; BEEKHUIS-GIBBON *et al.*, 2011b; CAC/RCP, 2003; CAC/RCP, 2004; LESLIE, 2004; MÜLLER, 1999).

A mastite clínica deve ser tratada tão logo seja diagnosticada, independentemente se ocorrer ou não no período de lactação. Caso a infecção não responda ao tratamento com antibiótico, deverão ser realizados testes de antibiograma. O sucesso do tratamento da mastite clínica na lactação varia entre 40% a 70%, por causa da susceptibilidade do agente às drogas ministradas, da duração da infecção, da idade do animal e do grau de acometimento do tecido da glândula mamária (CORBELLINI, 1996; COSTA; WATANABE, 1999).

O tratamento da mastite subclínica na lactação pode ser realizado por meio da “blitz” terapia. Esse protocolo é adotado quando *Streptococcus agalactiae* infecta mais que 25% dos animais. Assim, o rebanho é diagnosticado e tratado corretamente. A terapia da “vaca seca” deve ainda ser realizada em todas as matrizes no momento da secagem do leite, ao final do período de lactação. No dia especificado para a interrupção da lactação é feita a infusão intramamária do produto comercial antibiótico específico, de amplo espectro e longos períodos de ação. A prática previne a ocorrência de novas infecções e promove maior taxa de cura das infecções remanescentes da lactação anterior (DEBUF, 1991; SANTOS; FONSECA, 2007).

Geralmente, são empregados os tratamentos com a utilização da antibioticoterapia nas práticas curativas, da vaca seca e da mastite clínica. O uso de antibióticos é o procedimento mais utilizado na mastite bovina, entretanto, são verificados insucessos, pois, a obtenção de níveis de antibióticos efetivos no leite, pelas rotas sistêmicas ou intramamárias é de difícil obtenção (REBHUN *et al*, 2000).

Os antibióticos administrados sistemicamente devem atingir o úbere e ser capazes de alcançar concentrações inibitórias no leite, ser administrados nas dosagens e frequências efetivas e por tempo suficiente para eliminar os agentes infecciosos com sucesso. Já os antibióticos intramamários devem difundir-se efetivamente no interior da glândula, através do epitélio dutular e funcionar na presença do leite e de resíduos inflamatórios (REBHUN *et al*, 2000).

A eficácia clínica da antibioticoterapia é de difícil quantificação, pois, se confunde com novas infecções do animal, e pode ser entendida pelo produtor como uma falha no tratamento empregado. Desse modo, podem ocorrer respostas na terapêutica, tais como: variações das respostas individuais aos tratamentos, dos agentes infecciosos em relação às cepas envolvidas, dos sítios infectados na glândula mamária, da severidade da infecção da glândula e da fase da infecção (REBHUN *et al*, 2000).

O tratamento antimicrobiano deve sempre ser escolhido, com base nos testes de sensibilidade empregados sobre a cepa contaminante, uma

vez que um medicamento não age da mesma forma contra todos os agentes infecciosos. Apesar do elevado número de antibióticos disponíveis ao consumidor para o tratamento da mastite e seus diferentes espectros de ação, a resistência dos agentes infecciosos aos antibióticos empregados na terapêutica da mastite bovina é um grave e crescente problema, principalmente devido ao uso indiscriminado da terapia antimicrobiana (COSTA, 1999, citado por PINTO, 2000).

Por causa das baixas taxas de cura dos tratamentos convencionais e a resistência dos agentes infecciosos aos antibióticos comumente empregados, principalmente durante a lactação, tem-se buscado estratégias para melhorar os resultados dos tratamentos. As principais alternativas aos tratamentos convencionais são: a terapia combinada sistêmica e intramamária, a terapia estendida, ou seja, o aumento da duração do tratamento por antibiótico, o uso combinado de vacinação e tratamento intramamário e a utilização de terapias alternativas, como os medicamentos fitoterápicos empregados isoladamente ou combinados com as terapias antimicrobianas sistêmicas e intramamárias (ALMEIDA, 1998; COSTA; WATANABE, 1999; SANTOS; FONSECA, 2007; REBHUN *et al*, 2000; PHILPOT; NICKERSON, 2002; SILVA, 1999).

Segundo Schuch (2007), o emprego da fitoterapia na atenção primária e secundária na medicina veterinária vem ganhando espaço. Durante a década de 70 do século XX, as indústrias de recepção e processamento do leite, os veterinários, os órgãos de defesa do consumidor, as autoridades de saúde pública e as agências reguladoras da qualidade do leite começaram a expressar preocupação com a presença de resíduos, associada à controvérsia sobre a eficácia dos antibióticos no leite das vacas tratadas contra a mastite (RODOSTIST *et al.*, 2002).

### **3.3 O emprego das plantas medicinais na mastite bovina**

Na antibioticoterapia contra a mastite são verificados insucessos recorrentes pelas rotas sistêmicas ou intramamárias, pois, a obtenção de níveis efetivos de antibióticos no leite é difícil (REBHUN *et al*, 2000). A

eficácia clínica do tratamento é de quantificação complicada, pois, pode ser confundida como nova infecção no animal, e entendida pelo produtor como falha do protocolo. Apesar de diversas classes de antibióticos disponíveis e dos diferentes espectros de ação, para o tratamento da mastite, a resistência dos agentes infecciosos aos princípios ativos empregados é crescente, possivelmente associada ao uso indiscriminado (COSTA, 1999, citado por PINTO, 2000; LIMA, 2001).

Durante a década de 70, os laticínios, os veterinários, os órgãos de defesa do consumidor, as autoridades de saúde pública e as agências reguladoras da qualidade do leite começaram a se preocupar com os resíduos de produtos químicos no leite, associados à controvérsia sobre a eficácia tratamentos das vacas em lactação e a possibilidade de resistência microbiana (RODOSTIST *et al.*, 2002). Assim, a importância da fitoterapia na atenção primária e secundária na medicina veterinária vem crescendo desde aquela época (SCHUCH, 2007).

Dessa forma, a produção de alimentos de origem animal alicerçada na alta tecnologia, em criações intensivas, no uso indiscriminado de produtos químicos, os quais podem resultar em resíduos nos alimentos, com potencial risco à saúde dos consumidores começou a ser questionada e atualmente, alguns agricultores e veterinários usam fitoterápicos para a prevenção e o controle da mastite bovina (SCHUCH, 2007).

É importante que o leite, seus derivados, bem como qualquer alimento de origem animal não contenham resíduos proibitivos de antibióticos, desinfetantes ou sanitizantes, porque essas substâncias podem ser prejudiciais à saúde dos consumidores e ainda interferir na fabricação de derivados de origem animal, onerando a cadeia produtiva (ALMEIDA, 1998).

O intuito da indicação dos fitoterápicos para animais é aumentar as opções para os profissionais veterinários, com a oferta de medicamentos registrados, sem substituir os convencionais. Possivelmente, os fármacos vegetais seriam mais acessíveis economicamente, com espectros de ação adequados, indicações terapêuticas complementares às existentes e



obedecem estritamente aos preceitos éticos do emprego de xenobióticos nos animais (LAPA *et al.*, 2007).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o medicamento fitoterápico é aquele obtido com o emprego exclusivo de matérias-primas vegetal e caracterizando pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do uso, assim como, pela reprodutibilidade e constância da qualidade. A eficácia e segurança são validadas pelos levantamentos etnofarmacológicos de uso, por documentações científicas ou ainda por ensaios clínicos. Dessa forma, não é considerado medicamento fitoterápico, os formulados com substâncias ativas isoladas e associações dessas com extratos vegetais (BRASIL, 2004a).

A etnofarmacologia é intrínseca à fundamentação teórica e prática da fitoterapia, para relacionar as informações das comunidades locais, com os estudos químicos e farmacológicos especializados, pois, o método etnofarmacológico prevê o estudo das substâncias ativas e da farmacodinâmica da flora medicinal, a partir dos relatos das populações tradicionais usuárias (ELISABETSKY; SOUZA, 2007).

Nesse enfoque etnofarmacológico, a pesquisa de novos bioativos pode promover a inclusão das comunidades locais na cadeia produtiva dos fitoterápicos, nos lucros gerados e abrangê-las desde cultivo das plantas, até a venda ao consumidor. Com essa perspectiva, os projetos poderiam integrar as comunidades locais, detentoras do saber tradicional para a atenção à saúde animal, aos possuidores do conhecimento técnico e científico moderno, capazes de transformá-lo em novos produtos e tecnologia geradora de riqueza. Entretanto, sem desvalorizar a sabedoria local e empírica, de forma a socializar o saber, a aplicação e estimular o desenvolvimento sustentável, culturalmente aceito e economicamente viável (ELISABETSKY; SOUZA, 2007; GLIESSMAN, 2001; LAPA *et al.*, 2007; SCHUCH, 2007).

As substâncias químicas ocorrem naturalmente nos vegetais e são fonte contínua de medicamentos, desde os tempos mais antigos. Historicamente, a experimentação distinguiu as plantas com efeitos

benéficos à saúde animal, daquelas que são tóxicas ou inertes. Pela tentativa e erro, os seres humanos conseguiram aliviar sintomas e diminuir a ocorrência de doenças. Mundialmente, as plantas medicinais são importantes na saúde primária, especialmente para as populações mais carentes e seus rebanhos, pois, muitas vezes, essas populações recorrem aos conhecimentos etnoveterinários e entofarmacológicos, para o tratamento de seus animais (HEYMAN *et al.*, 2009; LIMA, 2001).

Os antibióticos ou antimicrobianos são sinônimas e designam substâncias sintetizadas em laboratórios ou oriundas de seres vivos, microorganismos ou vegetais. Desde o princípio das civilizações, as plantas têm sido utilizadas como fonte medicamentosa, e com o advento da farmacognosia, da farmacologia e da ecologia bioquímica, foi atribuída às substâncias ativas vegetais importância relevante nos mecanismos de defesa das mesmas contra os predadores, como fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos e animais superiores (LIMA, 2001).

O potencial dos vegetais em fornecer estruturas para a produção de fármacos específicos e de amplo espectro terapêutico pode ser grande. As substâncias ativas capazes de inibir o crescimento microbiano são as fitoalexinas, resultantes da interação do metabolismo vegetal junto aos parasitas. Os compostos do metabolismo secundário são as matérias-primas para a síntese das fitoalexinas. A identificação, o isolamento e a purificação dessas substâncias é o primeiro passo para a síntese em laboratório, por vias mais rápidas e menos onerosas do que a extração *in natura*, levando em consideração a preservação da biodiversidade (HÄNSEL *et al.*, 2002; LIMA, 2001).

Os metabólitos secundários com funções antimicrobianas, comumente encontrados nos vegetais são: alcaloides, flavonoides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, antraquinonas, poliacetilenos e óleos essenciais. Os mecanismos de ação desses compostos são similares aos antibióticos convencionais, tais como, a lesão da parede celular, as alterações da permeabilidade da membrana, as modificações nas moléculas proteicas e nos ácidos nucleicos, a inibição da produção de ácidos nucleicos e o poder oxidante (HÄNSEL *et al.*, 2002; SANTOS, 2007).

O conhecimento e emprego de determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido aos problemas associados aos antibióticos, como os resíduos nos alimentos, as reações de hipersensibilidade e a resistência microbiana. Assim, a utilização das plantas medicinais, como terapia alternativa aos medicamentos sintéticos hoje ministrados é cada vez mais estudada (HÄNSEL *et al.*, 2002; LIMA, 2001).

Os testes *in vitro* são as formas mais comuns para verificar o potencial bactericida e bacteriostático das plantas medicinais, provavelmente, pelo seu menor custo e pelas respostas rápidas e efetivas. A metodologia mais utilizada nos exames foi a diluição seriada das substâncias ativas e dos micro-organismos patogênicos, geralmente, cepas padrões causadores das mastites bovinas ou isoladas dos quartos mamários de vacas infectadas. Outro método de avaliação empregado foi o antibiograma tradicional, ou seja, a difusão dos ativos a partir de discos impregnados com os mesmos (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001; BASKARAN *et al.*, 2009; AVANCINI *et al.*, 2008; DUBAL *et al.*, 2009; HEYMAN *et al.*, 2009; PINTO, 2000; SCHUCH, 2007).

A decocção com água destilada ou a extração com solventes orgânicos (alcoóis etílico e metílico) foram as formas de preparo das plantas medicinais mais empregadas, com a partição em água destilada. As diluições dos extratos em água destilada (v/v) oscilaram entre 50% a 90% (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001; GIACINTI *et al.*, 2008; BASKARAN *et al.*, 2009; AVANCINI *et al.*, 2008; DUBAL *et al.*, 2009; HEYMAN *et al.*, 2009; SCHUCH, 2007).

Nas diluições seriadas verificou-se a associação entre as diferentes concentrações dos extratos e dos decoctos vegetais com as dos micro-organismos, pois, provavelmente, nesses estudos, empregaram-se os testes de susceptibilidade para prognosticar a probabilidade de êxito terapêutico de uma preparação vegetal com poder antibiótico (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001; GIACINTI *et al.*, 2008; BASKARAN *et al.*, 2009; AVANCINI *et al.*, 2008; HEYMAN *et al.*, 2009; MARTINEZ, 2009; SCHUCH, 2007).

As ferramentas para avaliar a atividade do vegetal e sua diluição frente ao micro-organismo alvo são: a concentração inibitória mínima - CIM e a concentração bactericida mínima - CBM. Por meio desses testes, a relação entre as diluições do extrato ou decocto vegetal e dos micro-organismos é ajustada, obtendo-se a susceptibilidade da bactéria à preparação (MARTINEZ, 2009).

A concentração inibitória mínima - CIM é a menor concentração empregada do agente antimicrobiano, que inibe o crescimento visível, sejam colônias em uma placa ou a turbidez da cultura em caldo, sob condições padronizadas do protocolo testado. A concentração bactericida mínima - CBM caracteriza-se pela aplicação, da menor concentração do produto biocida, que inviabiliza ou inativa, taxas superiores a 99,9% dos micro-organismos em teste *in vitro* (MARTINEZ, 2009).

A capacidade das preparações vegetais em causar a morte ou de inviabilizar a multiplicação do patógeno, foi verificada pela turvação do meio de cultura, com as diversas diluições do micro-organismo e dos preparados vegetais. A turvação ou turbidez dos meios cultura, líquidos ou sólidos, são indicativos da multiplicação de micro-organismos no substrato. Quando, portanto, não se observa a turbidez nos meios de cultivo, junto aos extratos, demonstra-se a inviabilidade de crescimento celular, para as mesmas condições do teste, quando comparadas aos cultivos, sem as soluções vegetais (BASKARAN *et al.*, 2009; AVANCINI *et al.*, 2008; HEYMAN *et al.*, 2009; SCHUCH, 2007).

No antibiograma, realizado em discos com sobre camada em meio de cultura, constatou-se a associação entre as diluições dos extratos e as dos micro-organismos. Foram utilizadas as medidas de CIM e CBM para a verificação da susceptibilidade e da resistência dos micro-organismos. A capacidade das preparações vegetais em inviabilizar o patógeno foi obtida pela presença e pelo tamanho do halo de inibição formado ao redor dos discos impregnados com as mesmas (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001; DUBAL *et al.*, 2009; PINTO, 2000).

O QUADRO 4 representa a compilação da literatura pesquisada a respeito das plantas medicinais empregadas nos testes *in vitro*, frente aos micro-organismos causadores das mastites.

QUADRO 4

Espécies e nomes populares de plantas medicinais, tipos de testes utilizados no tratamento da mastite bovina *in vitro*, patógenos sensíveis e referências

(Cotinua)

| Planta                           | Nome popular        | Tipo do teste    | Patógenos sensíveis             | Referência                    |
|----------------------------------|---------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| <i>Baccharis trimera</i>         | Carqueja            | Diluição seriada | <i>Staphylococcus coagulase</i> | Schuch (2007)                 |
| <i>Bidens pilosa</i>             | Picão Preto         | CIM CBM          | positiva                        |                               |
| <i>Eucalyptus sp.</i>            | Eucalipto           |                  | <i>Staphylococcus coagulase</i> |                               |
| <i>Polygonum punctatum</i>       | Erva de bicho       |                  | negativa                        |                               |
| <i>Tagetes minuta</i>            | Cravo de defunto    |                  | <i>Streptococcus spp</i>        |                               |
| <i>Alternanthera brasiliiana</i> | Acônito do mato     | Diluição seriada | <i>Staphylococcus aureus</i>    | Avancini <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Achillea millefolium</i>      | Mil folhas          | CIM CBM          | <i>Salmonella choleraesuis</i>  |                               |
| <i>Baccharis trimera</i>         | Carqueja            |                  |                                 |                               |
| <i>Solidago chilensis</i>        | Arnica              |                  |                                 |                               |
| <i>Symphytum officinale</i>      | Confrei             |                  |                                 |                               |
| <i>Sambucus nigra</i>            | Sabugueiro          |                  |                                 |                               |
| <i>Mentha sp.</i>                | Hortelã , menta     |                  |                                 |                               |
| <i>Ocimum basilicum</i>          | Manjericão          |                  |                                 |                               |
| <i>Parapiptadenia rígida</i>     | Angico              |                  |                                 |                               |
| <i>Cuphea carthagenensis</i>     | Sete sangrias       |                  |                                 |                               |
| <i>Artemísia vulgaris</i>        | Erva de São João    | Antibiograma     | <i>Escherichia coli</i>         | Dubal <i>et al.</i> (2009)    |
| <i>Eupatorium cannabinum</i>     | Trevo cervino       | difusão em       |                                 |                               |
| <i>Astilbe rivularis</i>         | Falsa barba d. bode | discos.          |                                 |                               |
| <i>Aloe barbadensis</i>          | Babosa              | halo de inibição |                                 |                               |
| <i>Kaempferia rotunda</i>        | Canaga do Japão     |                  |                                 |                               |
| <i>Schima wallichii</i>          | Árvore agulha       |                  |                                 |                               |

QUADRO 4

Espécies e nomes populares de plantas medicinais, tipos de testes utilizados no tratamento da mastite bovina *in vitro*, patógenos sensíveis e referências

(continua)

| Planta  | Nome popular   | Tipo do teste   | Patógenos sensíveis  | Referência                    |
|---|--|---|--|-------------------------------|
| <i>Melianthus major</i><br><i>Melianthus comosus</i><br><i>Dodonaea angustifolia</i><br><i>Withania somnifera</i> | Flor de mel<br>-<br>Vassoura d. campo<br>Ginseng indiano | Diluição seriada<br>CIM CBM                               | <i>Staphylococcus aureus</i>   | Heyman <i>et al.</i> (2009)   |
| <i>Persicaria senegalense</i>   | -  | Antibiograma<br>difusão em<br>discos.<br>halo de inibição | <i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Candida albicans</i><br><i>Corynebacterium bovis</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Abaineh; Sintayehu (2001)     |
| <i>Cinnamomum verum</i><br><i>Origanum glandulosum</i><br><i>Eugenia caryophyllus</i>                             | Canela<br>Orégano<br>Cravinho da Índia                   | Diluição seriada<br>CIM CBM                               | <i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Streptococcus spp</i><br><i>Escherichia coli</i>                                      | Baskaran <i>et al.</i> (2009) |

QUADRO 4

Espécies e nomes populares de plantas medicinais, tipos de testes utilizados no tratamento da mastite bovina *in vitro*, patógenos sensíveis e referências (continuação)

(Conclusão)

| Planta                             | Nome popular          | Tipo do teste  | Patógenos sensíveis   | Referência  |
|------------------------------------|-----------------------|--|---|---|
| <i>Stryphnodendron adstringens</i> | Barbatimão verdadeiro | Diluição seriada CIM<br>CBM.<br>Antibiograma<br>difusão em discos.<br>halo de inibição | <i>Candida albicans</i><br><i>Candida parapsilosis</i><br><i>Candida krusei</i><br><i>Candida tropicalis</i><br><i>Staphylococcus</i> coagulase positiva<br><i>Staphylococcus</i> coagulase negativa<br><i>Staphylococcus</i> esculina positiva<br><i>Staphylococcus</i> esculina negativa<br><i>Manheymia haemolytica</i><br><i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Staphylococcus epidermidis</i><br><i>Escherichia coli</i><br><i>Cryptococcus neoformans</i><br><i>Trychophyton rubrum</i><br><i>Enterococcus faecalis</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Streptococcus agalactiae</i><br><i>Streptococcus salivarius</i><br><i>Streptococcus sanguinis</i><br><i>Streptococcus mitis</i><br><i>Streptococcus mutans</i><br><i>Streptococcus salvinus</i><br><i>Lactobacillus casei</i> | Souza <i>et al.</i> (2007b)<br>Espindola <i>et al.</i> (2009)<br><br>Xavier <i>et al.</i> (2008)<br><br><br><br><br>Souza <i>et al.</i> (2007a)<br><br>Ishida <i>et al.</i> (2009)<br>Espindola <i>et al.</i> (2009)<br>Soares <i>et al.</i> (2008) |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.



Nos trabalhos *in vivo*, as seguintes variáveis foram testadas: plantas medicinais, vias de administração, micro-organismos sensíveis, micro-organismos resistentes, mecanismos de reações das substâncias ativas no metabolismo animal, tempo do tratamento, contagem de células somáticas no leite dos grupos estudados, respostas fisiológicas às preparações testadas e concentrações e respostas dos agentes infecciosos frente aos diferentes extratos (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001; GIACINTI *et al.*, 2008; BURAGOHAIN; DUTTA, 1998; MADAN *et al.*, 1996; MUKHERJEE *et al.*, 2005; MUKHERJEE, 2009; MUKHERJEE, 2006; VERMA; NAURIYAL, 2009; PRADHAN, 1999; RAHMAN; SHARNA, 2000).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana das plantas sobre os agentes infecciosos causadores da mastite, realizaram-se testes *in vivo* e *in vitro*. Em todos os experimentos utilizaram-se controles negativos para os agentes infecciosos e positivos, os animais infectados. Assim, os indivíduos acometidos pela mastite, quando tratados com as preparações vegetais, deveriam alcançar os parâmetros do grupo não infectado para serem classificados como curados e/ou livres da moléstia (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001; GIACINTI *et al.*, 2008; BURAGOHAIN; DUTTA, 1998; MADAN *et al.*, 1996; MUKHERJEE *et al.*, 2005; MUKHERJEE, 2009; MUKHERJEE, 2006; VERMA; NAURIYAL, 2009; PRADHAN, 1999; RAHMAN; SHARNA, 2000).

Os principais mecanismos de eliminação da mastite pelas preparações vegetais foram diretos, quando o princípio ativo do vegetal atuou na estrutura do micro-organismo infectante, causou a morte ou a inibição dos processos reprodutivos e de multiplicação celular; ou indiretos, como imunomoduladores, na indução do aumento das células de defesa, que destroem ou inibem os patógenos, pela produção de substâncias tóxicas ao parasito, como a interleucina-2; ou por ação fagocitária dos leucócitos e macrófagos (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001; GIACINTI *et al.*, 2008; BURAGOHAIN; DUTTA, 1998; MADAN *et al.*, 1996; MUKHERJEE *et al.*, 2005; MUKHERJEE, 2009; MUKHERJEE, 2006; VERMA; NAURIYAL, 2009; PRADHAN, 1999; RAHMAN; SHARNA, 2000).

As principais vias de administração utilizadas nos experimentos *in vivo* foram: a oral, a tópica intramamária ou a aplicação na pele dos tetos.

Empregaram-se formas farmacêuticas variadas, desde plantas medicinais *in natura*, fornecidas junto à dieta do animal, como o gel cutâneo e infusões intramamárias (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001, 2001; GIACINTI *et al.*, 2008; BURAGOHAIN; DUTTA, 1998; MADAN *et al.*, 1996; MUKHERJEE *et al.*, 2005; MUKHERJEE, 2009; MUKHERJEE, 2006; VERMA; NAURIYAL, 2009; PRADHAN, 1999; RAHMAN; SHARNA, 2000).

O principal teste presuntivo realizado para determinação do grau de infecção das vacas foi à contagem de células somáticas (CCS) do leite produzido. Além desse, foram utilizados o *California Mastitis Test (CMT)*, o *Modified Aulendorfer Mastitis Probe*, o *Mastitis Detection Strip* e a Contagem de Bactérias Totais. Os valores obtidos foram avaliados sempre antes e após os tratamentos com as preparações vegetais (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001; GIACINTI *et al.*, 2008; BURAGOHAIN; DUTTA, 1998; MADAN *et al.*, 1996; MUKHERJEE *et al.*, 2005; MUKHERJEE, 2009; MUKHERJEE, 2006; VERMA; NAURIYAL, 2009;; PRADHAN, 1999; RAHMAN; SHARNA, 2000).

Definiram-se as indicações, a via de administração, as posologias, as concentrações e a duração da terapêutica com as preparações vegetais consideradas satisfatórias para o tratamento da mastite com base nos resultados da CCS, no tempo de tratamento, nas concentrações das preparações vegetais utilizadas e nos agentes infecciosos envolvidos na mastite (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001; GIACINTI *et al.*, 2008; BURAGOHAIN; DUTTA, 1998; MADAN *et al.*, 1996; MUKHERJEE *et al.*, 2005; MUKHERJEE, 2009; MUKHERJEE, 2006; VERMA; NAURIYAL, 2009; PRADHAN, 1999; RAHMAN; SHARNA, 2000).

Para o tratamento *in vivo* a base de uma ou várias plantas medicinais, considerou-se a resposta satisfatória quando, no grupo de vacas comprovadamente infectadas com micro-organismos causadores de mastite, ocorreu a diminuição significativa na CCS, em relação ao controle negativo (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001; GIACINTI *et al.*, 2008; BURAGOHAIN; DUTTA, 1998; MADAN *et al.*, 1996; MUKHERJEE *et al.*, 2005; MUKHERJEE, 2009; MUKHERJEE, 2006; VERMA; NAURIYAL, 2009; PRADHAN, 1999; RAHMAN; SHARNA, 2000).

No QUADRO 5 são mostradas as espécies vegetais empregadas pelos pesquisadores no tratamento da mastite *in vivo*, a via de administração e os micro-organismos sensíveis.

QUADRO 5

Espécies e nomes populares de plantas medicinais e vias de administração utilizadas no tratamento da mastite bovina *in vivo*, patógenos sensíveis e referências

(Continua)

| Planta (Espécie)          | Nome popular                          | Via de administração    | Patógenos sensíveis ao teste  | Referência   |
|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---|--|
| <i>Ocimum sanctum</i>     | Manjeriçãõ santo<br>Basílico<br>Basil | Infusão<br>Intramamária | <i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Streptococcus</i> spp.<br><i>Mycobacterium phlei</i><br><i>Micrococci</i> sp.      | Mukherjee <i>et al.</i> (2005)<br>Mukherjee (2006) |
| <i>Azadirachta indica</i> | <i>Neem</i><br>Nim                    | Infusão<br>Intramamária | <i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Streptococcus</i> spp.<br><i>Streptococcus agalactiae</i><br><i>Micrococci</i> sp. | Mukherjee (2009)                                   |

QUADRO 5

Espécies e nomes populares de plantas medicinais e vias de administração utilizadas no tratamento da mastite bovina *in vivo*, patógenos sensíveis e referências

(conclusão)

| Planta (Espécie)  | Nome popular  | Via de administração                     | Patógenos sensíveis ao teste  | Referência   |
|---|---|--|---|--|
| <i>Spiraea ulmaria</i><br><i>Astragalus membranaceus</i>  | Erva ulmeira<br><i>Huang-qi</i>   | Oral                                     | <i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Streptococcus</i> spp.<br><i>Streptococcus agalactiae</i>  | Giacinti <i>et al.</i> (2008)  |
| <i>Persicaria senegalense</i>   | -   | Oral                                     | <i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Candida albicans</i><br><i>Corynebacterium bovis</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Abaineh; Sintayehu (2001)  |
| <i>Glycyrrhiza glabra</i><br><i>Curcuma longa</i><br><i>Cedrus deodara</i><br><i>Paederia foetida</i> | Alcaçuz<br>Açafrão da terra<br>Cedro Himalaia<br>Erva de gambá<br>Erva fedorenta<br>Erva de febre | Tópico – gel<br>Mastilep<br>(AV/AMP/14)® | <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva<br><i>Staphylococcus</i> coagulase negativa<br><i>Streptococcus</i> spp.<br><i>Corynebacterium pyogenes</i><br>Coliformes ( <i>Escherichia coli</i> ,<br><i>Klebsiella</i> sp.e <i>Bacillus</i> sp.) | Buragohain; Dutta (1998)<br>Rahman; Sharma (2000)<br>Pradhan (1999)<br>Madan <i>et al.</i> (1996)<br>Verma; Nauriyal, (2009)<br>Mukherjee (2006) |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

### 3.4 *Stryphnodendron adstringens*

Com base nos dados teóricos referendados, a respeito do conhecimento etnofarmacológico, é possível prever que a utilização de plantas nativas do Cerrado do Norte do Estado de Minas Gerais é uma promissora área para pesquisas de substâncias com atividades antibióticas. Dado às condições edafoclimáticas da região, que propiciam a produção de metabólitos secundários e consequente produção de bioativos (AUDI, *et al.*, 2004; CASTELLANI *et al.*, 2000; BATISTA *et al.*, 2006; *et al.*, 2003; SANTOS; MELLO, 2007; SANTOS, 2007).

A espécie *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae-Mimosoidae é nativa do Cerrado mineiro e popularmente conhecida como “barbatimão”. Os metabólitos secundários encontrados principalmente no súber do vegetal apresentam atividades antimicrobianas e cicatrizantes, sendo os taninos um exemplo clássico dessas substâncias (SOARES *et al.*, 2008; HOLETZ *et al.*, 2005; OLIVEIRA; FIGUEIREDO, 2007; ISHIDA *et al.*, 2009; MELLO, 1997). As cascas de *S. adstringens* possuem entre 8% a 20% em taninos totais (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002), isolados e identificados por extratos, com solventes de polaridades crescentes (SANTOS *et al.*, 2002; HASLAM, 1996; MELLO *et al.*, 1996a; MELLO *et al.*, 1996b; MELLO, 1997; SANTOS; MELLO, 2007).

As populações locais utilizam a infusão e o decoto de *Stryphnodendron adstringens* como adstringente, antimicrobiano, homeostático, antidiarreico, anti-hipertensivo, coagulante sanguíneo, e ainda no tratamento da leucorreia, das hemorroidas, das hemorragias e em inflamações (SOARES *et al.*, 2008; HOLETZ *et al.*, 2005a; OLIVEIRA; FIGUEIREDO, 2007; ISHIDA *et al.*, 2009; MELLO, 1997).

Extratos brutos e purificados oriundos do córtex de *S. adstringens* revelaram em estudos *in vitro* e *in vivo*, importantes atividades dos taninos como cicatrizante (LOPES *et al.*, 2005), anti-inflamatórios (LIMA *et al.*, 1998), antiulcerinogênicos (AUDI *et al.*, 1999), antiprotozoários e antihelmínticos (HERZOG-SOARES, *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2002; VINAUD *et al.*, 2005; LUIZE *et al.*, 2005; HOLETZ *et al.*, 2005), além de

antiviral e antifúngico (FELIPE *et al.*, 2006; ISHIDA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009, ISHIDA *et al.*, 2009).

As metodologias que validaram a atividade microbicida dos extratos da planta são geralmente às determinações, pela técnica de diluição em tubos, das concentrações inibitória e bactericida/fungicida mínima - CIM – CBM/CFM e difusão em ágar, frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, apresentando eficiência antisséptica contra as cepas bacterianas. Desse modo, quando não são obtidos sucessos terapêuticos com as terapias convencionais, é pertinente que a medicina veterinária se utilize do recurso fitoterápico, como meio complementar ao método alopático sintético (SOUZA *et al.*, 2007a).

O trabalho proposto delinea-se e está em consonância com a atuação do Mestrado em Agroecologia do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. O tema resgata a prática sustentável da produção agropecuária, com base na premissa de gerar conhecimento sistêmico, com gênese na cultura local e procedendo ao resgate e validação dos conhecimentos pelas etnociências (ALVES, 2007 *et al.*; ALTIERI, 2004; BUAINAIN; SOUZA FILHO, 2006; SEVILLA-GUZMAN, 2001).

## 4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 4.1 Locais de realização dos experimentos e desenvolvimento do trabalho

A coleta do material vegetal foi realizada em porção nativa do Cerrado do Norte do Estado de Minas Gerais, na fazenda Rancho Nossa Senhora da Conceição, localizada à margem direita do km 13, na rodovia BR 365, saída para Pirapora, situada no município de Montes Claros.

A determinação da massa, secagem, moagem e análise da umidade da planta foram feitas no Laboratório de Bromatologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, em Montes Claros.

A identificação botânica e o registro das exsiccatas ocorreram em cooperação com o Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais (Herbário BHCB), em Belo Horizonte, Minas Gerais.

O desenvolvimento da extração hidrometanólica dos compostos ativos da planta, a avaliação da granulometria do pó, os processos de filtração, a destilação fracionada, a concentração, a reconstituição do extrato aquoso e as identificações fitoquímicas ocorreram no Laboratório de Farmacognosia do Curso de Farmácia das Faculdades Santo Agostinho, em Montes Claros - MG.

Os micro-organismos padrão, a preparação dos inóculos e as concentrações, a verificação da viabilidade das culturas, a determinação da concentração inibitória mínima - CIM e bactericida/fungicida mínima - CBM/CFM e o teste de sensibilidade dos micro-organismos frente às diferentes concentrações do extrato aquoso foram desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia do Setor de Controle Biológico da Vallée S.A.

A análise estatística foi realizada com o auxílio de *software* específico, Sistema para Análises Estatísticas - SAEG, versão 9.1 (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007), no Laboratório de Informática da Pós-Graduação do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros.



## 4.2 Planta

Esse trabalho fundamentou-se no conhecimento tradicional e científico sobre o uso de plantas medicinais na saúde animal. Além disso, motivaram a pesquisa os riscos do tratamento com antimicrobianos sintéticos convencionais nos animais, para os seres humanos e o meio ambiente, bem como o alto custo da medicação antibiótica, especialmente para os pequenos produtores (AMOROZO, 2002; AVANCINI; WIEST, 2008; SOUZA; WIEST, 2001).

A planta medicinal escolhida foi *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae-Mimosoidae (Herbário BHC 141894), nativa do Cerrado e encontrada no Norte de Minas Gerais. A escolha de *S. adstringens* como modelo vegetal para elaborar a solução extrativa, foi alicerçada em fatores como: a distribuição, a localização, a fenologia e as utilizações etnofarmacológicas da planta. O vegetal ocorre desde o Pará até Minas Gerais e São Paulo, em formações savânicas primárias e secundárias (FELFILI *et al.*, 1999).

A espécie possui reminiscências etnográficas antimicrobianas, antissépticas e desinfetantes, conforme a literatura científica (XAVIER *et al.*, 2008; SCHUCH *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2007a; SCHUCH, 2007). O "barbatimão", como conhecido popularmente, é amplamente empregado na medicina caseira brasileira (SOUZA *et al.*, 2007a). Tradicionalmente, as populações nativas e locais utilizam os decoctos das cascas do caule, para o tratamento de leucorreias, hemorragias, diarreias, hemorroidas, conjuntivites, como anti-inflamatório e antissépticos, promotor da coagulação sanguínea, hipotensora e cicatrizante de feridas (AUDI *et al.*, 2004; FELFILI *et al.*, 1999; LOPES *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2007a; ISHIDA *et al.*, 2009).

Diferentes partes e estruturas aéreas dos exemplares foram colhidas. Todos são nativos do bioma Cerrado, oriundos de brotação natural, no norte mineiro.

O material foi recolhido pela manhã, na metade do mês de agosto de 2010, época do inverno e período de seca na região, condições de maior

biodisponibilidade dos princípios ativos na planta (AUDI, *et al.*, 2004; BATISTA *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2003; SANTOS; MELLO, 2007; SANTOS, 2007). O local se caracteriza como de clima tropical semi-árido, quente e seco, de acordo com a Secretaria Municipal de Desenvolvimento Econômico, Turismo, Ciência e Tecnologia de Montes Claros. (BRASIL, 2009). A referência geográfica da área da coleta indicou 16°50'36,6"– S e 43°58'42,1"– WO, num raio de mil metros, em altitude de 961 metros e precisão de 11 metros, município de Montes Claros, MG.

Colheram-se 9,988 Kg de cascas armazenadas em sacos alimentícios, ao abrigo de luz, calor e umidade. A estabilização e secagem do material foram realizadas imediatamente e no dia seguinte à coleta, segundo Falkenberg *et al.* (2007), o material foi desidratado em estufa com circulação forçada de ar e sistema de exaustão, à temperatura constante de 60°C ± 2°C até a estabilização da massa. O tempo de secagem foi de 29h55min. Ao término desse processo, obteve-se 5,880 Kg (58,87%) de matéria pré-seca e representando umidade de 41,13% da massa inicial.

Exsicatas de diferentes partes secas da planta (cascas, folhas, ramos, caule e frutos) foram confeccionadas (FALKENBERG *et al.*, 2007), sendo encaminhadas para identificação, conservação e depósito no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais (Herbário BHCGB). O responsável pela identificação do material foi o Prof. Dr. Alexandre Salino, curador do Herbário BHCGB (UFMG) e definiu-se o número do registro da exsicata como 141894.

Com a finalidade tecnológica de facilitar o manuseio, transporte, embalagem, armazenagem e a extração, procedeu-se a pulverização integral das cascas secas de *S. adstringens*, em moinho de facas do tipo Willey, em sistema contínuo (SONAGLIO *et al.*, 2007). Após a moagem, o material foi embalado em envelopes de cartolina e acondicionado em bandejas de polipropileno. As bandejas permaneceram armazenadas por período integral, em estantes, em ambiente ao abrigo de luz, umidade e temperatura constante, 25°C ± 2°C, até o momento do uso.

Determinou-se, em triplicata, a granulometria pelo diâmetro médio das partículas das cascas seca e pulverizadas de *S. adstringens* em

tamises padrão, montados em agitador mecânico em ordem decrescente no Laboratório de Farmacognosia do Curso de Farmácia das Faculdades Santo Agostinho (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002; *THE UNITED STATES PHARMACOPEIA-32*, 2009).

Para definição da umidade do pó da planta, em três repetições, foram pesados dois gramas do córtex moído e colocado em placas de petri de vidro, previamente dessecadas, a  $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em estufa e armazenadas em dessecador. As amostras foram mantidas na estufa a  $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 19 horas, até massa tornar-se constante (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002; *THE UNITED STATES PHARMACOPEIA-32*, 2009).

A amostra vegetal desse estudo foi obtida de coleta única e usada durante todas as etapas experimentais, sendo acondicionada por 11 meses no laboratório, com atenção para os eventos de contaminação por fungos e ou insetos, as quais não ocorreram.

### 4.3 O extrato

Antes da operação extrativa do pó, da casca de *Stryphnodendron adstringens*, padronizou-se o diâmetro das partículas, com tamis oficial correspondente a 425  $\mu\text{m}$ . Isso facilitou a extração pelo solvente por aumentar a superfície de contato entre as fases da suspensão.

A solução extrativa escolhida foi composta por água para injetáveis e metanol na proporção de 1:1 (v/v). A solução hidrometanólica possui características iônicas favoráveis ao processo extrativo, como solventes com polaridades balanceadas; ótima miscibilidade, independente da quantidade; ausência na formação de compostos azeotrópicos e ponto de ebulição baixo do metanol. Essas peculiaridades podem promover mais estabilidade da solução extrativa e maior extração dos metabólitos secundários (SONAGLIO *et al.*, 2007; CECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

O extrato hidroalcolólico foi obtido por turbólise, em homogeneizador Silverson® L4R, dotado de haste rotora estatora e malha padrão com orifícios de 0,6 mm de diâmetro. Na solução extrativa, composta por 2000 mL de água para injetáveis (condutividade 0,970  $\mu\text{s}/\text{cm}$  e pH 7,39) e

2000 mL de álcool metílico P.A<sup>1</sup>. foram previamente embebidas por quinze minutos e depois suspensas 400 g das cascas pulverizadas e padronizadas em 425 µm de *S. adstringens*, a padronização garantiu o menor tamanho das partículas, em relação à abertura da malha estatora. Ajustou-se a velocidade da porção rotadora para 6.500 rotações por minuto – RPM (SONAGLIO *et al.*, 2007), mantendo-se a agitação por seis horas. Usou-se a maceração dinâmica da suspensão, após a turbólise por 24 horas à temperatura de 25°C ± 2°C ao abrigo de luz.

Procedeu-se em cabine de fluxo laminar horizontal asséptica a filtração esterilizante da solução extrativa, em sistema de vaso pressurizado, para dois recipientes de vidro estéreis. Para filtração utilizou-se tripla membrana filtrante, composta por dois pré-filtros e uma membrana esterilizante. Os pré-filtros clarificantes são dispostos, primeiro por uma membrana de microfibras de vidro, com 257 mm de diâmetro (Milipore®, filtro AP15<sup>2</sup>), e a segunda confeccionada em celulose, com poros nominais de 0,45 µm e diâmetro de 293 mm (Milipore®, filtro HAWP<sup>3</sup>). O terceiro e último filtro é a membrana esterilizante de poros absolutos, de 0,45 µm e 0,22 µm, sintetizada em Nylon (Pall, filtro Ultipor® N66). Armazenou-se o extrato vegetal estéril, em frasco de vidro esterilizado, hermeticamente fechado, protegido da luz e sob refrigeração 5°C ± 3°C.

Submeteu-se a mistura extrativa estéril à destilação fracionada, em pressão negativa de 25 PSI (1,72 bar; 1293 mm/Hg) no evaporador rotativo (Quimis® - modelo Q 344B1). A fonte de aquecimento do sistema permaneceu a 65°C ± 4°C durante o procedimento, mantendo 60 rpm o recipiente com o extrato, pelo tempo de 13 horas, para remover integralmente o metanol e 97,5% da fração aquosa, no mínimo. O produto foi armazenado em vidro, fechado, resguardado da luz e em ambiente refrigerado, a 5°C ± 3°C.

---

<sup>1</sup> Marca VETEC®. Lote: 1003301.

<sup>2</sup> Empresa Milipore®, AP1525725. Lote: BODA78187.

<sup>3</sup> Empresa Milipore®, HAWP29325. Lote: BODA752924.

Posteriormente definiu-se a massa do material resultante, o qual foi diluído em 500 mL de água para injetáveis sendo assim definida a solução e a concentração (p/v) original, para todo o experimento.

O extrato aquoso foi previamente aquecido a  $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e mantido em agitação por trinta minutos. Arrefecido foi esterilizado por filtração, em cabine de fluxo laminar vertical, em ambiente asséptico. Na filtração empregou-se membrana hidrofílica esterilizante, composta por fluoreto de polivinilideno (PVDF), com poros absolutos de  $0,22 \mu\text{m}$  e diâmetro de 47 mm (Milipore®, filtro DURAPORE®).

O filtrado foi acondicionado em três frascos de vidro âmbar, estéreis, com capacidade de 200 mL, hermeticamente fechados com rolhas de silicone de 24 mm e recravados com cápsulas de alumínio, sob refrigeração  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Utilizou-se o extrato obtido, no experimento em, no máximo, 72 horas após preparação, para evitar interferências de possíveis reações de oxidações, reduções e modificações dos constituintes polifenólicos por polimerização (GABBARDO, 2009).

#### 4.4 Identificação e doseamento

Procedeu-se a identificação fitoquímica, das cascas pulverizadas e do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, sempre em triplicata (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002; SANTOS; MELLO, 2007). A identificação e diferenciação dos taninos foram determinadas pela constituição qualitativa inespecífica da planta (FALKENBERG *et al.*, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002; SOUZA *et al.*, 2007a; SANTOS; MELLO, 2007).

Realizaram-se reações qualitativas do vegetal e do extrato aquoso, nas quais os compostos tânicos precipitam soluções proteicas de gelatina a 2,5% (p/v), em meio ácido, de sais de alcaloides (cloridrato de quinina a 1% p/v) e complexam com íons metálicos, como o acetato de cobre a 4% (p/v), o acetato de chumbo a 10% (p/v) e o cloreto férrico a 1% (p/v) (MONTEIRO *et al.*, 2005; FALKENBERG *et al.*, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002; SOUZA *et al.*, 2007a; SANTOS; MELLO, 2007).

Para diferenciar taninos hidrolisáveis e taninos condensados, empregaram-se os métodos qualitativos específicos: a reação com cloreto férrico a 1% (p/v) em metanol, para identificar taninos hidrolisáveis; a reação com a vanilina a 1% (p/v) em meio metanólico e ácido, a qual indica taninos condensados e a reação de Stiasny, para triagem em meio com formaldeído e ácido clorídrico (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002; SANTOS; MELLO, 2007).

O doseamento de taninos totais ocorreu por espectrometria colorimétrica (espectrofotômetro Biospectro, modelo SP 22), com absorvância em comprimento de onda de 715 nm, faixa que detectou a oxirredução entre o reagente de Folin-Denis e as hidroxilas fenólicas tânicas, gerando complexos cromóforos na presença de carbonato de sódio 10,6% (p/v) (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002; SOUZA *et al.*, 2007a; SANTOS; MELLO, 2007).

A segunda reação de doseamento fez uso da propriedade dos taninos de precipitarem com proteínas (colágeno). Avaliou-se a absorvância da mistura, na presença do Reativo de Folin-Denis e solução de carbonato de sódio a 10,6% (p/v), na faixa de comprimento de onda de 750 nm (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002; SOUZA *et al.*, 2007a; SANTOS; MELLO, 2007)

A expressão matemática utilizada para o cálculo dos taninos totais segue o recomendado na Farmacopeia Brasileira IV (2002), e está demonstrado a seguir:

|   |
|---|
| $\text{Taninos Totais} = \frac{13,12 \times (\text{Absorbância}_1 - \text{Absorbância}_2)}{\text{Absorbância}_3 \times \text{massa}}$ |
| $\text{TT} = \frac{13,12 \times (A_1 - A_2)}{A_3 \times m}$   |

FIGURA 1 – Expressão matemática utilizada para o cálculo da quantificação dos taninos totais, a partir da detecção das absorvâncias dos grupos cromóforos das amostras.

Fonte: Adaptada de FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002.

Onde TT são os taninos totais;  $A_1$  é a absorvância medida para polifenóis totais;  $A_2$  é a absorvância medida para polifenóis não adsorvidos;  $A_3$  é a absorvância medida para substância referência e “m” é a massa da droga, em gramas, considerando a prévia determinação de umidade da matéria-prima vegetal pulverizada (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002).

Para identificar compostos flavônicos nas cascas de *Stryphnodendron adstringens* realizaram-se, em triplicata, dois ensaios cromáticos preliminares. A primeira reação foi a cianidina, ou Shinoda, ou hidrogenação, na qual após a extração hidroalcolica, com etanol a 70°GL, o extrato colocado em contato com magnésio metálico, em meio ácido, são reduzidos pelos derivados flavônicos, adquirindo a coloração avermelhada. A segunda análise foi à reação de Pew, na qual, desenvolveu-se coloração avermelhada, pela ação dos derivados flavônicos, obtidos pela evaporação, branda, do extrato aquoso do vegetal, adicionado de metanol, sobre o zinco metálico (MACEDO *et al.*, 2007; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; SOFIATI, 2009).

No decocto das cascas de *S. adstringens* para a identificação de saponinas, verificou-se, após a agitação energética do extrato filtrado a

formação de espuma persistente, mesmo após a adição de ácido mineral diluído (SCHENKEL *et al.*, 2007).

#### 4.5 Micro-organismos

Os micro-organismos foram escolhidos de acordo com a prevalência como causadores de mastite no Brasil, de forma contagiosa ou ambiental, clínica ou subclínica, a toxemia, a ocorrência de infecções oportunistas e pela dificuldade de resposta à antibioticoterapia convencional (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001; BASKARAN *et al.*, 2009; AVANCINI *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2003; BRITO *et al.*, 1998; BURAGOHAIN; DUTTA, 1998; SCHUCH *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2009; MEDEIROS *et al.*, 2009; LOGUERCIO *et al.*, 2006; HEYMAN *et al.*, 2009; ZAFALON *et al.*, 2007; PINTO, 2000; RAHMAN; SHARMA, 2000; SCHUCH, 2007).

Outro fator levado em consideração na seleção dos agentes infectantes foi na classificação quanto ao revestimento das membranas citoplasmáticas, em Gram-positivas ou Gram-negativas, as diferenças e composição química dessas estruturas, promovem interações diversas com as substâncias medicamentosas e possíveis mecanismos de resistência microbiana (SCHAECHTER, 2002).

Na pesquisa, por meio da frequência de isolados de casos de mastite no Brasil e no mundo, determinaram-se as cepas padrão utilizadas. Os micro-organismos definidos foram bactérias e levedura de culturas puras e padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231) gentilmente cedidas, e disponíveis no cepário, da microbioteca referência ATCC, do Laboratório de Microbiologia do Setor de Controle Biológico da Vallée S.A. (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001; BASKARAN *et al.*, 2009; AVANCINI *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2003; BRITO *et al.*, 1998; BURAGOHAIN; DUTTA, 1998; SCHUCH *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2009; SANTOS; FONSECA, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2009; LOGUERCIO *et al.*, 2006;



HEYMAN *et al.*, 2009; ZAFALON *et al.*, 2007; PINTO, 2000; RAHMAN; SHARMA, 2000; SCHUCH, 2007).

As metodologias empregadas para investigar a suscetibilidade dos micro-organismos patogênicos frente ao extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* foram os testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por macrodiluição em tubos e a difusão em ágar, adaptados do *National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS*, organização consultiva internacional de cunho interdisciplinar. Os métodos de avaliação da sensibilidade foram empregados, pois os organismos utilizados causam infecções e assim justifica-se a quimioterapia antimicrobiana e eventualmente pode ocorrer resistência aos antibióticos empregados (NCCLS, 2003a, 2003b, 2005).

As amostras contendo os subcultivos foram mantidas congeladas, com 5% de glicerina, em nitrogênio líquido -196 °C. A recuperação dos patógenos ocorreu em caldos específicos, sendo o caldo nutriente (DIFCO™. Lote: 8315603), para *S. aureus* e *P. aeruginosa*; meio líquido de soja tríptica – caldo *TSB* (BACTO™. Lote: 0363328), para *E. coli*; caldo de infusão de cérebro e coração – caldo *BHI* (BACTO™. Lote: 9027648), para *S. pyogenes*; e o meio líquido Sabouraud com dextrose (DIFCO™.Lote: 0082341) para *C. albicans* (*BRITISH PHARMACOPEIA*, 2007; *THE UNITED STATES PHARMACOPEIA-32*, 2009).

#### **4.6 Determinação da cinética de inativação das concentrações, inibitória e bactericida/fungicida, mínimas do extrato aquoso de *S. adstringens* frente aos micro-organismos teste**

As concentrações, inibitória e bactericida/fungicida, mínimas - CIM e CBM/CFM, respectivamente, assim como, a cinética de inativação dos patógenos causadores da mastite ao extrato aquoso de *S. adstringens* foram determinadas pelo teste de sensibilidade em macrodiluição em tubos (NCCLS 2003a, 2003b, 2005).

#### 4.6.1 Micro-organismos e elaboração do inóculo

Nessa etapa todas as cepas bacterianas e de levedura, mencionadas no item 3.5. foram utilizadas. Os agentes padrões, diluídos em 5% de glicerol e congelados em ampolas, foram retirados da condição criogênica, em nitrogênio líquido e liquefeitos.

Retirou-se um mililitro, de cada suspensão microbiana (das culturas puras ATCC) e ativaram-se os micro-organismos em 15 ml dos respectivos meios de crescimento: caldo nutriente (DIFCO™. Lote: 8315603), para *S. aureus* e *P. aeruginosa*; meio TSB (BACTO™. Lote: 0363328), para *E. coli*; BHI (BACTO™. Lote: 9027648), para *S. pyogenes* e o meio líquido Sabouraud com dextrose (DIFCO™. Lote: 0082341), para *C. albicans*, sob fluxo laminar asséptico. O processo de ativação microbiana (das culturas puras ATCC) foi realizado em triplicata, no intervalo de 24 horas entre cada procedimento, e a incubação ocorreu em câmara climática, a 35°C ± 2°C, por 48 horas.

Com as ativações celulares efetivadas, foram realizadas diluições logarítmicas seriadas das culturas, na base 10, até a obtenção da diluição de 10<sup>-7</sup>, da suspensão original. Desse modo, obtiveram-se oito diluições sucessivas e os caldos usados foram os mesmos empregados anteriormente. Nessa etapa, as concentrações dos meios foram uma vez e meia superior ao recomendado pelos fabricantes, visando disponibilizar nutrientes para os micro-organismos e a neutralizar possíveis efeitos negativos indiretos do extrato aquoso testes (*BRITISH PHARMACOPEIA*, 2007; *THE UNITED STATES PHARMACOPEIA-32*, 2009).

As diluições dos micro-organismos foram submetidas ao plaqueamento e incubação, para contagem das unidades formadoras de colônias – UFC viáveis. Alíquotas de 100 µl das diluições seriadas foram inoculadas em placas de petri contendo ágar de soja tríptica (TSA) (DIFCO™. Lote: 0207250), espalhadas com o auxílio de alça Drigalski e incubadas, em câmara climática, a 35°C ± 2°C, por 48 horas. Após o período de incubação foram feitas as contagens das colônias viáveis. Foram definidas as diluições e concentrações dos patógenos utilizados no

experimento, á partir das placas que apresentaram leituras entre 10 e 99 UFC (NCCLS 2003a, 2003b, 2005).

Para os testes de sensibilidade dos patógenos na macrodiluição em tubos, frente ao extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* foram selecionadas diluições de micro-organismos, contendo  $1,00 \times 10^5$  a  $9,00 \times 10^5$  UFC/ml (NCCLS 2003a, 2003,; 2005).

#### **4.6.2 Montagem dos tubos, diluições do extrato aquoso, aplicação do inóculo, incubação e leitura das placas**

A verificação das CIM, CBM e CFM e a cinética de inativação foram realizadas por meio de inoculação do material obtido na diluição seriada das bactérias e da levedura escolhidas ( $1,00 \times 10^5$  a  $9,00 \times 10^5$  UFC/ml) nas diferentes concentrações do extrato aquoso de *S. adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml).

Após os tempos pré-definidos de exposição dos agentes patógenos, ao meio de cultura, em presença da solução extrativa, porções de 100 µl dessa foram semeadas em placas com TSA e incubadas, a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , por 24 horas e as colônias foram quantificadas.

A concentração inicial do extrato aquoso estéril de *Stryphnodendron adstringens* de 328,18 mg/ml foi incorporada e diluída em 15 ml de BHI estéril, acrescido em uma vez e meia da concentração indicada pelo fabricante. As diluições de 1:328; 1:66; 1:13; 1:6,5 e 1:4 (v/v), respectivamente definiram as concentrações de 1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml usadas no experimento (COSTA, 1999; SCHUCH *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2007a). A configuração das diluições do extrato e de micro-organismo é visualizada no QUADRO 6.

## QUADRO 6

Valores para a diluição da solução original do extrato aquoso de *S. adstringens* (328,18 mg/ml) em 15 ml de meio *BHI* e 100 µl de inóculo dos micro-organismos testados neste trabalho

| Volume Extrato (ml) | Volume <i>BHI</i> <sup>4</sup> (ml) | Inóculo (ml) | Volume Final (ml) | Diluição | Concentração do Extrato (mg/ml) |
|---------------------|-------------------------------------|--------------|-------------------|----------|---------------------------------|
| 0,04585             | 15,0000                             | 0,10000      | 15,1459           | 1 : 328  | 1,00                            |
| 0,23207             | 15,0000                             | 0,10000      | 15,3321           | 1 : 66   | 5,00                            |
| 1,2369              | 15,0000                             | 0,10000      | 16,3369           | 1 : 13   | 25,00                           |
| 2,6961              | 15,0000                             | 0,10000      | 17,7961           | 1 : 6,5  | 50,00                           |
| 4,4435              | 15,0000                             | 0,10000      | 19,5435           | 1 : 4    | 75,00                           |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

Para cada diluição do extrato foram realizadas três repetições, sendo a quarta e a quinta repetições, os controles negativo e positivo respectivamente, ou seja, uma repetição sem a inclusão dos micro-organismos testes, apenas com a adição do extrato aquoso nas diluições propostas, e a outra foi adicionado apenas os micro-organismos testes, sem a presença das diluições com a solução extrativa. Desse modo, foi possível verificar tanto a esterilidade da solução teste, como a viabilidade de crescimento dos micro-organismos no meio de cultura proposto.

Posteriormente foram semeadas em todos os tubos de ensaio, nas repetições e diluições previamente preparadas, 100 µl das frações diluídas de micro-organismos. Os tubos foram incubados em câmara climática, a 35°C ± 2°C por 24 horas, e agitados vigorosamente a cada seis horas.

<sup>4</sup> Infusão de cérebro e coração - BACTO™. Lote: 9027648.

Para se estudarem os efeitos as diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* e os tempos de exposição das bactérias e levedura, em 24 horas, nos momentos 0, 6, 12, 18 e 24 horas, retiraram-se alíquotas de 100 µl, de todos os tubos teste e dos controles, sendo semeados com auxílio da alça de Drigalski, em placas de petri com ágar de soja tríptica – TSA, as placas foram invertidas e incubadas, em câmara climática, por 24 horas, a 35°C ± 2°C e as colônias contadas macroscopicamente, com auxílio de lupa e contadores manuais (SCHUCH *et al.*, 2008; NCCLS, 2003a).

#### **4.7 Sensibilidade dos micro-organismos frente ao extrato aquoso de *S. adstringens*, pelo teste de disco difusão**

O método adaptado de disco-difusão em ágar foi empregado para prever a sensibilidade *in vitro* das bactérias e leveduras, frente à solução extrativa aquosa de *Stryphnodendron adstringens*. Patógenos comuns à mastite bovina de crescimento rápido foram testados. O teste fundamentou-se na presença ou ausência do halo de inibição e consideraram-se válidos, quando se correlacionaram às concentrações inibitórias mínimas – CIM, obtidas na macrodiluição em tubos (NCCLS, 2003a, 2003b, 2005).

As classificações de interpretação para o teste de sensibilidade antimicrobiana baseiam-se na resposta *in vitro* do organismo frente à substância teste, nas concentrações séricas ou teciduais teóricas que o agente poderia estar submetido, quando as doses habitualmente prescritas forem utilizadas. As categorias de interpretação são sensível, intermediária e resistente ao teste antimicrobiano (NCCLS, 2003a, 2003b, 2005).

Os testes de sensibilidade de disco-difusão em ágar foram realizados, pois os patógenos propostos podem promover processos infecciosos, sendo requeridas terapias antimicrobianas e as espécies pertencem a grupos capazes de desenvolver resistência aos antimicrobianos normalmente utilizados (NCCLS, 2003a, 2003b, 2005).

#### 4.7.1 Micro-organismos e elaboração do inóculo

Nessa etapa do trabalho todas as cepas bacterianas e de levedura, mencionadas anteriormente para o teste da macrodiluição foram utilizadas.

Os procedimentos de elaboração das sementes e preparo dos inóculos foram idênticos aos descritos anteriormente salvo as concentrações dos agentes. Estas em conformidade com as normas da NCCLS (2003a, 2003b, 2005), para os testes de sensibilidade dos patógenos, na disco-difusão em ágar, frente ao extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, usaram-se as diluições de micro-organismos, correspondentes a concentração de inóculo de  $1,00 \times 10^8$  a  $9,00 \times 10^8$  UFC/ml.

#### 4.7.2 Montagem da técnica do antibiograma em discos de papel, diluições do extrato aquoso, aplicação do inóculo, incubação e leitura das placas

As verificações dos testes de sensibilidade em disco-difusão em ágar foram realizadas por meio de inoculação do material obtido na diluição seriada das bactérias e da levedura escolhidas ( $1,00 \times 10^8$  a  $9,00 \times 10^8$  UFC/ml), com auxílio de alça Drigalski, em placas de petri, com a presença do meio ágar Müller Hinton (DIFCO™. Lote: 7093809). Após a semeadura inseriram-se nas placas, papéis filtros impregnados com as diferentes concentrações do extrato aquoso de *S. adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml). As placas foram incubadas a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , por 24 horas. Procederam-se as medições dos halos de inibição existentes, em torno dos filtros (NCCLS, 2003a, 2003b, 2005).

Para a montagem do antibiograma o extrato aquoso estéril de *Stryphnodendron adstringens*, obtido na fase de extração vegetal (328,18 mg/ml), sob fluxo laminar em ambiente asséptico, foi diluído em água para injetáveis - *WFI*, em frascos de vidro estéreis de 30 ml, para as concentrações definidas no experimento, de 1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml, nas proporções de 1:328; 1:66; 1:13; 1:6,5 e 1:4 (v/v) respectivamente. Ao final da diluição, todos os frascos continham o volume

de 30 ml. No QUADRO 7 é apresentado a montagem das diluições usadas para impregnar os papéis filtro com as diluições da solução extrativa de *Stryphnodendron adstringens*.

QUADRO 7

Diluição da solução original do extrato aquoso de *S. adstringens* (328,18 mg/ml) em frascos de vidro estéreis de 30 ml, para as concentrações definidas no experimento em mg/ml, obtendo o volume final de 30 ml por frasco e diluição

| Volume de extrato (ml) | Volume de água - WFI (ml) | Volume Final (ml) | Diluição | Concentração do Extrato (mg/ml) |
|------------------------|---------------------------|-------------------|----------|---------------------------------|
| 0,09141                | 29,90859                  | 30,00000          | 1 : 328  | 1,00                            |
| 0,45707                | 29,54293                  | 30,00000          | 1 : 66   | 5,00                            |
| 2,28530                | 27,71470                  | 30,00000          | 1 : 13   | 25,00                           |
| 4,57070                | 25,42930                  | 30,00000          | 1 : 6,5  | 50,00                           |
| 6,85600                | 23,14400                  | 30,00000          | 1 : 4    | 75,00                           |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

Os discos de papel filtro Whatman Nº 1, com cinco milímetros de diâmetro, foram mergulhados e impregnados com as diluições do extrato aquoso estéril da planta, nos frascos de 30 ml, nas concentrações 1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml e dessecados à temperatura de 25°C ± 2°C, sob fluxo laminar em ambiente asséptico, durante trinta minutos, ao abrigo de luz e umidade (COSTA, 1999 )

Em placas de petri contendo o meio ágar Müller Hinton (DIFCO™. Lote: 7093809) foram inoculados, com auxílio de alças de Drigalski; 100 µl das frações diluídas de micro-organismos. Imediatamente os discos impregnados com as diluições do extrato da planta foram inseridos e

pressionados no meio, para assegurar o contato com a superfície desse. As placas foram invertidas e incubadas por 24 horas, em câmara climática, a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os diâmetros dos halos de inibição total foram mensurados, com paquímetro eletrônico, incluindo o disco de papel filtro (NCCLS, 2003a, 2003b, 2005).

Os controles positivos, as verificações da sensibilidade por disco-difusão e das seletividades dos micro-organismos feitos com o uso de quimioterápicos antimicrobianos de amplo espectro, comprovadamente eficazes. Os antibióticos utilizados foram a oxacilina (OXA), a penicilina G (PEN-G), o imipenem (IPM) e a ceftazidima (CAZ), nas quantidades padrões de teste de, OXA - 1µg, PEN-G - 10 µg, IPM - 10 µg e a CAZ 30 µg.

As condições de preparo do meio, quantidade e distribuição dos inóculos na placa, inserções dos discos testes e tempo de incubação foram às mesmas empregadas para o extrato aquoso da planta. A interpretação dos antibiogramas foi baseada pelas indicações do NCCLS (2003b).

Para o antibiograma das substâncias medicamentosas sintéticas, foram realizadas análises descritivas das médias e dos desvios padrão. Compararam-se esses valores com a literatura padrão (NCCLS, 2003b), a qual determina se o micro-organismo é sensível, resistente ou de sensibilidade indeterminada ao antimicrobiano.

Realizaram-se para cada micro-organismo teste cinco repetições de cada diluição do extrato aquoso do vegetal e aos controles positivos dos antibióticos (oxacilina, penicilina G, imipenem e ceftazidima) (NCCLS, 2003a, 2003b, 2005)

#### **4.7.3 Análise estatística**

Para as avaliações estatísticas quantitativas do teste de sensibilidade bacteriana e da levedura, pela macrodiluição em tubos, usou-se o modelo fatorial triplo, em delineamento inteiramente casualizado - DIC. Nesse esquema foi possível estudar níveis das variáveis (cinco espécies de micro-organismos; cinco concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* e cinco tempos de incubação). As interações foram



desdobradas e o comportamento individual de cada variável, foi avaliado nos níveis de interação. A significância do erro, sempre foi ( $p \leq 0,01$ ) (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

Desenvolveram-se gráficos, com as curvas das cinéticas de inativação dos micro-organismos, para facilitar a visualização dos processos inibitórios e biocidas na definição das curvas, com modelos validados matematicamente e calcularam-se as equações, pelo método da regressão linear. A verificação entre as interações e as influências de cada variável e os seus níveis de significância, foi realizada pela análise de variância da regressão, na qual se definiram os coeficientes de determinação ( $R^2$ ), sempre os mais próximos a unidade e os coeficientes de regressão ( $\beta$ ), adjacentes a significâncias inferiores ou iguais a 1%.

Na análise quantitativa para o teste de sensibilidade pela difusão em ágar, realizou-se a Análise de Variância (ANOVA), com as médias obtidas e significativas, para o teste F. Empregou-se o teste de comparação múltiplo de médias Tukey, sempre ao nível de 1%. O delineamento utilizado foi o DIC. Com os mesmos dados dos halos de inibição causados aos agentes infectantes, pelas diluições do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, foi possível correlacionar essas variáveis no modelo fatorial no DIC e a interação foi calculada, com significância ( $p \leq 0,01$ ).

#### **4.7.3.1 Análise estatística para o teste da sensibilidade em macrodiluição em tubos**

O estudo quantitativo utilizado para o teste de sensibilidade microbiana pela macrodiluição em tubos seguiu o modelo fatorial triplo. As cinco concentrações do extrato foram confrontadas com cinco diferentes cepas padrão de micro-organismos e analisadas em cinco tempos distintos de incubação. Portanto, foram confrontadas essas três variáveis, e suas interações foram desdobradas, sendo estudado o comportamento individual de cada uma, dentro dos níveis de interação (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

Na macrodiluição a contagem foi considerada válida quando as contagens das unidades formadoras de colônias – UFC, viáveis, não ultrapassaram os valores dos inóculos controle, referente a (104 UFC/100µl). Acima desses fixou-se o valor de 104 UFC, o qual não induz interpretações errôneas frente às ações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (SCHUCH, 2007; COSTA, 1999).

Os dados originais do teste de sensibilidade bacteriana e de leveduras na macrodiluição em tubos, em unidades formadoras de colônias - UFC foram transformados segundo a fórmula que consta na FIG. 2. Na qual X representa os valores originais exponenciais de contagem das unidades formadoras de colônias viáveis e Y = valor transformado de UFC (BANZATTO; KRONKA, 2006; PINTO, 2000; RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007; SCHUCH, 2007).

$$Y = \text{Log} (X + 1)$$

FIGURA 2 – Expressão matemática utilizada para transformação logarítmica dos dados que possuem distribuição exponencial. Y = corresponde ao valor transformado e X = é o valor exponencial obtido no experimento a ser transformado.

Fonte: BANZATTO; KRONKA, 2006; PINTO, 2000; RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007; SCHUCH, 2007.

Utilizou-se a fórmula representada na FIG. 2, pois se constatou a regularidade das variâncias heterogêneas, obtidas dos valores observados no experimento. A escolha da transformação logarítmica ocorre pela existência de proporcionalidade entre as médias e os desvios padrões dos tratamentos e o emprego do algoritmo, proporciona a distribuição normal dos números. Somou-se o fator um (1) na equação, para impossibilitar a ocorrência de zeros e permitir os desenhos estatísticos (BANZATTO; KRONKA, 2006).

Submeteram-se os números transformados à análise de variância (ANOVA), pelo delineamento inteiramente casualizado - DIC, e submetidos ao modelo fatorial triplo. Os valores foram expressos em unidades formadoras de colônias. Analisados os dados, e verificada a significância da tripla interação pelo teste F da (ANOVA), as médias foram submetidas ao

Tukey, com nível de significância ( $p \leq 0,01$ ) (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

Para o desenho das cinéticas de inativação dos micro-organismos foram usados, os valores de UFC, transformados pela equação logarítmica do teste de sensibilidade por macrodiluição em tubos.

Pelo método da regressão linear calcularam-se as equações das curvas de inativação dos organismos, para a variável dependente (Y) consideraram-se as contagens de colônias viáveis, e a variável independente (X) os tempos. Cada concentração de extrato aquoso atuou como tratamento isolado (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

Desse modo, calcularam-se cinco equações, referentes às cinco concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, que geraram as cinco curvas de cinética, as quais foram reunidas graficamente, para cada micro-organismo isolado.

As equações estimadas das diluições estabeleceram a relação funcional entre a variável dependente, UFC, e a variável independente, tempo. A verificação das interações e das influências de cada variável e os seus níveis de significância foi obtida pela análise de variância da regressão, com as repetições das contagens de UFC para cada patógeno. A partir da análise de variância da regressão, definiram-se os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) mais próximos a unidade, portanto com o melhor ajuste (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

Definidos os coeficientes de determinação encontraram-se os coeficientes de regressão ( $\beta$ ), as suas significâncias, as quais serviam de parâmetro decisório dos modelos de regressão. Procurou-se definir o modelo com significância inferior ou igual a 1% (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

O modelo regressivo possibilitou a visualização, pelos desenhos gráficos das CIM, CBM e CFM, da solução extrativa de *S. adstringens*.

Todas as análises foram realizadas com a utilização do programa estatístico SAEG 9.1.

#### 4.7.3.2 Análise estatística do teste de sensibilidade pelo método do disco-difusão em ágar

O estudo quantitativo utilizado para o teste de sensibilidade para os organismo, pela disco-difusão em ágar, foi determinado pela medição do diâmetro, em milímetros, do halo de inibição das cepas, frente às cinco repetições das concentrações do extrato, confrontadas, com as cinco diferentes cepas padrão de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*.

Com os valores dos halos de inibição, calculou-se a Análise de Variância dos dados (ANOVA), com as médias obtidas e significativas, para o teste F, foi empregado o teste de comparação múltiplo de médias Tukey, sempre ao nível de 1%. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado – DIC (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

Com os dados dos halos de inibição causados aos agentes infectantes, pelas diluições do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, foi possível correlacionar essas duas variáveis no modelo fatorial, pelo delineamento inteiramente casualizado – DIC. Calculou-se a análise de variância, incluindo a interação entre micro-organismos e as diferentes concentrações do extrato, vegetal, verificando significância ( $p \leq 0,01$ ) na interação, a qual foi decomposta e comparada pelo teste de médias Tukey, sempre a 1% (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

Todas as análises foram realizadas com a utilização do programa estatístico SAEG 9.1.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Planta e extrato

O material pulverizado de *S. adstringens* resultou em granulometria compreendida integralmente abaixo de 2000  $\mu\text{m}$  e o máximo de 40% de partículas, inferiores a 355  $\mu\text{m}$ , permitindo classificá-lo como pó grosso (SONAGLIO *et al.*, 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002; *THE UNITED STATES PHARMACOPEIA-32*, 2009).

A umidade na matéria-prima vegetal pulverizada, de 9,037%  $\pm$  0,27%, ficou abaixo dos 15% estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira IV (2002). O teor de umidade foi obtido pela secagem prévia das cascas, durante 29h55min, com perda de 41,13% de massa úmida, conforme recomendado por Falkenberg *et al.* (2007). A armazenagem do material ocorreu em cartolina, adsorvente, de presumível umidade residual, pela composição celulósica. A secagem possibilitou estabilizar as enzimas, impedir hidrólises de princípios ativos e para inibir a proliferação de micro-organismos (LOPES *et al.*, 2003; FALKENBERG *et al.*, 2007; FARIAS, 2007).

Empregaram-se 400 g das cascas pulverizadas e padronizadas de *S. adstringens*, no processo de retirada dos ativos da planta, por turbo-extração; na clarificação e filtração esterilizante da solução extrativa; na submissão do composto hidrometanólico-1:1 (v/v) na operação de destilação fracionada em pressão negativa e assim, se obteve o extrato semi-sólido, isento de 97,5% de umidade, que resultou na massa de 164,09 gramas.

A quantidade de 164,09 g, extrato semi-sólido representou 41,02% da massa original, sendo decorrente da extração eficaz, pela turbólise; da seleção dos solventes com polaridade balanceada e ótima capacidade de captação dos compostos bioativos, pois a adição da água ao metanol, em proporções semelhantes, aumenta o rendimento extrativo dos compostos fenólicos e gliconas (heterosídeos), além de promover a estabilização dos taninos (SANTOS; MELLO, 2007).

A turbo-extração promoveu a redução drástica das diminutas partículas ( $\leq 425 \mu\text{m}$ ) e o rompimento das paredes e demais estruturas celulares, esse método favoreceu a dissolução rápida dos componentes. A técnica é apresentada por Sonaglio *et al.* (2007) e utilizada pelos grupos que pesquisam o *Stryphnodendron adstringes* no Brasil, pela simplicidade, à celeridade e à versatilidade do procedimento (AUDI *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2003; HOLETZ *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2005; SANCHES *et al.*, 2005; ISHIDA *et al.*, 2009; SANTOS; MELLO, 2007).

O modelo mais utilizado para extração é o preconizado por Santos e Mello (2007), cuja finalidade é o isolamento, a purificação e elucidação estrutural dos princípios ativos de *S. adstringens*. Nele se emprega a mistura de acetona em água, na proporção de 1:1 ou 7:3, com posterior evaporação em pressão reduzida, fracionamentos e partição entre solventes de diferente polaridade, seguida da liofilização (LOPES *et al.*, 2003; HOLETZ *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2005; SANCHES *et al.*, 2005; ISHIDA *et al.*, 2009).

A estabilidade dos taninos na composição aquosa-acetônica é inferior ao meio hidrometanólico, porém a fração cetônica tem maior capacidade adsorviva dos ativos, quando comparadas à porção alcoólica, de acordo Santos e Mello (2007), assim optou-se pela utilização da fração hidrometanólica 1:1. Desse modo, para aumentar o poder extrativo da mistura, o tempo foi prolongado de 20 minutos, comumente empregado, para seis horas, com posterior período de maceração dinâmica de 24 horas (LOPES *et al.*, 2003; HOLETZ *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2005; SANCHES *et al.*, 2005; ISHIDA *et al.*, 2009).

A inovação desse trabalho procedeu-se na elaboração da solução extrativa. O processo extrativo desenvolvido nessa pesquisa caracterizou-se como de reprodução simples, nele se utilizou solventes de custo reduzido, obtenção fácil, com baixo ponto de evaporação, recuperação elevada, sem restrições de uso e aquisição.

A composição final do extrato seguiu a condição *sine qua non*, de constituir-se em veículo aquoso na forma farmacêutica final, pela diminuição dos efeitos adversos, possibilitar a aplicação ágil e possuir

biodegradabilidade (SOLUTIONS BIOMED; 2009; SYNGENTA PARTICIPATIONS, 2009).

Diluiu-se o extrato semi-sólido obtido em 500 ml de água para injetáveis, a solução de concentração 328,18 mg/ml foi à solução base utilizada em todo o experimento. O uso da água para injetáveis é justificado pelas propriedades inertes dessa, frente aos micro-organismos testados, diminui a possível interferência nos ensaios antimicrobianos (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002; *THE UNITED STATES PHARMACOPEIA-32*, 2009).

O resultado do doseamento dos taninos totais para a planta foi 38,81%, ou seja, de uma massa 164,09 g do extrato semi-sólido bruto, 63,68 g podem ser consideradas composições tânicas, que representam 127,36 mg/ml da concentração final do extrato aquoso. A Farmacopeia Brasileira IV (2002) estabelece na quantificação dos ativos, das cascas de *S. adstringens* como percentual mínimo 8% de taninos totais, Lopes *et al.* (2003); Ishida *et al.* (2009) e Santos e Mello (2007) estabelecem em seus trabalhos, valores entre 10% a 37% dos mesmos ativos. Desse modo obteve-se valor de bioativos superiores a especificação farmacopeica, e de acordo a literatura científica.

O súber e a casca de *S. adstringens* são estruturas vegetais periféricas. A coleta das amostras em agosto, período de inverno e seca no Norte do Estado de Minas Gerais, com intensa incidência de raios solares (todo o ano), restrições hídricas e baixas temperaturas noturnas, favorecem as rotas metabólicas produtoras de quantidades maiores de substâncias de defesa do vegetal, como os taninos totais. Possivelmente esses metabólitos secundários vegetais, encontrados no *Stryphnodendron adstringens*, são compostos diferenciados e especializados, com rotas bioquímicas e metabolismos específicos, que auxiliam a sobrevivência e à perpetuação da espécie no ecossistema, justificando o teor diferenciado do bioativo (AUDI, *et al.*, 2004; BATISTA *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2003; SANTOS; MELLO, 2007; SANTOS, 2007).

Na prospecção fitoquímica qualitativa verificou-se, a presença de taninos totais na planta e no extrato pela formação de precipitados e

decantados nítidos (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002; FALKENBERG *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2007a; SANTOS; MELLO, 2007).

Todos os testes para identificar e diferenciar os taninos, da casca de *S. adstringens*, em hidrolisáveis e condensados foram positivos. No cloreto férrico, desenvolveu-se a coloração cinza escura, indicativa de taninos hidrolisáveis. Na vanilina, formou-se a tonalidade vermelha, associada aos taninos condensados. Determinaram-se os taninos condensados (catequinas) na reação do formaldeído e ácido clorídrico, pelo precipitado no sobrenadante. No filtrado pela adição do acetato de sódio e cloreto férrico identificou-se o ácido gálico, que confirmou os taninos hidrolisáveis (SANTOS *et al.*, 2002, FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2002; OLIVEIRA; FIGUEIREDO, 2007; SOUZA *et al.* 2007a; MACEDO *et al.*, 2007; SANTOS; MELLO, 2007).

Realizada a identificação e diferenciação dos taninos da amostra do espécime *S. adstringens* em hidrolisáveis e condensados, de acordo com a estrutura química. É importante mencionar que Mello *et al.* (1996a;); Mello *et al.* (1996b;); Mello (1997) e Mello *et al.* (1999), além da identificação, isolaram e elucidaram estruturas de ambos compostos, relacionando a estrutura química às atividades biológicas dos ativos.

Para as reações de Shinoda e Pew os indicativos para flavonoides foram positivos (MACEDO *et al.*, 2007; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; SOFIATI, 2009).

As saponinas foram identificadas no extrato aquoso das cascas pulverizadas de *S. adstringens*, pela formação de espuma persistente, a característica é determinada pela redução da tensão superficial da água, em função da natureza anfífilica da molécula saponosídica (SCHENKEL *et al.*, 2007).

A verificação da presença dos flavonoides e saponinas no extrato aquoso foi importante, pois apesar da menor quantidade em relação aos taninos, majoritários na planta, os compostos podem auxiliar de maneira sinérgica ou potencializadora de efeitos biológicos e farmacológicos, por exemplo, os dois metabólitos, por mecanismos diferentes, têm ações antimicrobianas, sobre a membrana e interferência da produção proteica



celular (SCHENKEL *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2007; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; SOFIATI, 2009).

## **5.2 Micro-organismo - Análise dos agentes infecciosos frente à interação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *S. adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/m) em diferentes tempos de exposição (0, 6, 12, 18 e 24 horas)**

### **5.2.1 *Staphylococcus aureus***

A bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, não formadora de esporos, é capaz de sobreviver por longos períodos nos microabcessos do úbere e são resistentes aos antimicrobianos. A transmissão é contagiosa e a manifestação é subclínica. Instalada no tecido glandular do animal, fixam-se as células epiteliais e podem evoluir a toxemia, a necrose, a gangrena e a morte do animal (RODOSTIST *et al.*, 2002; SANTOS; FONSECA, 2007; SCHAECHTER, 2002).

A espécie *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) apresentou sensibilidade para a maioria das concentrações do extrato aquoso do vegetal testado, bem como para os tempos de exposição selecionados no teste de macrodiluição em tubos. Mesmo assim, não foi possível a determinação da concentração bactericida mínima – CBM, indicando que a substância extrativa, nessas concentrações e tempos possui ação bacteriostática sobre *S. aureus*.

Nos APÊNDICES A e B encontram-se as leituras das contagens das unidades formadoras de colônia – UFC/100µl, de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), obtidas na macrodiluição em tubos. O APÊNDICE A contém os dados originais da leitura e no APÊNDICE B estão os dados transformados pela equação  $\text{Log}(X+1)$ .

Nos APÊNDICES K, L e M estão demonstrados os valores médios das contagens de UFC viáveis em 100 µl, transformados pela equação  $\text{Log}(X+1)$ , resultantes da análise individual da interação entre o micro-organismo *S. aureus*; frente aos tempos de exposição (0, 6, 12, 18 e 24

horas), mantida constante às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml).

Nos APÊNDICES N, O e P estão demonstrados os valores médios das contagens de UFC viáveis em 100 µl, transformados pela equação Log (X+1), resultantes da análise individual da interação entre *S. aureus*, frente às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), mantido constante os distintos tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas).

Os valores observados nos APÊNDICES K, L, M, N, O e P, para *S. aureus*, estão compilados e são discutidos a partir da TAB. 1.

Na TAB. 1 estão demonstrados os valores médios das contagens das colônias viáveis do micro-organismo transformadas pela expressão logarítmica, frente às diferentes concentrações do extrato aquoso vegetal, pelo tempo de contato. A inativação de *S. aureus* ocorreu pela exposição à concentração de 75 mg/ml de *Stryphnodendron adstringens*.

TABELA 1

Valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias, na alíquota de 100 µl de *Staphylococcus aureus*, transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de contato em horas (h)

| Concentração do extrato aquoso (mg/ml) | Tempo de contato do extrato aquoso em horas (h) |            |            |            |            |
|--|---|------------|------------|------------|------------|
|  | 0   | 6          | 12         | 18         | 24         |
|  | UFC   | UFC        | UFC        | UFC        | UFC        |
| 1,00                                   | 2,28 A , c                                      | 2,18 A , c | 3,53 A , b | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| 5,00                                   | 2,13 A , b                                      | 1,31 B , c | 2,28 B , b | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| 25,00                                  | 1,80 B , c                                      | 1,07 C , d | 1,61 C , c | 2,78 B , b | 4,00 A , a |
| 50,00                                  | 1,49 C , b                                      | 0,67 D , c | 0,30 D , d | 2,87 B , a | 2,67 B , a |
| 75,00                                  | 1,12 D , b                                      | 0,26 E , d | 0,10 D , d | 2,01 C , a | 0,87 C , c |
| C.V.(%)                                | 4,55%   |            |            |            |            |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: (A) Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam semelhança estatística. (a) Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam semelhança estatística. Os valores seguidos de letras iguais são semelhantes estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ). C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

De acordo a TAB. 1, as menores contagens de UFC foram identificadas entre a sexta e décima segunda horas, nos tratamentos de 50 e 75 mg/ml, porém nesta, a estabilização das contagens aconteceu, determinando-se a concentração inibitória mínima - CIM de *S. adstringens* (75 mg/ml) para *S. aureus*.

Nas menores concentrações testadas, 1 mg/ml e 5 mg/ml, para quaisquer dos tempos de exposição, foram determinados os maiores valores de UFC, e provavelmente houve menor influência bactericida e/ou bacteriostática (TAB. 1).

Verificou-se o ponto de corte, entre as menores e maiores diluições em 25 mg/ml, representando. Todavia em função da elevação dos valores de UFC, na décima oitava e vigésima quarta horas, não foi possível, estabelecer a concentração bactericida para o patógeno.

A menor concentração inibitória, para *S. aureus* foi obtida com 75 mg/ml, quando ao longo dos tempos de exposição, não houve elevação expressiva no número de colônias viáveis, exceto na décima oitava hora, em contraponto à concentração de 50 mg/ml, que nos intervalos da zero a décima segunda hora, possui valores baixos de contaminação, significativos e próximos ao da menor diluição, mas comparando a décima oitava e vigésima quarta hora, os valores diferem estatisticamente de forma expressiva.

Realizou-se a análise regressão com os valores médios das contagens das colônias viáveis de *Staphylococcus aureus*, para a obtenção das cinéticas de inativação. Na TAB. 2, são demonstradas as equações resultantes das análises de regressão, em unidades formadoras de colônias - UFC/100 $\mu$ l, com os resultados transformados pela expressão logarítmica, Log (X+1), relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* em função do tempo de conato em horas.

Encontram-se na TAB. 2 outros fatores importantes, como os coeficientes de regressão ( $\beta_0$  ;  $\beta_1$  ;  $\beta_2$  ;  $\beta_3$ ), de determinação ( $R^2$ ), de variação (C.V.%) e as significâncias.

TABELA 2

Equações ajustadas pelas análises de regressão dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* - UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica, Log (X+1), relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de contato do micro-organismo em horas (h)

| Concentrações do extrato aquoso (mg/ml) | Equações ajustadas pelas regressões dos valores de colônias viáveis. | R <sup>2</sup> | C.V.(%) |
|---|--|----------------|---------|
| 1,00                                    | $Y = 2,24456 - 0,110338*X + 0,0253932**X^2 - 0,000742336**X^3$       | 0,97           | 0,66    |
| 5,00                                    | $Y = 2,1457 - 0,42417**X + 0,0533753**X^2 - 0,00135197**X^3$         | 0,99           | 1,57    |
| 25,00                                   | $Y = 1,7983 - 0,258612**X + 0,0258555**X^2 - 0,000469129**X^3$       | 0,99           | 3,24    |
| 50,00                                   | $Y = 1,61154 - 0,509254**X + 0,0531365**X^2 - 0,0012448**X^3$        | 0,82           | 8,91    |
| 75,00                                   | $Y = 1,21411 - 0,500262**X + 0,0552433**X^2 - 0,00145153**X^3$       | 0,74           | 24,26   |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: Y = valor observado da variável dependente (unidades formadoras de colônias), no nível da variável independente X (tempo em horas).

O modelo das equações utilizadas segue o padrão linear de 3º grau. Dado por:

$Y = \beta_0 + \beta_1X + \beta_2X^2 + \beta_3X^3$ , em que:  $\beta_0$  = constante da regressão;  $\beta_1$  = coeficiente da regressão;  $\beta_2$  = coeficiente da regressão do componente quadrático e  $\beta_3$  = coeficiente da regressão do componente cúbico.

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação.

C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

Para as equações, os coeficientes de regressão, seguidos de duplo asterisco ( $\beta_i**X^i$ ) possuem significância a 1% e os acompanhados de um asterisco ( $\beta_i*X^i$ ) possuem significância a 5%.

O GRÁF. 1 foi construído, com base na TAB. 2 e mostra as curvas de inativação de *Staphylococcus aureus*, originadas das equações da regressão, com a utilização dos valores médios das contagens das colônias viáveis, pelo tempo de contato. Todos os coeficientes e as significâncias influenciam no desenho.

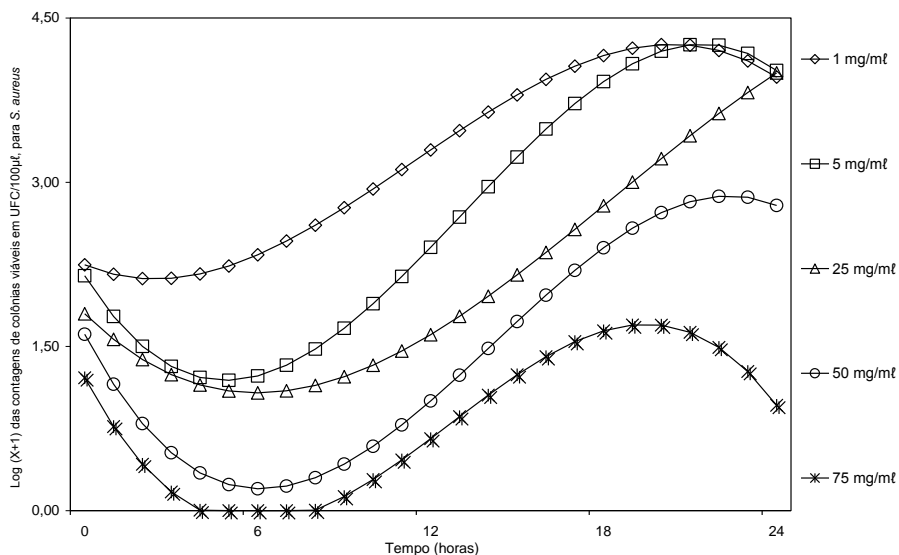


GRÁFICO 1 – Curvas das cinéticas de inativação, calculadas pelas equações resultantes das análises das regressões, dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias do *Staphylococcus aureus* - UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica, Log (X+1), relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h) sobre o micro-organismo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

As curvas da cinética de inativação de *S. aureus*, demonstradas no GRÁF. 1, foram traçadas com a utilização das equações calculadas das regressões das unidades formadoras de colônias, nos tempos 0, 6, 12, 18 e 24 horas, expostas às cinco concentrações do extrato aquoso vegetal (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml).

Para o modelo proposto, verificou-se a existência de relação funcional entre a variável dependente, representada pela a contagem das unidades formadoras de colônia (Y), com a variável independente, o tempo em horas (X). Todos os coeficientes de regressão definidos ( $\beta_i$ ) nas equações calculadas apresentaram nível de significância, variando de 1% ou 5%.

Ao demonstrar que os coeficientes de regressão ( $\beta_i$ ) possuem significância, ao nível de 1% e 5%, as equações encontradas na TAB. 2 foram validadas estatisticamente, para o delineamento das curvas de inativação de *S. aureus*. Isso comprova a correlação do efeito inibidor das concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, sobre o agente, pois em 50 e 75 mg/ml, diminuem progressivamente a contagem de colônias do patógeno ao longo de tempos de exposição até a décima segunda hora.

Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) encontrados para as equações representadas pelas diferentes diluições do extrato, estão descritos na TAB. 2. As maiores diluições 1, 5, 25 mg/ml são as que apresentam os valores mais próximos a unidade, e indicam a melhor qualidade no ajuste do modelo de regressão na dispersão dos valores encontrados, diminuindo a interferência de causas aleatórias medidas pelo erro ou desvio da regressão. As menores diluições, 50 e 75 mg/ml, com os valores de 0,82 e 0,74 respectivamente, afastam-se da unidade. Para os coeficientes de variação das equações, outro indicador da qualidade do ajustamento das curvas, serve a premissa, que quanto menor essa grandeza tanto melhor o resultado, portanto os valores de 1, 5, 25 mg/ml da solução extrativas apresentaram melhores resultados que as de 50 e 75 mg/ml.

As disposições das curvas inativantes legitimaram os resultados da macrodiluição em tubos para *S. aureus*, verificando-se nas curvas de inibição, a concentração inibitória mínima – CIM, na concentração de 75 mg/ml, sem a ocorrência de concentração bactericida mínima.

Souza *et al.* (2007a) e Xavier *et al.* (2008), descreveram concentrações inibitórias mínimas- CIM de 50 mg/ml e 200 µg/ml a 400 µg/ml, respectivamente, para *S. aureus* frente à solução extrativa etanólica a 50% (p/v) de *Stryphnodendron adstringens*. A disparidade dos resultados pode ser explicada pelos diferentes métodos de extração usadas nessas pesquisas, a percolação e a maceração dinâmica, nessa ordem, e da mistura extrativa empregada, pois o álcool etílico hidratado possui menor polaridade, quando comparado a mistura metanol e água.

Para cepas padrão de *S aureus* determinou-se a CIM e a CBM de 125 de 250 µg/ml, respectivamente, usando o mesmo gênero, porém em espécies diferentes da planta; *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae) e *Stryphnodendron obovatum* Benth. (Leguminosae). Nesses estudos determinaram-se menores CIM e CBM, provavelmente pelo processo de isolamento e purificação dos bio-ativos, com menores interferentes na ação sobre o micro-organismo (LOPES *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 2005).

Outras espécies e substâncias vegetais foram testadas com sucesso, contra *S. aureus* para sensibilidade *in vitro*: *Persicaria senegalense*, Polygonaceae; *Eucalyptos* spp (Labill.), Myrtaceae; *Tagetes minuta* (Linn.), Compositae; *Melianthus comosus* (Vahl.), Melianthaceae, *Melianthus major* L., Melianthaceae; *Dodonaea viscosa* (Benth.), Sapindaceae e amostras padrão de óleos essenciais, como o trans-cinamaldeído, eugenol, carvacrol e o timol (ABAINEH; SINTAYEHU, 2001; BASKARAN *et al.*, 2009; AVANCINI *et al.*, 2008; SCHUCH *et al.*, 2008; HEYMAN *et al.*, 2009; SCHUCH, 2007).

A TAB. 3 demonstra o diâmetro médio dos halos de inibição, em milímetros (mm), do crescimento da cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), junto ao inóculo de  $1,00 \times 10^8$  a  $9,00 \times 10^8$  UFC/ml de *S. aureus* em meio Müller Hinton, após incubação de 24 horas. Pela TAB. 3 verifica-se que ocorreu diferença significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre as crescentes concentrações da preparação vegetal, a partir de 25 mg/ml, se comparada com 1 mg/ml e 5 mg/ml.



TABELA 3

Diâmetro médio dos halos de inibição, em milímetros (mm), do crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), após incubação de 24 horas

| Microrganismo           | Concentrações do extrato aquoso de barbatimão |        |         |         |         |
|-------------------------|---|--------|---------|---------|---------|
|                         | 1,00  | 5,00   | 25,00   | 50,00   | 75,00   |
| UFC/ml                  | mg/ml   |        |         |         |         |
| <b><i>S. aureus</i></b> | 5,00 b  | 6,24 b | 10,60 a | 11,34 a | 13,61 a |
| <b>C.V.(%)</b>          | 16,10%  |        |         |         |         |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: A análise estatística foi realizada no delineamento inteiramente casualizado – DIC. Foram realizadas cinco repetições, para as cinco concentrações (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml). As medições são os diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm).

O inóculo utilizado do *S. aureus* foi de  $1,00 \times 10^8$  a  $9,00 \times 10^8$  UFC/ml.

Os valores seguidos de letras iguais, na linha são similares estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem

A sensibilidade de *S. aureus* às concentrações de 25,00, 50,00 e 75,00 mg/ml do extrato de *S. adstringens* foi ratificada pelos maiores halos de inibição obtidos nestas ( $p \leq 0,01$ ).

Contrariamente nas menores concentrações (1 mg/ml e 5 mg/ml) os resultados forma similares ao controle negativo, sem o extrato da planta, não havendo sensibilidade nestas condições.

Nas frações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* de 25,00, 50,00 e 75,00 mg/ml, os diâmetros médios dos halos de inibição de 10,60 mm; 11,34 mm e 13,61 mm, respectivamente; ( $p \leq 0,01$ ) das maiores diluições, comprovam, o poder inibitório do extrato frente ao micro-organismo.

A macrodiluição em tubos, anteriormente empregada, para verificar a sensibilidade dos micro-organismos, indicou a CIM para 75,00 mg/ml e o teste de disco difusão demonstrou sensibilidade significativa, nas concentrações de 25,00, 50,00 e 75,00 mg/ml resultado que validou o resultado do teste da difusão, como preconizado nas NCCLS (2003a, 2003b, 2005).

Os valores médios encontrados, no teste de difusão em ágar, são próximos aos limites máximos, de 14,2 mm e 13,7 mm  $\pm$  1,5 mm encontrados por Xavier *et al.* (2008) e SOUZA *et al.* (2007b), para *S. aureus* frente ao extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*. Diferentes concentrações são empregadas em diversos estudos, para mesma espécie, possivelmente em função de distintos métodos de extração vegetal e na opção do emprego do composto purificado e isolado sem interferência de contaminantes (FERREIRA *et al.*, 2010; HOLETZ *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2005; SANCHES *et al.*, 2005; SOUZA *et al.* 2007a; SOUZA *et al.*, 2007b).

Verifica-se na TAB. 4 a sensibilidade de *S. aureus* (ATCC) frente às substâncias medicamentosas sintéticas, usadas na terapia animal da mastite bovina. Testaram-se os princípios ativos, oxacilina (OXA), a penicilina G (PEN-G), o imipenem (IPM) e a ceftazidima (CAZ), nas quantidades padrões de teste de, OXA - 1 $\mu$ g, PEN-G - 10  $\mu$ g, IPM - 10  $\mu$ g e a CAZ 30  $\mu$ g.

Na TAB. 4 demonstram-se os diâmetros dos halos de inibição (mm) causados pelos antibióticos para *Staphylococcus aureus*, as médias e desvios padrão dos halos de inibição, os antimicrobianos aplicados e os resultados para o teste de sensibilidade, com base nas NCCLS (2003a, 2003b, 2005).

TABELA 4

Resultados do teste de disco difusão, em função dos diâmetros em milímetros dos halos de inibição, médias e desvios padrão obtidos pela verificação da sensibilidade de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), frente aos antimicrobianos (oxacilina 1 µg, penicilina G 10 µg, imipenem 10 µg e ceftazidima 30 µg)

| Patógeno          | Antimicrobianos |               |               |                |
|-------------------|-----------------|---------------|---------------|----------------|
|                   | OXA 1 µg        | PEN-G 10 µg   | IPM 10 µg     | CAZ 30 µg      |
|                   | halo inibição   | halo inibição | halo inibição | halo inibição  |
|                   | 30,00           | 51,80         | 53,15         | 30,65          |
|                   | 32,80           | 48,60         | 52,80         | 29,70          |
| <b>S. aureus</b>  | 32,00           | 49,10         | 58,30         | 31,10          |
|                   | 31,50           | 52,15         | 52,50         | 33,70          |
|                   | 32,30           | 48,10         | 52,30         | 30,45          |
| <b>Médias</b>     | 31,72           | 49,95         | 53,81         | 31,12          |
| <b>Desvios ±</b>  | 1,07            | 1,89          | 2,53          | 1,53           |
| <b>Resultado*</b> | SENSÍVEL*       | SENSÍVEL*     | SENSÍVEL*     | INTERMEDIÁRIO* |

\*Fonte: NCCLS, 2003a, 2003b, 2005.

De acordo as NCCLS (2003a, 2003b, 2005) o antibiograma realizado sobre *S. aureus*, frente às substâncias antimicrobianas medicamentosas sintéticas convencionais, rotineiramente empregadas na terapia da mastite, com a qual se avaliou a sensibilidade do micro-organismo, resultaram em cepa sensível para a oxacilina 1 µg; penicilina-G 10 µg; Imipenem 10 µg e de caráter intermediário frente à ceftazidima 30 µg. Assim, conforme Alvarez *et al.* (2010) esta estirpe não é resistente à meticilina, *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* – MRSA, porém apresenta nível intermediário de resistência à cefalosporina, com anel beta-lactâmico, semi-sintética de terceira geração (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

### 5.2.2 *Escherichia coli*

O bastonete Gram-negativo *E. coli* faz parte do grupo de bactérias causadoras da mastite ambiental, caracterizada como coliforme, pois se encontra no trato gastrintestinal. O micro-organismo é dotado de fatores de virulência, como diversas adesinas altamente especializadas e exotoxinas liberadas e absorvidas pela corrente sanguínea, as quais causam sintomas da mastite clínica, locais e sistêmicos (SANTOS; FONSECA, 2007; MURRAY *et al.*, 2006).

A *E coli* (ATCC 8739), no teste de macrodiluição em tubos, não apresentou sensibilidade frente às crescentes concentrações do extrato aquoso de *S. adstringens* e nos tempos de exposição propostos. Desse modo, não foram obtidos os índices de concentração inibitória e bactericida – CIM e CBM, respectivamente.

Na TAB. 5 são mostrados os valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias – UFC/100 $\mu$ l, de *Escherichia coli*, transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h).

Nos APÊNDICES C e D estão apresentadas as leituras originais das contagens das unidades formadoras de colônia – UFC/100 $\mu$ l, da *Escherichia coli* (ATCC 8739), depois de realizado o procedimento de macrodiluição em tubos, para a determinação das concentrações inibitória e bactericida mínimas. O APÊNDICE C contém os dados reais das leituras das colônias viáveis e no O APÊNDICE D estão os dados transformados pela equação Log (X+1), para desenho dos modelos e delineamentos estatísticos.

Nos APÊNDICES K, L e M estão demonstrados os valores médios das contagens de UFC viáveis em 100  $\mu$ l, transformados pela equação Log (X+1), resultantes da análise individual da interação entre o micro-organismo *E. coli*; frente aos tempos de exposição (0, 6, 12, 18 e 24 horas), mantida constante às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml).

Nos APÊNDICES N, O e P estão demonstrados os valores médios das contagens de UFC viáveis em 100  $\mu\text{l}$ , transformados pela equação Log (X+1), resultantes da análise individual da interação entre *E.coli*, frente às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), mantido constante os distintos tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas).

Os valores observados nos APÊNDICES K, L, M, N, O e P, para *E. coli*, estão compilados e são discutidos a partir da TAB. 5.

TABELA 5

Valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias, na alíquota de 100  $\mu\text{l}$  de *Escherichia coli*, transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h)

| Concentração<br>do extrato<br>aquoso<br>mg/ml | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |            |            |            |            |
|---|---|------------|------------|------------|------------|
|   | 0   | 6          | 12         | 18         | 24         |
|   | UFC   | UFC        | UFC        | UFC        | UFC        |
| 1,00  | 2,40 A , b                                      | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| 5,00  | 1,41 C , b                                      | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| 25,00   | 1,65 B , b                                      | 1,66 B , b | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| 50,00   | 1,39 C , c                                      | 1,48 B , c | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 2,85 C , b |
| 75,00   | 0,77 D , d                                      | 0,26 C , e | 3,60 B , a | 3,37 B , b | 3,10 B , c |
| <b>C.V.(%)</b>                                | 4,55%   |            |            |            |            |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: (A) Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam semelhança estatística.

(a) Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam semelhança estatística.

Os valores seguidos de letras iguais são semelhantes estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ). C.V.(%) = Coeficiente de variação em percentagem.

De acordo a análise dos dados da TAB. 5, obtidos pela interação entre os micro-organismos, as concentrações e os tempos, no esquema fatorial triplo, no delineamento inteiramente casualizado - DIC ocorreram, de

forma genérica, reduções significativas nas contagens microbianas. Observou-se o decréscimo nos menores tempos de contato, entre a substância extrativa e o patógeno, principalmente na zero e sexta horas, adjacente às menores diluições do extrato, correspondente as frações de 50 e 75 mg/ml. Entretanto, na sexta hora, conjugada a maior concentração testada, não foi possível verificar a ação bactericida.

O fato de encontrarem-se as menores contagens de colônias viáveis, nos menores intervalos de contato (0 e 6 horas), entre o extrato vegetal e o agente infectante, deve-se ao tempo diminuto para o micro-organismo proceder aos processos metabólicos de replicação celular; somado ao fato da substância extrativa promover algum tipo de restrição nutricional ao meio de cultura, mesmo com a inclusão intencional de uma vez e meia da concentração proposta pelo fabricante no rótulo. Essas hipóteses são levantadas, dado que a partir da décima segunda à vigésima quarta horas, para todas as concentrações testadas, a contagem bacteriana se eleva, exceto para as maiores concentrações, porém permanecem em valores elevados de contagem. Assim, mostram a capacidade de adaptação do organismo Gram-negativo, as condições adversas impostas (SILVEIRA *et al.*, 2006; HOEFEL; LAUTERT, 2006; TAVARES, 2000).

Decompondo as variáveis, nota-se que as concentrações 1, 5, 25 mg/ml, dependente ou não dos tempos de exposição, não interferiram no desenvolvimento e replicação bacteriana, sendo que a partir da décima segunda hora, inclusive a porção de 50 mg/ml, exceto na vigésima quarta hora, não existiram diferenças significativas entre as contagens avaliadas, sendo essas o maior valor considerado para o trabalho  $1 \times 10^4$  UFC.

Na diluição, na qual se obteve 50 mg/ml, foi demonstrada a influência do fator tempo, para *E. coli*, como anteriormente mencionado nas zero e sexta horas, ocorrem às maiores inibições da bactéria, para todas as apresentações do extrato da planta. Porém na fração de 50 mg/ml, observam-se valores máximos de contagem, na décima segunda e décima oitava horas, e o retorno à tendência a redução na vigésima quarta hora. Apesar das menores contagens na vigésima quarta hora o teste não pode

ser caracterizado, como concentração inibitória mínima, conforme NCCLS (2003a, 2003b, 2005)

A preparação de 75 mg/ml, como apresentado na TAB. 5, foi à única, dentre as cinco concentrações testadas do extrato, a apresentar contagens significativamente inferior de colônias bacterianas viáveis, para todos os tempos de exposição testados, salvo na vigésima quarta hora para a fração de 50 mg/ml. Pode-se afirmar que *E. coli* apresenta alguma suscetibilidade, somente para a menor diluição do extrato avaliada, como a indicada na disco difusão, para a mesma concentração.

A condição descrita para a concentração de 50 mg/ml é seguida de forma semelhante pela de 75 mg/ml na qual, também, não é possível defini-la como a menor concentração inibitória.

Foi confirmada a utilização do modelo da regressão linear, para *E. coli*, pela relação entre a variável dependente, contagem das colônias viáveis da bactéria, com a variável independente, o tempo em horas (X) (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

Na TAB. 6 estão apresentadas as equações das análises de regressão dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* - UFC/100 $\mu$ l, transformados pela expressão logarítmica, Log (X+1), relacionando, a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de contato do micro-organismo em horas. Da mesma forma, demonstram-se os coeficientes de regressão ( $\beta_0$  ;  $\beta_1$  ;  $\beta_2$  ;  $\beta_3$ ), de determinação ( $R^2$ ), de variação (C.V.%) e as significâncias.

TABELA 6

Equações ajustadas pelas análises de regressão dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* - UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica, Log (X+1), relacionando, a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de contato do micro-organismo em horas (h)

| Concentrações do extrato aquoso (mg/ml) | Equações ajustadas pelas regressões dos valores de colônias viáveis      | R <sup>2</sup> | C.V.(%) |
|---|--|----------------|---------|
| 1,00                                    | $Y = 2,42764 + 0,395633^{**}X - 0,0284856^{**}X^2 + 0,000615429^{**}X^3$ | 0,98           | 0,57    |
| 5,00                                    | $Y = 1,45125 + 0,641302^{**}X - 0,0461738^{**}X^2 + 0,000997581^{**}X^3$ | 0,98           | 0,38    |
| 25,00                                   | $Y = 1,5487 - 0,0492035^{ns}X + 0,027755^{*}X^2 - 0,000900976^{**}X^3$   | 0,89           | 2,32    |
| 50,00                                   | $Y = 1,30151 - 0,0994858^{ns}X + 0,0398502^{**}X^2 - 0,00138214^{**}X^3$ | 0,91           | 3,62    |
| 75,00                                   | $Y = 0,617900 - 0,189873^{ns}X + 0,0480673^{*}X^2 - 0,00150467^{**}X^3$  | 0,83           | 5,81    |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: Y = valor observado da variável dependente (unidades formadoras de colônias), no nível da variável independente X (tempo em horas).

O modelo das equações utilizadas segue o padrão linear de 3º grau. Dado por:

$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \beta_3 X^3$ , em que:  $\beta_0$  = constante da regressão;  $\beta_1$  = coeficiente da regressão;  $\beta_2$  = coeficiente da regressão do componente quadrático e  $\beta_3$  = coeficiente da regressão do componente cúbico.

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação.

C.V.% = Coeficiente de variação em porcentagem.

Para as equações, os coeficientes de regressão, seguidos de duplo asterisco ( $\beta_i^{**}X^i$ ) possuem significância a 1% e os acompanhados de um asterisco ( $\beta_i^{*}X^i$ ) possuem significância a 5%. Os coeficientes de regressão, seguidos do termo, ns, ( $\beta_i^{ns}X^i$ ) não possuem significância no modelo.



O GRÁF. 2 mostra as curvas de inativação de *Escherichia coli* definidas pelos valores das resoluções das equações de regressão, mostrados na TAB. 5, das médias das contagens de colônias viáveis, e tempo de contato ao extrato aquoso. Todos os coeficientes e as significâncias influenciam no traçado do gráfico.

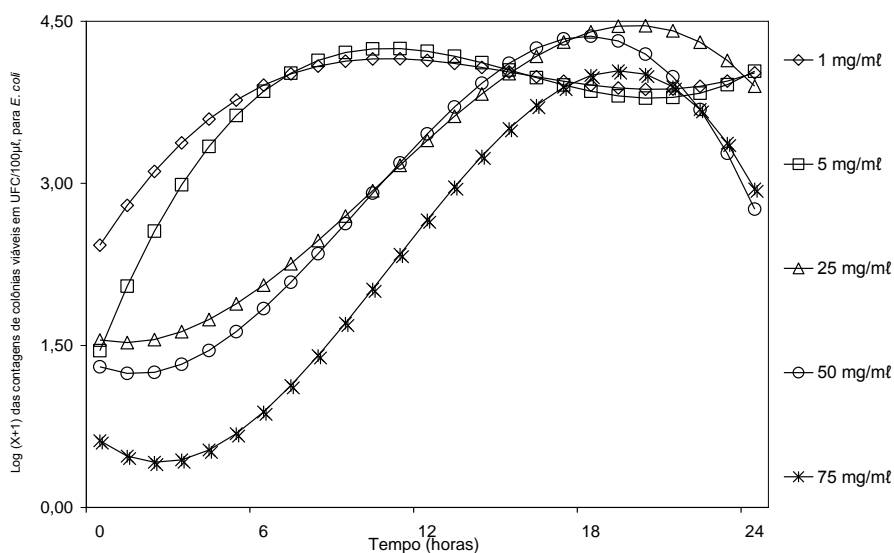


GRÁFICO 2 - Curvas das cinéticas de inativação, calculadas pelas equações resultantes das análises das regressões, dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* - UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica,  $\text{Log}(X+1)$ , relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h) sobre o micro-organismo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

Todos os coeficientes de regressão dos componentes quadráticos ( $\beta_i \cdot X^2$ ) e cúbicos definidos ( $\beta_i \cdot X^3$ ) nas equações encontradas apresentaram significância, de 1% ou 5%, como verificado na TAB. 6. Para as equações, que definiram a curva de inibição do micro-organismo, nas concentrações 1 mg/ml e 5 mg/ml, todos os coeficientes de regressão demonstraram significância a 1% (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

Os modelos matemáticos definidos para as menores diluições, 25, 50 e 75 mg/ml, não se mostraram significantes para o coeficiente de regressão

linear, ou seja para esse nível do modelo utilizado, as variáveis envolvidas não se correlacionam.

Para o desenho das cinéticas de inibição de *Escherichia coli* (ATCC 8739) foram utilizadas as equações cúbicas e significativas a 1%, descritas na TAB. 6. Os dados obtidos foram plotados e construiu-se o GRÁF. 2. Pela análise gráfica comprova-se mínimo efeito inibitório para *E. coli*, frente às concentrações do extrato aquoso da planta de 50 e 75 mg/ml, nas primeiras horas. No decorrer do período, houve a partir da décima segunda e décima oitava horas, aumento progressivo das contagens de unidades formadoras de colônias, com estabilização na vigésima quarta hora, nas concentrações 25, 50 e 75 mg/ml, e com tendência aumento nas concentrações 1 mg/ml e 5 mg/ml.

Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) estão descritos na TAB. 6. As concentrações 1, 5, 50 mg/ml são as que apresentam os maiores valores, com os melhores ajustes ao modelo, para 25 mg/ml e 75 mg/ml do extrato, encontrou-se ( $R^2$ ) de 0,89 e 0,83 respectivamente. Todos os valores de coeficiente de variação, em todas as equações foram inferiores a 6%, ou seja, para a análise de variância as curvas estavam bem ajustadas.

As disposições das cinéticas de inativação legitimaram os resultados da macrodiluição em tubos para *E. coli* (ATCC 8739), não sendo verificada a inibição do micro-organismo portanto, sem a concentração inibitória mínima – CIM.

O patógeno *Escherichia coli* (ATCC 8739) não apresentou sensibilidade para o teste de macrodiluição em tubos, frente às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*. Portanto não foram definidos os índices de menor concentração inibitória e bactericida – CIM e CBM.

A ausência de sensibilidade de *E. coli*, frente aos componentes tânicos do extrato vegetal, pode ser esclarecida pela mureína externa à parede celular da bactéria. Essa estrutura possui elevada capacidade de resistência a injúrias, por diversas substâncias químicas. A natureza desse composto externo é uma dupla camada possuidora de fosfolipídios e o

lipopolissacarídeo bacteriano – LPS (LIMA *et al.*, 2011; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

O LPS possui seletividade, via porinas, tanto para substâncias hidrofóbicas, como hidrofílicas, por causa do caráter anfifílico da molécula. Os taninos, condensados e hidrolisáveis em extrato aquoso, geralmente são estruturas químicas ligadas aos glicosídeos e nessas moléculas estão presentes, grandes quantidades de hidroxilas fenólicas. Dessa maneira pode-se inferir que os componentes tânicos estejam envoltos em água de solvatação, principalmente nas partes glicídicas da molécula, aumentando a área, além da porção genina da molécula conter caráter lipofílico acentuado (LIMA *et al.*, 2011; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

A restrição a inclusão dos compostos fenólicos nos organismos Gram-negativos decorre de mecanismos de proteção celular: a exclusão pelo tamanho das moléculas, via porinas, estreitas o suficiente para selecionar a entrada de compostos de até 700 daltons; pela natureza química, dos canais seletivos diminutos, a ponto dos compostos hidrofóbicos (geninas) serem repelidos, em contato com a parte polar externa do canal e quando a membrana utiliza mecanismos de transporte dedicados a compostos hidrofílicos (WOOLEY, *et al.*, 1992; LIMA *et al.*, 2011; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Extratos brutos e etil-acetilados de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae) e *Stryphnodendron obovatum* Benth. (Leguminosae) não foram inibitórios sobre *E. coli*, na macrodiluição em placas, conforme Lopes *et al.* (2003) e Lopes *et al.* (2005). Portanto, os resultados dessa pesquisa corroboram os encontrados pelos autores supracitados. As concentrações do extrato de *Stryphnodendron adstringens* utilizadas nos diferentes trabalhos divergem pela purificação e isolamento das porções extrativas. Assim é esperado que o aumento da pureza implique em menor quantidade do uso do composto vegetal, para obtenção dos mesmos efeitos inibitórios.

Na TAB. 7 encontram-se os resultados da sensibilidade *in vitro*, demonstrado pelo diâmetro médio dos halos de inibição de *E. coli* frente *Stryphnodendron adstringens*.

TABELA 7

Diâmetro médio dos halos de inibição, em milímetros (mm), do crescimento de *Escherichia coli* (ATCC 8739) frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), após incubação de 24 horas

| Microrganismo  | Concentrações do extrato aquoso de barbatimão |        |         |        |         |
|----------------|---|--------|---------|--------|---------|
|                | 1,00  | 5,00   | 25,00   | 50,00  | 75,00   |
| UFC/ml         | mg/ml   |        |         |        |         |
| <i>E. coli</i> | 5,00 b  | 5,00 b | 9,09 ab | 6,99 b | 12,24 a |
| C.V.(%)        | 23,97%  |        |         |        |         |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: A análise estatística foi realizada no delineamento inteiramente casualizado – DIC. Foram realizadas cinco repetições, para as cinco concentrações (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml). As medições são os diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm).

O inóculo utilizado de *E. coli* foi de  $1,00 \times 10^8$  a  $9,00 \times 10^8$  UFC/ml.

Os valores seguidos de letras iguais, na linha são similares estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

Como verificado na TAB. 7 não foi estabelecida significância ( $p \leq 0,01$ ) para fração de 25 mg/ml, pois seu halo de inibição representou medida intermediária entre a maior (75 mg/ml) das encontradas nas menores (1 mg/ml e 5 mg/ml) concentrações.

Os resultados da ausência de sensibilidade de *E. coli*, ao extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, obtidos na macrodiluição, não foram totalmente confirmados pela técnica do disco difusão em ágar ( $p \leq 0,01$ ). Verifica-se pela TAB. 7, que o halo de inibição de 12,24 mm  $\pm$  2,32 mm, para a concentração de 75 mg/ml, possui sensibilidade significativa, em relação às porções de 1 mg/ml e 5 mg/ml, as duas com diâmetro de 5,00 mm, tamanho esse semelhante ao controle negativo, sem a impregnação de extrato vegetal no disco.

A CIM e CBM de *S. adstringens* frente *E. coli*, na macrodiluição em tubos tanto e na disco difusão em ágar resultou em 75,00 mg/ml e 50 a 100 mg/ml (SOUZA *et al.*; 2007a; SOUZA *et al.*, 2007b). Os halos de inibição foram de 11,50 mm  $\pm$  0,7 mm (SOUZA *et al.*; 2007a) e 13,93 mm  $\pm$  0,8 mm (SOUZA *et al.*, 2007b) para frações etanólicas e acetônicas de

*Stryphnodendron adstringens*. Em relação aos diâmetros de inibição desse estudo, o valor da média encontrada na concentração de 75,00 mg/ml foi 12,24 mm  $\pm$  2,32 mm, superior aos resultados anteriores, e considerado inibitório estatisticamente ( $p \leq 0,01$ ) à bactéria.

A maior sensibilidade verificada no teste do disco difusão, em relação à macrodiluição pode sugerir algumas interpretações. O meio de cultura ágar Müller Hinton, utilizado no teste difusivo, pode apresentar menor seletividade para a bactéria, em relação ao *BHI*, além dos nutrientes estarem em menor disponibilidade, após aplicação e difusão do extrato. Outra seria uma indicação positiva de proximidade da concentração inibitória mínima, visto que na macrodiluição, os valores para 75,00 mg/ml tenderam a ser menores, porém não foram conclusivos (NCCLS, 2003a, 2003b, 2005).

Na TAB. 8 demonstram-se os diâmetros dos halos de inibição (mm) causados pelos antibióticos para *Escherichia coli*, as médias e desvios padrão dos halos de inibição, os antimicrobianos aplicados e os resultados para o teste de sensibilidade, com base nas NCCLS (2003a, 2003b, 2005).

TABELA 8

Resultados do teste de disco difusão, em função dos diâmetros em milímetros (mm) dos halos de inibição, médias e desvios padrão obtidos pela verificação da sensibilidade de *Escherichia coli* (ATCC 8739), frente aos antimicrobianos (oxacilina 1µg, penicilina G 10µg, imipenem 10µg e ceftazidima 30µg)

| Patógeno          | Antimicrobianos |                |               |                |
|-------------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|
|                   | OXA 1µg         | PEN-G 10 µg    | IPM 10 µg     | CAZ 30 µg      |
|                   | halo inibição   | halo inibição  | halo inibição | halo inibição  |
| <i>E. coli</i>    | 5,00            | 20,15          | 34,00         | 33,55          |
|                   | 5,00            | 19,60          | 31,70         | 29,40          |
|                   | 5,00            | 17,80          | 33,10         | 32,00          |
|                   | 5,00            | 17,60          | 32,90         | 28,00          |
|                   | 5,00            | 17,70          | 32,80         | 30,75          |
| <b>Médias</b>     | 5,00            | 18,57          | 32,90         | 30,74          |
| <b>Desvios ±</b>  | 0,00            | 1,21           | 0,82          | 2,17           |
| <b>Resultado*</b> | RESISTENTE*     | INTERMEDIÁRIO* | SENSÍVEL*     | INTERMEDIÁRIO* |

Fonte: NCCLS, 2003a, 2003b, 2005.

De acordo o antibiograma para *E. coli*, frente às substâncias antimicrobianas medicamentosas sintéticas convencionais, empregadas na terapia da mastite, resultou em amostra resistente para a oxacilina 1 µg; de tolerância intermediária para à penicilina-G 10 µg e a ceftazidima 30 µg e sensível ao Imipenem 10 µg. Portanto, essa cepa demonstrou-se resistente e intermediária às penicilinas resistentes às betalactamases e penicilinases, característica fornecida pelo LPS e sensível aos carbapenens, também beta-lactâmicos (MIRIAGOU *et al.*, 2003; NCCLS, 2003a, 2003b, 2005).

### 5.2.3 *Streptococcus pyogenes*

Apesar do *S. pyogenes* (ATCC 19615) acometer principalmente seres humanos, sendo raramente associados à mastite contagiosa. O micro-organismo foi escolhido por ser do gênero, *Streptococcus* possuidor de espécies patogênicas para os animais, como o *S. agalactiae* (MURRAY *et al.*, 2006; SCHAECHTER *et al.*, 2002). Outro fator para a inclusão dessas bactérias Gram-positivas é a tolerância ao oxigênio, mesmo sendo preferencialmente anaeróbicas e, além disso, a maioria dos *Streptococcus* dos grupos A e B são  $\beta$  hemolíticos (RODOSTIST, *et al.*, 2002; SANTOS; FONSECA, 2007; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

A ideia central foi tentar extrapolar os resultados obtidos de *Streptococcus pyogenes*, para *Streptococcus agalactiae*, causador da mastite bovina, caracteristicamente contagiosa, com manifestação subclínica (RODOSTIST *et al.*, 2002; SANTOS; FONSECA, 2007; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Para *S. pyogenes* (ATCC 19615) foi possível estabelecer as concentrações, inibitória mínima – CIM e bactericida mínima – CBM, pela macrodiluição em tubos, frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *S. adstringens* nos tempos de contato propostos.

Na TAB. 9 são mostradas as médias das contagens das unidades formadoras de colônias de *Streptococcus pyogenes* - UFC/100 $\mu$ l, alteradas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente o extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* e o tempo de exposição em horas.

Nos APÊNDICES E e F demonstram as leituras das contagens das unidades formadoras de colônia viáveis - UFC/100 $\mu$ l, de *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), na diluição em tubos. O APÊNDICE E contém os dados originais das leituras das colônias viáveis e no APÊNDICE F os dados estão transformados pelo modelo matemático, Log (X+1).

Nos APÊNDICES K, L e M estão demonstrados os valores médios das contagens de UFC viáveis em 100  $\mu$ l, transformados pela equação Log (X+1), resultantes da análise individual da interação entre o micro-organismo *S. pyogenes*; frente aos tempos de exposição (0, 6, 12, 18 e 24

horas), mantida constante às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml).

Nos APÊNDICES N, O e P estão demonstrados os valores médios das contagens de UFC viáveis em 100 µl, transformados pela equação Log (X+1), resultantes da análise individual da interação entre *S. pyogenes*, frente às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), mantido constante os distintos tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas).

Os valores observados nos APÊNDICES K, L, M, N, O e P, para *S. pyogenes*, estão compilados e são discutidos a partir da TAB. 5.

TABELA 9

Valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias, na alíquota de 100 µl de *Streptococcus pyogenes*, transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h)

| Concentração do extrato aquoso | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |            |            |            |            |
|--------------------------------|---|------------|------------|------------|------------|
|                                | 0   | 6          | 12         | 18         | 24         |
| mg/ml                          | UFC   | UFC        | UFC        | UFC        | UFC        |
| 1,00                           | 1,43 A , c                                      | 0,10 B , d | 1,94 A , b | 4,00 A , a | 0,00 A , d |
| 5,00                           | 1,51 A , b                                      | 0,46 A , d | 0,83 B , c | 4,00 A , a | 0,00 A , e |
| 25,00                          | 1,45 A , b                                      | 0,00 B , c | 0,00 C , c | 4,00 A , a | 0,00 A , c |
| 50,00                          | 1,11 B , b                                      | 0,00 B , c | 0,00 C , c | 2,23 B , a | 0,00 A , c |
| 75,00                          | 1,04 B , b                                      | 0,00 B , c | 0,00 C , c | 1,36 C , a | 0,00 A , c |
| C.V.(%)                        | 4,55%   |            |            |            |            |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: (A) Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam semelhança estatística.  
 (a) Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam semelhança estatística.  
 Os valores seguidos de letras iguais são semelhantes estatisticamente, pelo teste Tukey (p≤0,01).  
 C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.



Ocorreram reduções significativas nas contagens de unidades formadoras de colônias, em todas as diluições testadas. Realizada as contagens, verificou-se que após vigésima quarta hora, não foram detectadas células de *S. pyogenes*, para nenhuma concentração, indicando ação bactericida do extrato aquoso de *S. adstringens*.

A sensibilidade de *S. pyogenes* foi influenciada significativamente pela concentração, quando comparada ao tempo de contato no teste de macrodiluição, pois na zero hora, as UFC viáveis foram expressivamente menores, com 50 mg/ml e 75 mg/ml do extrato.

Na sexta e décima segunda hora houve ação bactericida total em 25, 50 e 75 mg/ml, porém na vigésima quarta hora ocorreu efeito bactericida em todas as concentrações do extrato.

As concentrações 1 mg/ml e 5 mg/ml possuem médias semelhantes, de acordo TAB. 9, apesar de seus valores diferirem estatisticamente nos tempos 6 e 12 h. Desse modo, como existe tendência a estabilização das contagens dos organismos viáveis, entre a zero e a décima segunda hora, é possível definir a porção de 1 mg/ml, como a menor concentração inibitória, para o agente infectante em teste, assim definiu-se a CIM.

As frações 25, 50 e 75 mg/ml, independem do tempo de contato com o micro-organismo, de zero a sexta horas e determinam a destruição para *S. pyogenes*. Portanto, pela diluição de 25 mg/ml com igual efeito biocida, caracterizou-se a CBM.

Ao observar a TAB. 9, na décima oitava hora, evidencia-se o comportamento anômalo das leituras de colônias viáveis de *S. pyogenes*, frente às diferentes diluições do extrato. Conforme Penna e Machoshvili; (1997) uma vez que o micro-organismo é destruído por ação germicida, não existe a possibilidade de multiplicação do mesmo, dado sua inviabilidade. Contrário ao estado latente e viável da bactéria, em situações adversas, que colocada em condições ótimas de nutrição, temperatura, pressão, umidade e presença e/ou ausência de oxigênio, retorna as capacidades de multiplicação e infecção.

A explicação das leituras elevadas nas contagens de UFC, na décima oitava hora, após dois períodos de diminuição consecutivos, na sexta e

décima segunda horas, incluindo casos de ação destrutiva para algumas concentrações, seriam, provavelmente para essa série de tubos e repetições (18h), a degradação parcial ou total do bioativo vegetal, em função de fotodegradação, alterações do pH da mistura (hidrólise ácida), entre outras possíveis influências de natureza físico-químicas, sobre os taninos (KALLIO *et al.*, 1986).

Na TAB. 10 estão apresentadas as equações da regressão das contagens das colônias viáveis de *S. pyogenes* - UFC/100  $\mu\text{l}$ , transformados logaritmicamente para verificar a ação, frente ao agente, das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* e o tempo. Além disso, são demonstrados os coeficientes de regressão ( $\beta_0$ ;  $\beta_1$ ;  $\beta_2$ ;  $\beta_3$ ), de determinação ( $R^2$ ), de variação (C.V.%) e as significâncias.

TABELA 10

Equações ajustadas pelas análises de regressão dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Streptococcus pyogenes* - UFC/100  $\mu\text{l}$ , transformados pela expressão logarítmica,  $\text{Log}(X+1)$ , relacionando, a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de contato do micro-organismo em horas (h)

| Concentrações do extrato aquoso (mg/ml) | Equações ajustadas pelas regressões dos valores de colônias viáveis     | R <sup>2</sup> | C.V.(%) |
|---|---|----------------|---------|
| 1,00                                    | $Y = 1,47999 - 0,841747^{**}X + 0,118067^{**}X^2 - 0,0035617^{**}X^3$   | 0,99           | 8,33    |
| 5,00                                    | $Y = 1,67112 - 0,869267^{**}X + 0,113128^{**}X^2 - 0,00331371^{**}X^3$  | 0,82           | 7,03    |
| 25,00                                   | $Y = 1,65488 - 1,05729^{**}X + 0,129015^{**}X^2 - 0,00364470^{**}X^3$   | 0,75           | 0,64    |
| 50,00                                   | $Y = 1,22206 - 0,664847^{**}X + 0,0773596^{**}X^2 - 0,0021494^{**}X^3$  | 0,78           | 7,38    |
| 75,00                                   | $Y = 1,09963 - 0,495136^{**}X + 0,0536776^{**}X^2 - 0,00145193^{**}X^3$ | 0,84           | 10,39   |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: Y = valor observado da variável dependente (unidades formadoras de colônias), no nível da variável independente X (tempo em horas).

O modelo das equações utilizadas segue o padrão linear de 3º grau. Dado por:

$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \beta_3 X^3$ , em que:  $\beta_0$  = constante da regressão;  $\beta_1$  = coeficiente da regressão;  $\beta_2$  = coeficiente da regressão do componente quadrático e  $\beta_3$  = coeficiente da regressão do componente cúbico.

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação.

C.V.% = Coeficiente de variação em porcentagem.

Para as equações, os coeficientes de regressão, seguidos de duplo asterisco ( $\beta_i^{**}X^i$ ) possuem significância a 1% e os acompanhados de um asterisco ( $\beta_i^{*}X^i$ ) possuem significância a 5%. Os coeficientes de regressão, seguidos do termo, ns, ( $\beta_i^{ns}X^i$ ) não possuem significância no modelo.

O GRÁF. 3 demonstra as curvas da cinética de inativação para *S. pyogenes* traçadas pelas equações calculadas a partir da avaliação da regressão. Todos os coeficientes de regressão definidos ( $\beta_i$ ) nas equações calculadas apresentaram nível de significância de 1%, verificado na TAB. 10, indicando interação significativa entre a contagem das unidades formadoras de colônia (Y) e a variável independente, no caso o tempo em horas (X) (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

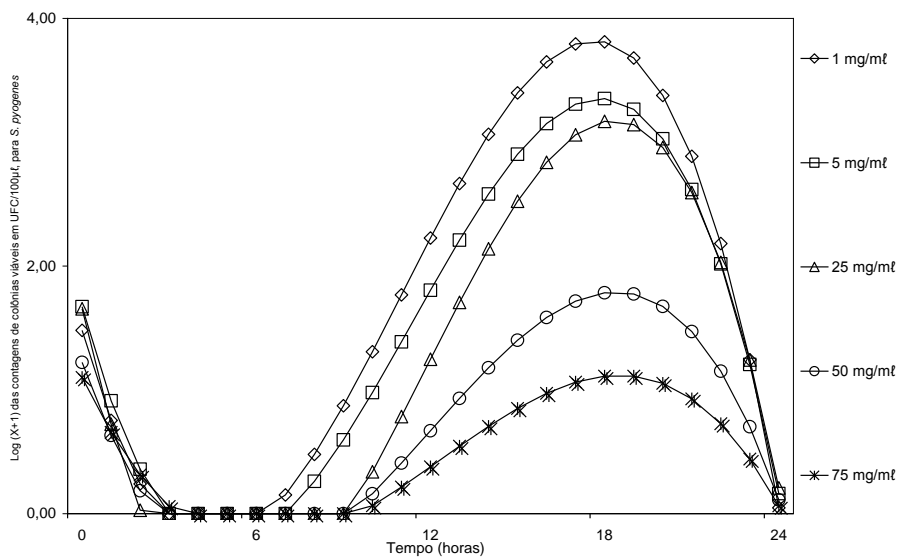


GRÁFICO 3 - Curvas das cinéticas de inativação, calculadas pelas equações resultantes das análises das regressões, dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Streptococcus pyogenes* - UFC/100 $\mu$ l, transformados pela expressão logarítmica, Log (X+1), relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h) sobre o micro-organismo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

De forma sucinta e esquemática mostra-se no GRÁF. 3 a inibição e o comportamento para *S. pyogenes*, idêntico, ao teste de sensibilidade na macrodiluição. No tempo zero houve um efeito estabilizador nas contagens das colônias viáveis, para todas as concentrações do extrato testadas.

Entre a zero e a décima segunda hora, ocorreu o declive abrupto de todas as curvas de inativação, indicada pela diminuição no número de colônias, a qual comprova o forte efeito inibidor do extrato de

*S. adstringens*, frente ao organismo. As concentrações 25, 50 e 75 mg/ml, apresentaram efeito bactericida na décima segunda hora.

Entre este tempo e a décima oitava hora, percebe-se novamente, o aclave das curvas, com menor angulação para as maiores concentrações de 50 e 75 mg/ml. Esse comportamento, como já citado anteriormente foi considerado atípico, com provável explicação na degradação dos ativos presentes na solução. As causas da degradação podem ser explicadas por vários fatores, excesso de luminosidade e umidade ambiental e condições físico-químicas inadequadas, como por exemplo, baixo pH, levando a hidrólise ácida dos compostos tânicos (SILVA; SILVA, 1999).

Na vigésima quarta hora não se verificaram presença de unidades formadoras de colônias, assim todas as diluições do extrato empregadas são bactericidas, para o *S. pyogenes*.

Na TAB. 10 são apresentados os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e coeficientes de variação calculados, a partir da regressão, para inibição do organismo Gram-positivo. A maior diluição 1 mg/ml apresentam o valor, 0,99, de melhor qualidade no ajuste da regressão e dispersão dos valores, com o segundo maior coeficiente de variação da curva. As demais frações 5, 25, 50 e 75 mg/ml possuem valores de determinação próximos, variando de 0,75 a 0,84, bem como valores de coeficientes de variação, entre 0,64 a 10,39%, ambas as características forneceram modelos matemáticos, com apenas 1% de significância, ou seja validas para o emprego do método.

A análise da regressão confirmou os resultados da macrodiluição em tubos para *S. pyogenes*, que ratificou os valores de 1 mg/ml para a concentração inibitória mínima – CIM e 25 mg/ml como concentração bactericida mínima – CBM.

A sensibilidade desse micro-organismo, a baixas concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* corrobora, com prática do tratamento das infecções causadas por *Streptococcus agalactiae* e seu congêneres humano, na qual a resposta à antibioticoterapia é apropriada e permite erradicação nos rebanhos infectados (SANTOS; FONSECA, 2007; RODOSTIST *et al.*, 2002; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Xavier *et al.* (2008), obtiveram concentrações inibitórias mínimas - CIM entre 100 a 400 µg/ml, de *S. adstringens* para *Streptococcus* esculina positivos e negativos, na técnica de macrodiluição. Os resultados distintos dessa pesquisa podem ser explicados pelos métodos de extração diferenciados, e nas especificações dos micro-organismos.

Provas de sensibilidade microbianas de extratos vegetais, frente *Streptococcus* spp. semelhantes foram realizados por Schuch *et al.* (2008) e Schuch (2007) nas quais extratos hidroalcolicos a 50% (p/v) de *Baccharis trimera*; *Eucalyptus* spp e *Tagetes minuta* demonstraram ação semelhante à clorexidina a 0,18%.

Pinto *et al.* (2001); Loguercio *et al.* (2006) e Pinto (2000) verificaram a suscetibilidade de *Streptococcus* spp e *Staphylococcus aureus* a diferentes extratos de própolis. Concentrações de extratos etanólicos da própolis mostraram-se inibitórias para *S. aureus* e bactericidas para *Streptococcus agalactiae*.

Na TAB. 11 estão descritos os resultados da sensibilidade *in vitro*, com as médias dos halos de inibição de *S. pyogenes*, quando em contato, às diferentes concentrações do extrato aquoso de *S. adstringes*, pelo método do disco difusão.

TABELA 11

Diâmetro médio dos halos de inibição, em milímetros (mm), do crescimento de *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), após incubação de 24 horas

| Microrganismo      | Concentrações do extrato aquoso de barbatimão |         |         |         |         |
|--------------------|---|---------|---------|---------|---------|
|                    | 1,00  | 5,00    | 25,00   | 50,00   | 75,00   |
| UFC/ml             | mg/ml   |         |         |         |         |
| <i>S. pyogenes</i> | 6,68 b  | 9,20 ab | 9,60 ab | 12,04 a | 12,53 a |
| C.V.(%)            | 20,39%  |         |         |         |         |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: A análise estatística foi realizada no delineamento inteiramente casualizado – DIC. Foram realizadas cinco repetições, para as cinco concentrações (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml). As medições são os diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm).

O inóculo utilizado de *S. pyogenes* foi de  $1,00 \times 10^8$  a  $9,00 \times 10^8$  UFC/ml.

Os valores seguidos de letras iguais, na linha são similares estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

Os maiores halos de inibição, frente o crescimento de *S. pyogenes* ocorreram em 50 mg/ml e 75 mg/ml, do extrato de *Stryphnodendron adstringens* e correspondem às médias de 12,04 mm e 12,53 mm, respectivamente, estatisticamente semelhantes entre si, porém diferentes do menor diâmetro de 6,68 mm observado em 1 mg/ml. Não houve significância ( $p \leq 0,01$ ), para as médias intermediárias de 9,20 mm e 9,60 mm, dos halos, às respectivas concentrações de 5 mg/ml e 25 mg/ml, entre o menor e os maiores diâmetros mensurados, em função da equidistância dos resultados, evidenciados na TAB. 11.

O teste do disco difusão para *S. pyogenes*, foi validado, pois confirmou a sensibilidade obtida na macrodiluição em tubos, porém em diluições menores, 50,00 mg/ml e 75,00 mg/ml. A suscetibilidade obtida na difusão é menos sensível à diluição, pois não ocorre interação efetiva, entre a substância medicamentosa e a suspensão bacteriana. Por isso existe a necessidade de complementação confirmatória para os testes de sensibilidade em disco, por meio da micro ou macrodiluição (NCCLS, 2003a, 2003b, 2005).

Oliveira *et al.* (2008) e Schmidt *et al.* (2008) determinaram as concentrações, inibitória e bactericida, mínimas – CIM e CBM de extratos *Baccharis trimera* e *Croton urucurana*, respectivamente, pelos métodos da macrodiluição e disco difusão, frente *S. pyogenes*.

O teste do disco difusivo foi validado para *S. pyogenes* na macrodiluição. O menor halo inibitório, 6,68 mm, foi observado para 1 mg/ml do extrato de *S. adstringens*. Os maiores halos ocorreram para 50 mg/ml e 75 mg/ml, correspondendo às médias de 12,04 mm e 12,53 mm, esses foram significativos e confirmaram a sensibilidade. Os resultados desse estudo estão no intervalo, ou são superiores aos estabelecidos por Oliveira *et al.* (2008) e Xavier *et al.* (2008) os quais demonstram, que o nível de significância adotado ( $p \leq 0,01$ ) pode interferir na interpretação dos resultados e comprova o caráter qualitativo da técnica de difusão, na qual a fraca interação existente entre o extrato e a suspensão bacteriana, limita as conclusões do teste, conforme NCCLS (2003a, 2003b, 2005).

Na TAB. 12 estão dispostos os resultados da sensibilidade para *Streptococcus pyogenes*, na presença de discos impregnados com antimicrobianos sintéticos convencionais no modelo difusivo. Os dados avaliados são os diâmetros dos halos de inibição (mm), as médias e os desvios padrão desses, baseados nas NCCLS (2003a, 2003b, 2005).



TABELA 12

Resultados do teste de disco difusão, em função dos diâmetros em milímetros (mm) dos halos de inibição, médias e desvios padrão obtidos pela verificação da sensibilidade de *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), frente aos antimicrobianos (oxacilina 1 µg, penicilina G 10 µg, imipenem 10 µg e ceftazidima 30 µg)

| Patógeno               | Antimicrobianos |               |               |               |
|------------------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
|                        | OXA 1 µg        | PEN-G 10 µg   | IPM 10 µg     | CAZ 30 µg     |
|                        | halo inibição   | Halo inibição | halo inibição | halo inibição |
| <b>S.<br/>pyogenes</b> | 35,55           | 64,00         | 59,50         | 43,25         |
|                        | 32,00           | 57,40         | 58,20         | 42,20         |
|                        | 33,80           | 52,50         | 64,50         | 36,40         |
|                        | 32,55           | 49,00         | 59,20         | 39,40         |
|                        | 33,48           | 55,75         | 61,15         | 43,95         |
| <b>Médias</b>          | 33,48           | 55,73         | 60,51         | 41,04         |
| <b>Desvios ±</b>       | 1,36            | 5,36          | 2,47          | 3,12          |
| <b>Resultado*</b>      | SENSÍVEL*       | SENSÍVEL*     | SENSÍVEL*     | SENSÍVEL*     |

Fonte: NCCLS, 2003a, 2003b, 2005.

Ao avaliar a sensibilidade de *S. pyogenes*, o antibiograma resultou em amostra sensível para: a oxacilina 1 µg, a penicilina-G 10 µg; ao Imipenem 10 µg e a ceftazidima 30 µg. Portanto, para a antibioticoterapia convencional, empregada na terapia da mastite, não existiram restrições aos beta-lactâmicos e aos cefalosporínicos de última geração, de acordo com NCCLS (2003a, 2003b, 2005).

#### 5.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Mesmo pouco descrita em infecções intramamárias (SCHUCH, 2007), a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* caracteriza-se como

oportunista, ubíqua e possui necessidades nutricionais mínimas, por isso sobrevive em vários ambientes, em grande número, fato que representa especial risco para os organismos debilitados e com sistema imunológico comprometido (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Dessa forma, sua utilização justifica-se pela capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos, desinfetantes e antissépticos; e de formar biofilmes (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Apesar de a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ser Gram-negativa e capacidade para formação de biofilmes; o patógeno foi sensível na macrodiluição em tubos. E estabeleceram-se as concentrações, inibitória e bactericida, mínimas. Para a CIM não houve precisão de valor, por estar compreendida entre 5 mg/ml e 25 mg/ml do extrato de *S. adstringens*.

A menor concentração da solução extrativa do vegetal, causadora da destruição bacteriana (CBM), definiu-se a partir da sexta hora de incubação, na porção correspondente a 25 mg/ml.

Na TAB. 13 são expostas as médias das contagens das unidades formadoras de colônias - UFC/100µl, de *Pseudomonas aeruginosa*, transformadas pela expressão, Log (X+1), na presença do extrato aquoso de *S. adstringens* pelo tempo de contato, que levaram a determinação da CIM e CBM.

As leituras das contagens de unidades formadoras de colônia (UFC/100µl), originais e transformadas pela expressão Log (X+1), da *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), após o procedimento de macrodiluição em tubos, para a definição das concentrações inibitória e bactericida mínimas, estão descritas nos APÊNDICES G e H.

Nos APÊNDICES K, L e M estão demonstrados os valores médios das contagens de UFC viáveis em 100 µl, transformados pela equação Log (X+1), resultantes da análise individual da interação entre o micro-organismo *P. aeruginosa*; frente aos tempos de exposição (0, 6, 12, 18 e 24 horas), mantida constante às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml).

Nos APÊNDICES N, O e P estão demonstrados os valores médios das contagens de UFC viáveis em 100 µl, transformados pela

equação Log (X+1), resultantes da análise individual da interação entre *P. aeruginosa*, frente às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), mantido constante os distintos tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas).

Os valores observados nos APÊNDICES K, L, M, N, O e P, para *P. aeruginosa*, estão compilados e são discutidos a partir da TAB. 13.

TABELA 13

Valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias, na alíquota de 100 µl de *Pseudomonas aeruginosa*, transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h)

| Concentração do extrato aquoso<br>mg/ml | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |            |            |            |            |
|---|---|------------|------------|------------|------------|
|   | 0   | 6          | 12         | 18         | 24         |
|   | UFC   | UFC        | UFC        | UFC        | UFC        |
| 1,00                                    | 1,83 AB,b                                       | 1,43 A , c | 2,02 A , b | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| 5,00                                    | 1,91 A , c                                      | 0,20 B , e | 0,77 B , d | 2,25 A , b | 2,67 B , a |
| 25,00                                   | 1,62 B , a                                      | 0,00 B , b | 0,00 C , b | 0,00 C , b | 0,00 C , b |
| 50,00                                   | 1,19 C , a                                      | 0,00 B , b | 0,00 C , b | 0,00 C , b | 0,00 C , b |
| 75,00                                   | 0,67 D , a                                      | 0,00 B , b | 0,00 C , b | 0,00 C , b | 0,00 C , b |
| <b>C.V.(%)</b>                          | 4,55%   |            |            |            |            |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: (A) Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam semelhança estatística.

(a) Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam semelhança estatística.

Os valores seguidos de letras iguais são semelhantes estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

Ao analisar a TAB. 13, verifica-se ação bactericida, pela ausência, nas leituras de unidades formadoras de colônias, a partir da sexta hora, em 25 mg/ml.

Nas maiores diluições 1 mg/ml e 5 mg/ml, observaram-se as menores contagens bacterianas, nos tempos zero e seis horas. Porém na

décima segunda hora em diante, os valores de UFC aumentaram exponencialmente.

Para as frações 25, 50 e 75 mg/ml, exceto à zero hora, as contagens microbianas são ausentes, ou seja, a partir da sexta hora, para as concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, iguais ou superiores à 25 mg/ml, existe efeito biocida contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), obtendo-se a CBM.

A concentração inibitória mínima - CIM ficou estabelecida, a partir da sexta hora, entre as preparações de 5 mg/ml e 25 mg/ml, sem precisão específica de valor. Pois as contagens das unidades formadoras de colônias viáveis, para 5 mg/ml, aumentam exponencialmente e para 25 mg/ml, ocorre ação bactericida.

Em relação ao tempo, isoladamente, os dois momentos significativos são à zero e sexta horas. Na primeira existe sensibilidade da bactéria, nas maiores concentrações, 50 mg/ml e 75 mg/ml, sendo as diluições superiores estaticamente semelhantes. Na sexta hora, o único valor significativamente diferente foi verificado na concentração 1 mg/ml. Após a sexta hora para 1 mg/ml e 5 mg/ml, as contagens de colônias bacterianas aumentam exponencialmente.

Na TAB. 14, são demonstradas as equações da regressão relacionadas às concentrações do extrato aquoso de *S. adstringens* pelo tempo. Nessa tabela apresentam-se outros fatores relevantes, como os coeficientes de regressão, de determinação, de variação e as significâncias.

TABELA 14

Equações ajustadas pelas análises de regressão dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Pseudomonas aeruginosa* - UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica, Log (X+1), relacionando, a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de contato do micro-organismo em horas (h)

| Concentrações do extrato aquoso (mg/ml) | Equações ajustadas pelas regressões dos valores de colônias viáveis       | R <sup>2</sup> | C.V.(%) |
|---|---|----------------|---------|
| 1,00                                    | $Y = 1,88143 - 0,342267^{**}X + 0,0454645^{**}X^2 - 0,00114300^{**}X^3$   | 0,97           | 2,40    |
| 5,00                                    | $Y = 1,91833 - 0,585303^{**}X + 0,0566482^{**}X^2 - 0,00128933^{**}X^3$   | 0,99           | 5,69    |
| 25,00                                   | $Y = 1,59479 - 0,401265^{**}X + 0,0288911^{**}X^2 - 0,000624190^{**}X^3$  | 0,98           | 11,46   |
| 50,00                                   | $Y = 1,17715 - 0,296183^{*}X + 0,0213252^{**}X^2 - 0,000460729^{**}X^3$   | 0,98           | 5,88    |
| 75,00                                   | $Y = 0,664105 - 0,167096^{**}X + 0,0120309^{**}X^2 - 0,000259927^{**}X^3$ | 0,98           | 61,49   |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: Y = valor observado da variável dependente (unidades formadoras de colônias), no nível da variável independente X (tempo em horas).

O modelo das equações utilizadas segue o padrão linear de 3º grau. Dado por:

$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \beta_3 X^3$ , em que:  $\beta_0$  = constante da regressão;  $\beta_1$  = coeficiente da regressão;  $\beta_2$  = coeficiente da regressão do componente quadrático e  $\beta_3$  = coeficiente da regressão do componente cúbico.

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação.

C.V.% = Coeficiente de variação em porcentagem.

Para as equações, os coeficientes de regressão, seguidos de duplo asterisco ( $\beta_i^{**}X^i$ ) possuem significância a 1% e os acompanhados de um asterisco ( $\beta_i^{*}X^i$ ) possuem significância a 5%. Os coeficientes de regressão, seguidos do termo, ns, ( $\beta_i^{ns}X^i$ ) não possuem significância no modelo.

O GRÁF. 4 mostra as curvas de inativação para *Pseudomonas aeruginosa*, obtidas das equações de regressão e construídas pela substituição dos logaritmos das contagens das colônias viáveis, na variável dependente e o tempo na variável independente.

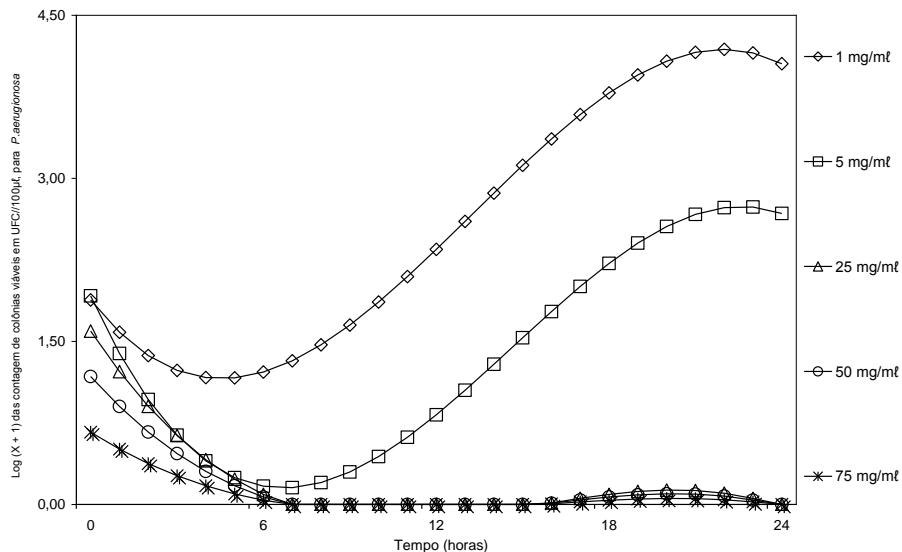


GRÁFICO 4 - Curvas das cinéticas de inativação, calculadas pelas equações resultantes das análises das regressões, dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Pseudomonas aeruginosa* - UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica,  $\text{Log}(X+1)$ , relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h) sobre o micro-organismo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

As curvas das cinéticas de inativação de *P. aeruginosa* (ATCC 9027) foram calculadas pela regressão dos dados, obtidos das contagens das colônias viáveis - UFC/100µl da bactéria Gram-negativa, após a ação e interação das decrescentes diluições do extrato aquoso vegetal, frente os diversos tempos de exposição. Exceto o coeficiente de regressão linear, da equação referente à fração de 50 mg/ml, os demais apresentaram nível de significância de 1% (TAB. 22), consolidando a interação significativa entre a contagem das unidades formadoras de colônia (Y) e a variável independente, o tempo em horas (X) (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

As curvas de inativação estão apresentadas no GRÁF. 4 e o modelo reitera os resultados de *P. aeruginosa* para a prova de sensibilidade em macrodiluição em tubos. Em zero hora, para as frações 1, 5 e 25 mg/ml houve paridade nas contagens das unidades formadoras de colônias viáveis, porém para as porções de 50 mg/ml e 75 mg/ml, o efeito inibidor do extrato de *S. adstringens* sobre o micro-organismo foi significativo, entre si e com as demais concentrações.

Na sexta hora encontram-se os aumentos mais acentuados, para todas as curvas de inibição do crescimento bacteriano, das apresentações testadas do extrato, nesse momento dois comportamentos distintos são desmembrados, entre as maiores diluições 1 mg/ml e 5 mg/ml e outro para as menores diluições 25, 50 e 75 mg/ml.

Para essas concentrações, após a redução verificada na sexta hora, as curvas retomam a ascendência, exponencial, até a vigésima quarta hora. As menores diluições, 25, 50 e 75 mg/ml, assumem ação bactericida na sexta hora, e a curva atinge a ordenada, sem contagem de colônias viáveis, essa condição permanece ao longo do período, até 24 horas.

Portanto 25 mg/ml, caracterizou-se como a menor concentração bactericida (CBM), e possivelmente no intervalo entre 5 mg/ml e 25 mg/ml, seria a região mais provável da concentração inibitória mínima - CIM.

Na TAB. 14 estão os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e de variação calculados, a partir da regressão, para inibição do organismo para *P. aeruginosa*. Todas as concentrações apresentam coeficientes de determinação, próximos à unidade, com ótimo ajuste da regressão e dispersão dos valores (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

A determinação da CIM e CBM, respectivamente entre 5 e 25 mg/ml; e 25 mg/ml, para *P. aeruginosa* frente ao extrato de *Stryphnodendron adstringens*, divergem de Lopes *et al.* (2003) e Lopes *et al.* (2005), porém demonstram que diferentes condições experimentais de extração, purificação e cepas de micro-organismos, podem influenciar nos resultados obtidos.

Lopes *et al.* (2003) e Lopes *et al.* (2005) determinaram ausência de atividade microbicida do extrato de *S. adstringens*, frente aos micro-

organismos Gram-negativos, com descrições semelhantes dessa pesquisa para *E. coli*, mesmo em condições extrativas diferenciadas. SCHUCH *et al.* (2008) e Schuch (2007) encontraram resultados análogos, para extratos hidroalcoólicos a 50% (p/v) de *Baccharis trimera*, *Eucalyptus* spp. e *Tagetes minuta*, nas quais verificaram a atividade antibacteriana para microorganismos Gram-positivos. Abaineh e Sintayehu (2001) obtiveram sucesso e determinaram a sensibilidade *in vitro*, de cepas padrão, de *P. aeruginosa*, frente *Persicaria senegalense* com CIM de 820 µg/ml.

Na TAB. 15, apresentam-se os halos médios de inibição, para *Pseudomonas aeruginosa* frente o extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, após 24 horas. A maior medida médias dos halos ocorreu em 75 mg/ml, correspondeu a 12,04 mm, sendo diferente significativamente das demais.

TABELA 15

Diâmetro médio dos halos de inibição, em milímetros (mm), do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), após incubação de 24 horas

| Microrganismo        | Concentrações do extrato aquoso de barbatimão |        |        |        |         |
|----------------------|---|--------|--------|--------|---------|
|                      | 1,00  | 5,00   | 25,00  | 50,00  | 75,00   |
| UFC/ml               | mg/ml   |        |        |        |         |
| <i>P. aeruginosa</i> | 5,00 b  | 6,07 b | 8,13 b | 7,43 b | 12,04 a |
| C.V.(%)              | 17,96%  |        |        |        |         |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: A análise estatística foi realizada no delineamento inteiramente casualizado – DIC. Foram realizadas cinco repetições, para as cinco concentrações (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml). As medições são os diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm).

O inóculo utilizado de *Pseudomonas aeruginosa* foi de  $1,00 \times 10^8$  a  $9,00 \times 10^8$  UFC/ml.

Os valores seguidos de letras iguais, na linha são similares estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

O menor diâmetro observado foi de 5,00 mm em 1 mg/ml mesmo com os halos de inibição em 5, 25 e 50 mg/ml ligeiramente superiores, houve similaridade estatística, entre estes valores, com o da menor



concentração testada. Desse modo, a espécie *P. aeruginosa* não apresentou sensibilidade para *Stryphnodendron adstringens* no teste do disco de difusão, para as concentrações 1, 5, 25 e 50 mg/ml do extrato aquoso. Entretanto, a maior concentração, 75 mg/ml indicou sensibilidade do patógeno.

Mesmo sem resultados idênticos aos obtidos na avaliação da sensibilidade por macrodiluição em tubos, o teste do disco difusão para *P. aeruginosa* (ATCC 9027) foi validado para a concentração de 75 mg/ml. Ao verificar-se a sensibilidade de *P. aeruginosa*, no teste do disco difusão, para uma das concentrações do extrato, correlacionada.

Provavelmente as frações de 25 mg/ml e 50 mg/ml, não sensibilizaram o patógeno Gram-negativo no teste difusivo, por causa da menor interação entre o extrato aquoso impregnado no papel filtro e o filme bacteriano presente na placa, antagônico aos testes de micro e macrodiluições, onde a interação total do organismo, com o meio de cultura e o agente medicamentoso é mais viável (NCCLS 2003a, 2003b, 2005).

Os resultados do método difusivo dessa pesquisa corroboraram com os estudos de Vasconcelos *et al.* (2004), pois somente em 75 mg/ml demonstraram algum efeito inibitório sobre *Pseudomonas aeruginosa*, sendo essa concentração superior à maior usada por aqueles pesquisadores, de 66 mg/ml, de partes e de plantas distintos, pois os mesmos usaram extrato salino das sementes de *S. obovatum*. Nesse modelo não se verificou ação antibacteriana para micro-organismos Gram-negativos.

Na TAB. 16 estão os resultados da sensibilidade, no teste difusivo com substâncias antibióticas sintéticas, para *Pseudomonas aeruginosa*. Avaliaram-se os diâmetros de inibição (mm), pelos halos, as médias e os desvios padrão, como preconizado pelas NCCLS (2003a, 2003b, 2005).

TABELA 16

Resultados do teste de disco difusão, em função dos diâmetros em milímetros (mm) dos halos de inibição, médias e desvios padrão obtidos pela verificação da sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) frente aos antimicrobianos (oxacilina 1µg, penicilina G 10µg, imipenem 10µg e ceftazidima 30µg)

| Patógeno             | Antimicrobianos |               |               |               |
|----------------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
|                      | OXA 1µg         | PEN-G 10 µg   | IPM 10 µg     | CAZ 30 µg     |
|                      | halo inibição   | halo inibição | Halo inibição | halo inibição |
| <i>P. aeruginosa</i> | 5,00            | 5,00          | 32,00         | 40,50         |
|                      | 5,00            | 5,00          | 31,40         | 39,55         |
|                      | 5,00            | 5,00          | 30,85         | 40,80         |
|                      | 5,00            | 5,00          | 29,20         | 40,20         |
|                      | 5,00            | 5,00          | 32,40         | 42,40         |
| <b>Médias</b>        | 5,00            | 5,00          | 31,17         | 40,69         |
| <b>Desvios ±</b>     | 0,00            | 0,00          | 1,25          | 1,06          |
| <b>Resultado*</b>    | RESISTENTE*     | RESISTENTE*   | SENSÍVEL*     | SENSÍVEL*     |

Fonte: NCCLS, 2003a, 2003b, 2005.

De acordo as NCCLS (2003a, 2003b, 2005) o antibiograma realizado para *Pseudomonas aeruginosa*, frente às substâncias antimicrobianas sintéticas convencionais, avaliaram a sensibilidade do micro-organismo. Os antibióticos imipenem e a ceftazidima demonstraram eficácia contra *P. aeruginosa*, a qual apresentou resistência à oxacilina e penicilina-G. Apesar de pertencer ao mesmo grupo, os beta-lactâmicos são moléculas que possuem modificações estruturais, capazes de torná-las pouco susceptíveis à hidrólise, pelas beta-lactmases microbianas (GALES *et al.*, 2002) Portanto a melhor atividade microbicida do imipenem e da ceftazidima, encontrada neste estudo, pode ser assim explicada.

### 5.2.5 *Candida albicans*

*Candida albicans* é o patógeno fúngico oportunista mais importante para o gado leiteiro. As fontes da contaminação são o solo, as plantas, a matéria orgânica em decomposição e as seringas, cânulas e preparações usadas para o tratamento da mastite (SANTOS; FONSECA, 2007; MURRAY *et al.*, 2006).

Infecções oportunistas causadas por *Candida* spp. nos animais possuem causas variadas, associadas ao declínio da imunidade, enfermidades, a administração prolongada de antibióticos e restrições nutricionais, situações que permitem o aumento exagerado do número de leveduras comensais, associado à disseminação do patógeno no hospedeiro (TORTORA *et al.*, 2005; ISHIDA *et al.*, 2006; MURRAY *et al.*, 2006; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

*Candida albicans* (ATCC 10231) demonstrou sensibilidade na macrodiluição em tubos e estabeleceram-se as concentrações inibitória e fungicida mínimas de 25 mg/ml e 50 mg/ml, respectivamente.

Na TAB. 17 apresentam-se as médias logarítmicas das contagens das unidades formadoras de colônias - UFC/100µl para *Candida albicans*, frente o extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), pelo tempo de contato.

As leituras das contagens de unidades formadoras de colônia – UFC/100µl, originais e transformados pela expressão – Log (X+1), para *Candida albicans* (ATCC 10231), são apresentados nos APÊNDICES I E J.

Nos APÊNDICES K, L e M estão demonstrados os valores médios das contagens de UFC viáveis em 100 µl, transformados pela equação Log (X+1), resultantes da análise individual da interação entre o micro-organismo *C. albicans*; frente aos tempos de exposição (0, 6, 12, 18 e 24 horas), mantida constante às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml).

Nos APÊNDICES N, O e P estão demonstrados os valores médios das contagens de UFC viáveis em 100 µl, transformados pela equação Log (X+1), resultantes da análise individual da interação entre *C. albicans*, frente

às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), mantido constante os distintos tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas).

Os valores observados nos APÊNDICES K, L, M, N, O e P, para *C. albicans*, estão compilados e são discutidos a partir da TAB. 17.

TABELA 17

Valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias, na alíquota de 100  $\mu$ l de *Candida albicans*, transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h)

| Concentração do extrato aquoso mg/ml | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |            |            |            |            |
|--------------------------------------|---|------------|------------|------------|------------|
|                                      | 0   | 6          | 12         | 18         | 24         |
|                                      | UFC   | UFC        | UFC        | UFC        | UFC        |
| 1,00                                 | 1,96 A , c                                      | 2,50 A , b | 3,82 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| 5,00                                 | 1,87 A , d                                      | 2,29 A , c | 3,04 B , b | 3,08 B , b | 3,31 B , a |
| 25,00                                | 1,88 A , b                                      | 1,91 B , b | 2,46 C , a | 2,55 C , a | 1,96 C , b |
| 50,00                                | 1,55 B , a                                      | 1,59 C , a | 1,36 D , a | 1,56 D , a | 0,00 D , b |
| 75,00                                | 1,75 AB,a                                       | 1,07 D , b | 1,29 D , b | 1,19 E , b | 0,00 D , c |
| C.V.(%)                              | 4,55%   |            |            |            |            |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: (A) Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam semelhança estatística.

(a) Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam semelhança estatística.

Os valores seguidos de letras iguais são semelhantes estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

A partir da sexta hora, para 1 mg/ml e 5 mg/ml, ocorre crescimento contínuo e significativo do número de unidades formadoras de colônias viáveis e os extratos não interferem na multiplicação da levedura (TAB. 17). Porém 1 mg/ml é significativamente superior a 5 mg/ml da décima segunda hora em diante. Na décima oitava e vigésima quarta horas, o número de

colônias viáveis, atinge o número máximo de UFC viáveis com efeito inibidor nulo.

Para 25 mg/ml do extrato de *Stryphnodendron adstringens*, não se verificaram variações bruscas de contagens de UFC viáveis. Mostram-se na TAB. 17, as maiores e significativas contagens de levedura, na décima segunda e décima oitava horas, após esse intervalo retorna-se a tendência de queda e estabilização das leituras.

Na concentração intermediária, 25 mg/ml, constatou-se a estabilização do crescimento do micro-organismo e nesta foi definida como a concentração inibitória mínima – CIM, para *C. albicans*.

As maiores concentrações do extrato de *Stryphnodendron adstringens* 50 e 75 mg/ml, apresentaram valores de UFC para *C. albicans* próximos, porém diferentes estatisticamente com maior ação biocida na menor diluição, exceto para o tempo zero. Na vigésima quarta hora, verificou-se o efeito fungicida, para essas soluções e assim, a concentração fungicida mínima – CFM- foi 50 mg/ml, as, após período inibitório entre zero e a décima oitava horas.

Entre a zero e sexta hora, observou-se o comportamento de elevação significativa das contagens microbianas frente às menores concentrações do extrato, 1 mg/ml e 5 mg/ml, e a queda nas contagens para a menor diluição 75 mg/ml. A vigésima quarta hora mostra os dados extremos do experimento, com a menor concentração revelando a maior contagem microbiana possível para o trabalho e as 50 e 75 mg/ml causando a destruição da levedura.

Na TAB. 18 está indicados o número de colônias viáveis da levedura valores e transformados em logaritmos, para as diferentes diluições do extrato aquoso de *S. adstringens*, avaliadas também quanto ao tempo de interação para *C. albicans*.

TABELA 18

Equações ajustadas pelas análises de regressão dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Candida albicans* - UFC/100  $\mu\text{l}$ , transformados pela expressão logarítmica,  $\text{Log}(X+1)$ , relacionando, a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função do tempo de contato do micro-organismo em horas (h)

| Concentrações do extrato aquoso (mg/ml) | Equações ajustadas pelas regressões dos valores de colônias viáveis      | R <sup>2</sup> | C.V.(%) |
|---|--|----------------|---------|
| 1,00                                    | $Y = 1,81908 + 0,198981^{**}X - 0,00440947^{**}X^2$                      | 0,94           | 1,43    |
| 5,00                                    | $Y = - 1,98244 + 0,0611350^{**}X$  | 0,90           | 2,36    |
| 25,00                                   | $Y = 1,86562 - 0,0491479^{*}X + 0,0133279^{**}X^2 - 0,000464302^{**}X^3$ | 0,98           | 3,04    |
| 50,00                                   | $Y = 1,59465 - 0,0995292^{*}X + 0,0153257^{**}X^2 - 0,000578192^{**}X^3$ | 0,94           | 6,90    |
| 75,00                                   | $Y = 1,74511 - 0,231302^{*}X + 0,0251164^{**}X^2 - 0,000771641^{**}X^3$  | 0,99           | 6,49    |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: Y = valor observado da variável dependente (unidades formadoras de colônias), no nível da variável independente X (tempo em horas).

O modelo das equações utilizadas segue o padrão linear de 3º grau. Dado por:

$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \beta_3 X^3$ , em que:  $\beta_0$  = constante da regressão;  $\beta_1$  = coeficiente da regressão;  $\beta_2$  = coeficiente da regressão do componente quadrático e  $\beta_3$  = coeficiente da regressão do componente cúbico.

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação.

C.V.% = Coeficiente de variação em porcentagem.

Para as equações, os coeficientes de regressão, seguidos de duplo asterisco ( $\beta_i^{**}X^i$ ) possuem significância a 1% e os acompanhados de um asterisco ( $\beta_i^{*}X^i$ ) possuem significância a 5%. Os coeficientes de regressão, seguidos do termo, ns, ( $\beta_i^{ns}X^i$ ) não possuem significância no modelo.

No GRÁF. 5 são demonstradas as curvas das cinéticas de inativação, calculadas pela regressão das UFC viáveis de *Candida albicans*, frente concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, com interação para tempos distintos.

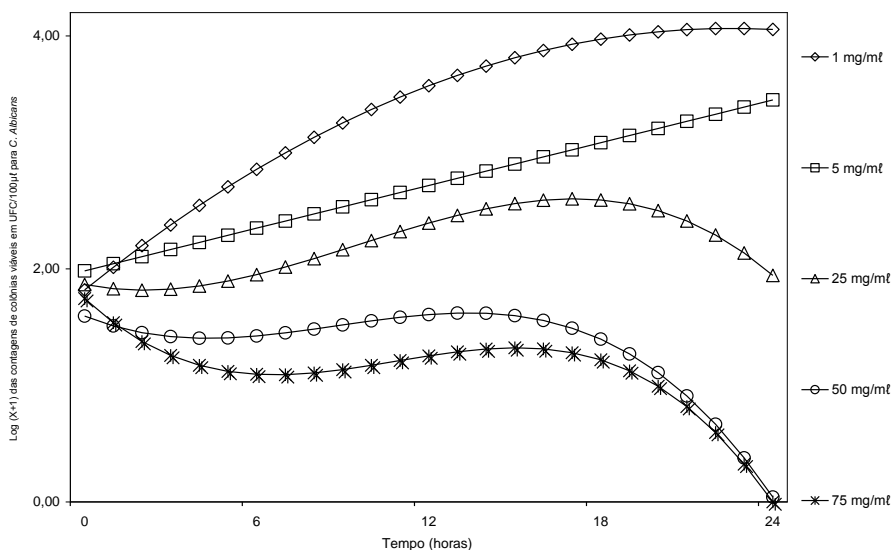


GRÁFICO 5 - Curvas das cinéticas de inativação, calculadas pelas equações resultantes das análises das regressões, dos valores médios das contagens das unidades formadoras de colônias de *Candida albicans* – UFC/100µl, transformados pela expressão logarítmica, Log (X+1), relacionando a ação das diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h) sobre o micro-organismo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

As curvas das cinéticas de inativação para *Candida albicans* (ATCC 10231) avaliadas pela regressão dos dados obtidos das contagens de UFC viáveis, após incubação, com frações do extrato aquoso vegetal, em intervalos de tempos.

A TAB. 18 mostra as equações obtidas pelo método regressivo para *Candida albicans* em modelos lineares de 1º, 2º e 3º grau e os coeficientes de regressão com nível de significância entre 1% e 5% (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

As cinéticas de inativação do GRÁF. 5 refletem os resultados de sensibilidade da macrodiluição no modelo do fatorial. À zero hora as leituras

das unidades formadoras de colônias de *C. albicans* viáveis são próximas e estatisticamente semelhantes. A partir da sexta hora define-se a tendência, para as curvas referentes às concentrações 1, 5, 25 e 75 mg/ml, sendo de aumento para as menos concentradas, estabilização para diluição intermediária e redução para mais concentrada. Na vigésima quarta hora confirmou-se a ação fungicida de 50 mg/ml e 75 mg/ml, com a determinação da CBM em 50 mg/ml; da CIM em 25 mg/ml e a maior contagem de unidades formadoras de colônias para 1 mg/ml.

Na TAB. 18 todas as equações apresentam valores de coeficientes de determinação, acima de 0,90, com coeficientes de variação entre 1,43% e 6,90% e demonstram ótima qualidade do ajuste das curvas, da equação da regressão e da dispersão dos valores.

Ishida *et al.* (2006) avaliaram os efeitos do extrato da casca de *Stryphnodendron adstringens*, sobre o crescimento e fatores de virulência da *Candida albicans*. O índice de inibição (CIM) encontrado sobre leveduras foi 0,97 à 7,80 µg/ml. Atribuíram-se aos taninos condensados o efeito antifúngico para *C. Albicans*, portanto verificou-se relação positiva a esse estudo, com a fração aquosa, pois os taninos foram confirmados nas análises fitoquímicas.

Entretanto os resultados diferem das investigações de Sanches *et al.* (2005) sobre os efeitos antifúngicos do extrato da casca de *S. obovatum*, frente a espécie *Candida albicans*. Nas frações etil-acetiladas e aquosas, as primeiras subfrações para coletas cromatográficas e os compostos isolados (flavon-3-ol; epigalocatequina e galocatequina) não causaram sensibilidade a levedura. Porém, as frações cromatográficas intermediárias e finais do extrato apresentaram CIM e CFM de 125 µg/ml e 250 µg/ml, respectivamente, indicadoras de ação antifúngica. Os menores valores de referência e concentrações em relação a este, para obtenção dos efeitos inibitórios e fungicidas, se deve a purificação e isolamento dos ativos.

A CFM obtida nessa pesquisa é superior à descrita por Sanches *et al.* (2005) por causa, possivelmente, da purificação e isolamento dos ativos empregados por aqueles pesquisadores. Na pesquisa de Sanches *et al.* (2005) os compostos isolados não geraram efeitos inibitórios e biocidas nas



leveduras, porém subfrações do extrato sensibilizaram o organismo, indicando que essas ações causadas pelo vegetal, na maioria dos casos, são associadas ou provocadas pela sinergia, potencialização e soma de ações dos vários metabólitos secundários, presentes na planta, ao atuarem por mecanismos distintos.

A TAB. 19 indica os halos de inibição, causados na amostra de *Candida albicans*, em contato com discos de papel impregnados com extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, em diluições diversas, na prova de difusão em ágar. Calculou-se a análise de variância, em delineamento inteiramente casualizado, com teste de médias Tukey a 1%.

TABELA 19

Diâmetro médio dos halos de inibição, em milímetros (mm), do crescimento de *Candida albicans* (ATCC 10231) frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), após incubação de 24 horas

| Microrganismo  | Concentrações do extrato aquoso de barbatimão |        |         |         |         |
|----------------|---|--------|---------|---------|---------|
|                | 1,00  | 5,00   | 25,00   | 50,00   | 75,00   |
| UFC/ml         | mg/ml   |        |         |         |         |
| <i>E. coli</i> | 5,00 b  | 5,98 b | 11,68 a | 12,24 a | 14,45 a |
| <b>C.V.(%)</b> | 21,01%  |        |         |         |         |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: A análise estatística foi realizada no delineamento inteiramente casualizado – DIC. Foram realizadas cinco repetições, para as cinco concentrações (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml). As medições são os diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm).

O inóculo utilizado de *Candida albicans* foi de  $1,00 \times 10^8$  a  $9,00 \times 10^8$  UFC/ml.

Os valores seguidos de letras iguais, na linha são similares estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

A TAB. 19 indica que a maior média 14,45 mm, dos diâmetros dos halos ocorreu em 75 mg/ml, e a menor correspondeu ao tamanho do papel filtro, 5,00 mm para a concentração de 1 mg/ml.

Os diâmetros dos halos de inibição, referentes a 25 mg/ml e 50 mg/ml, não diferiram estatisticamente da maior concentração testada de 75 mg/ml. Porém, 1 mg/ml e 5 mg/ml foram similares ( $p \geq 0,01$ ) com 5,00 mm e

5,98 mm, respectivamente. Assim, a levedura *C. albicans* (ATCC 10231) não apresentou sensibilidade ao extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* nas menores concentrações, entretanto mostrou-se suscetível frente a 25, 50 e 75 mg/ml da solução extrativa.

Desse modo, o teste do disco difusão para *C. albicans* (ATCC 10231) foi validado, nas três maiores concentrações 25, 50 e 75 mg/ml, pois se confirmaram os resultados encontrados na macrodiluição em tubos (NCCLS 2003a, 2003b, 2005).

O extrato aquoso de *S. adstringens* apresentou ação contra *Candida albicans*, para três das cinco concentrações testadas, 25, 50 e 75 mg/ml, com o maior halo de inibição, de valor médio de 14,45 mm, porém possíveis diferenças entre protocolos experimentais e/ou entre as espécies vegetais podem justificar os resultados divergentes. Para o método difusão em disco Vasconcelos *et al.* (2004) não observaram atividade antifúngica do extrato salino de sementes de *Stryphnodendron obovatum*. Utilizando outro modelo vegetal Abaineh e Sintayehu (2001) verificaram atividade inibitória fúngica *in vitro* para *Persicaria senegalense* frente *Candida albicans*.

Na TAB. 20 demonstram-se os diâmetros dos halos de inibição (mm) causados pelos antibióticos para *Candida albicans*, as médias e desvios padrão dos halos de inibição, os antimicrobianos aplicados e os resultados para o teste de sensibilidade, com base nas NCCLS (2003a, 2003b, 2005).

TABELA 20

Resultados do teste de disco difusão, em função dos diâmetros em milímetros (mm) dos halos de inibição, médias e desvios padrão obtidos pela verificação da sensibilidade de *Candida albicans* (ATCC 10231) frente aos antimicrobianos (oxacilina 1 µg, penicilina G 10 µg, imipenem 10 µg e ceftazidima 30 µg)

| Patógeno               | Antimicrobianos |               |               |               |
|------------------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
|                        | OXA 1 µg        | PEN-G 10 µg   | IPM 10 µg     | CAZ 30 µg     |
|                        | halo inibição   | halo inibição | halo inibição | halo inibição |
| <b>C.<br/>albicans</b> | 5,00            | 5,00          | 5,00          | 5,00          |
|                        | 5,00            | 5,00          | 5,00          | 5,00          |
|                        | 5,00            | 5,00          | 5,00          | 5,00          |
|                        | 5,00            | 5,00          | 5,00          | 5,00          |
|                        | 5,00            | 5,00          | 5,00          | 5,00          |
| <b>Médias</b>          | 5,00            | 5,00          | 5,00          | 5,00          |
| <b>Desvios ±</b>       | 0,00            | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
| <b>Resultado*</b>      | RESISTENTE*     | RESISTENTE*   | RESISTENTE*   | RESISTENTE*   |

Fonte: NCCLS, 2003a,2003b, 2005.

O antibiograma realizado para *Candida albicans*, frente os antibióticos sintéticos utilizados no tratamento das infecções intramamárias apresentou-se resistente para oxacilina 1 µg; penicilina-G 10 µg; Imipenem 10 µg e ceftazidima 30 µg, conforme esperado, pois nenhuma das substâncias microbicidas testadas possui atividade antifúngica (NCCLS, 2003a, 2003b, 2005; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Audi *et al.*, (2004); Santos *et al.*, (2002); Holetz *et al.*, (2005); Lopes *et al.* (2005); Sanches *et al.* (2005); SOUZA *et al.*, (2007a) e Santos e Mello (2007) relataram, que testes *in vitro*, com o extrato de plantas ricas em taninos, do gênero *Stryphnodendron* ssp. especialmente na espécie *Stryphnodendron adstringens* demonstraram variadas atividades

farmacológicas e biológicas, com destaque as ações bactericidas, fungicidas, antivirais, molusquicidas, inibidoras de enzimas extracelulares e intracelulares, a privações de substrato pelos micro-organismos, a interrupção do processo de obtenção de energia via ATP, em função da inativação da fosforilação oxidativa, privação de ferro, mudança na polaridade das superfícies celulares e inibição de processos peroxidativos e oxidativos.

Conjetura-se que todas as atividades, biológicas e farmacológicas, creditadas aos taninos, condensados e ou hidrolisáveis, estão relacionadas a três características químicas principais, a complexação com íons metálicos (ferro, cobre, manganês, magnésio e outros metais e importantes cofatores), a atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres, em função dos anéis aromáticos da estrutura polifenólica e a capacidade de complexar com outras estruturas químicas, principalmente as macromoléculas, como os polissacarídeos e as proteínas, dado a capacidade de ligação das hidroxilas fenólicas, formando pontes de hidrogênio e as interações hidrofóbicas dos núcleos aromáticos (SANTOS; MELLO, 2007)

Para todas as ações verificadas, sobre os micro-organismos nesse estudo, sejam os efeitos inibitórios, bactericidas e fungicidas, os mesmos podem ser creditados aos taninos, condensados e ou hidrolisáveis detectados e confirmados pela análise fitoquímica, conforme Santos e Mello (2007). Três são as hipóteses aceitas para o mecanismo antimicrobiano. O primeiro implicaria na inibição das enzimas de bactérias e fungos, bem como na complexação de substratos das enzimas; a segunda seria a atuação dos taninos sobre as membranas celulares dos micro-organismos e último a complexação com íons metálicos suprimindo a disponibilidade de elementos essenciais ao metabolismo celular.

### **5.3 Teste de sensibilidade de disco difusão em ágar, analisando a interação entre os micro-organismos frente às crescentes concentrações do extrato aquoso de *S. adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml)**

No teste da difusão em disco de papel é avaliada a sensibilidade do micro-organismo, na presença da substância que se deseja avaliar, em relação a propriedades bacteriostáticas e bactericidas. A ação de suscetibilidade ocorre pelo contato direto do papel impregnado com o princípio ativo, no meio de cultura ágar semeado com o patógeno. O teste em questão tem caráter qualitativo e somente é validado pela determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas - CIM e CBM, obtidas de testes de sensibilidade quantitativos, como a macro e microdiluições.

#### **5.3.1 Avaliações dos micro-organismos**

Nesse item abordou-se a interação entre os micro-organismos, frente às crescentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, condição que avaliou a sensibilidade do organismo em relação ao extrato, pelo tamanho do diâmetro do halo de inibição formado, sendo tanto mais sensível, quanto maior for à medição do círculo gerado. Os diâmetros médios, das cinco repetições realizadas, para cada patógenos e diluição estão demonstrados na TAB. 21.

A TAB. 21 indica a análise estatística realizada pelo modelo fatorial duplo, correlacionando os micro-organismos testes e a concentração do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), pelo delineamento inteiramente casualizado - DIC. Foram realizadas cinco repetições, para as cinco concentrações do extrato (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml). As medições aferidas são os diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm), e são apresentadas na tabelas as médias das cinco repetições (RIBEIRO JÚNIOR, 2001; SAEG, 2007).

TABELA 21

Diâmetro médio dos halos de inibição, em milímetros (mm), do crescimento de amostras de *Staphylococcus aureus*; de *Escherichia coli*, de *Streptococcus pyogenes*; de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Candida albicans* frente às concentrações crescentes do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), junto aos inóculo de  $1,00 \times 10^8$  a  $9,00 \times 10^8$  UFC/ml, em meio Müller Hinton, após incubação de 24 horas

| Teste de sensibilidade do disco difusão em ágar |   |            |            |            |           |
|---|---|------------|------------|------------|-----------|
| Patógenos                                       | Concentração do extrato aquoso de <i>S. adstringens</i> |            |            |            |           |
|   | 1,00  | 5,00       | 25,00      | 50,00      | 75,00     |
| mg/ml   |   |            |            |            |           |
| <b><i>S. aureus</i></b>                         | 5,00 A , b  | 6,24 AB,b  | 10,60 A,a  | 11,34 A,a  | 13,61 A,a |
| <b><i>E. coli</i></b>                           | 5,00 A , c  | 5,00 B , c | 9,09 A,ab  | 6,99 B,bc  | 12,24 A,a |
| <b><i>S. pyogenes</i></b>                       | 6,68 A , b  | 9,20 A,ab  | 9,60 A,ab  | 12,04 A,a  | 12,53 A,a |
| <b><i>P. aeruginosa</i></b>                     | 5,00 A , b  | 6,07 AB,b  | 8,13 A , b | 7,43 B , b | 12,04 A,a |
| <b><i>C. albicans</i></b>                       | 5,00 A , b  | 5,98 AB,b  | 11,68 A,a  | 12,24 A,a  | 14,45 A,a |
| <b>C.V.(%)</b>                                  | 20,01%  |            |            |            |           |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2011.

Notas: (A) Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam semelhança estatística. (a) Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam semelhança estatística.

Os valores seguidos de letras iguais são semelhantes estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

A interação para *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli* mostrou-se significativamente sensível em 75,00 mg/ml. Os patógenos, *S. aureus* e *Candida albicans* foram inibidos nas três maiores concentrações 25, 50 e 75 mg/ml, enquanto para *S. pyogenes* foi inibido em 50 mg/ml e 75 mg/ml. As CIM's, obtidas nos testes de macrodiluição em tubos, para *S. aureus*; *S. pyogenes* e *P. aeruginosa*, validam o teste de difusão em disco.

A maior sensibilidade para o teste do disco difusão, na macrodiluição para *E. coli* relaciona-se ao meio de cultura, o qual pode apresentar menor seletividade para a bactéria, além da menor disponibilidade dos nutrientes e uma indicação da proximidade da concentração inibitória mínima, visto que

na macrodiluição, os valores para 75,00 mg/ml tenderam a ser menores, porém não foram conclusivos (NCCLS, 2003a, 2003b, 2005).

### **5.3.2 Avaliações das concentrações**

Analisada as variações das médias dos diâmetros, de cada micro-organismo, para uma mesma concentração do extrato aquoso de *S. adstringens*, de forma geral, não ocorreram variações significativas ( $p \leq 0,01$ ). Observado aumento do halo, com aumento das concentrações do extrato, considera-se que esse aumento é proporcional, para todos agentes infectantes testados, no método do disco difusão.

As exceções a regra citada foram para as duas bactérias, representantes dos organismos Gram-negativos. Na concentração de 50 mg/ml, as espécies *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram leituras das médias dos halos inibitórios, de 6,99 mm e 7,43 mm, respectivamente. As medições na concentração foram semelhantes entre si, porém menores significativamente que os demais dados comparativos.

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados observados, e nas condições experimentais utilizadas neste trabalho podemos concluir que:

A turbólise possui capacidade extrativa e estabilizadora aos taninos condensados e hidrolisáveis, flavonoides e saponinas de *Stryphnodendron adstringens*.

O extrato aquoso de *S. adstringens* inibe a multiplicação de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* em curto período de tempo, portanto é considerado microbiostático.

As concentrações de 25 e 50 mg/ml do extrato aquoso de *S. adstringens*, respectivamente, foram microbicidas para *S. pyogenes* e *P. aeruginosa* e fungicida para *Candida albicans*.

O extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* não apresentou quaisquer efeitos antibacterianos, frente à espécie *Escherichia coli*.

Estudos adicionais *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para o emprego de *S. adstringens* frente aos patógenos causadores da mastite.



## REFERÊNCIAS

ABAINEH, D.; SINTAYEHU, A. Treatment of subclinical mastitis with the herb *Persicaria senegalense* (Polygonaceae). **Tropical Animal Health and Production**, Sebeta, v. 33, n. 6, p. 511-519, 2001.

ALMEIDA, R. Programas de qualidade do leite no mundo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. **Anais do I Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite, Curitiba, 08 a 11 de novembro de 1998**. Curitiba: UFRP/PR. p. 1 - 6.

ALVAREZ, C.; LABARCA, J.; SALLES, M. Estratégias de prevenção de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) na América Latina. **Brazilian Society of Infectious Diseases**, Salvador, v. 14, supl. 2, p. 107-108, dez. 2010

ALVES, D. S.; CALDEIRA JÚNIOR, C. F.; GUILHERME, D. O.; MARTINS, E. R. NETO, H. D.; PAULA, T. O. M.; SANTOS, A. M. Manejo e coleta de plantas medicinais silvestres. In: MARTINS, E. R.; GUIÃO, M. J. M. (Org.). **Capacitação de agricultores e extrativistas em boas práticas populares de produção, manejo e manipulação de plantas medicinais: uma experiência em rede**. Montes Claros, MG: UFMG/ICA, 2007. p. 73-93.

ALTIERI, M. **Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. Porto Alegre, RS: UFRGS, 2004. 117 p.

AMOROZO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. São Paulo, v. 16, n. 2, p. 189-203, 2002.

ARARIPE, F. Na 60ª Reunião anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) é feito apelo à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para adotar exemplo da Agência Nacional do Petróleo (ANP) e trabalhar com laboratórios das universidades no controle de fitoterápicos. **Jornal da Ciência**, Rio de Janeiro, 16 Jul. 2008. Disponível em: <<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detail.jsp?id=57353>>. Acesso em: 19 jun. 2010.

AUDI, E. A.; TOLEDO C. E. M.; SANTOS, F. S.; BELLANDA, P. R.; PRADO, W. A.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; SAKURAGUI, C. M.; BERSANI-AMADO, C. A.; MELLO J. C. P.; Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 23, n. 3, p. 328-33, abr. 2004.

AUDI, E. A.; TOLEDO, D. P.; PERES, P. G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W. K.; MELLO, J. C.; NAKAMURA, C.; PRADO, W. A.; CUMAN, R. K.; BERSANI-AMADO, C. A. Antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytotherapy Research**, Maringá, v. 13, n. 3, p. 264-266, 1999.

AVANCINI, C.; WIEST, J. M.; HAAS, J.S.; POSER, G. L.V.; DALL'AGNOL, R. Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, Porto Alegre, v. 27, n. 6, p. 894-899, Oct. 2008.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Etnomedicina veterinária, etnonosotaxia e etnoterapêutica de doenças de pele como referência para seleção e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.1, p.21-28, 2008.

AYYAPPA, M. P.; DHANABALAN, R.; DOSS, A. *In vitro* antibacterial activity of two medicinal plants against bovine udder isolated bacterial pathogens from dairy herds. **Ethnobotanical Leaflets**, Nadu, v. 13, p. 152-158, 2009.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal, SP: Funep, 2006. 237 p.

BASKARAN, S. A.; KAZMER, G. W.; HINCKLEY, L.; ANDREW, S. M.; VENKITANARANARAYANAN, K. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Storrs, v. 92, n. 4, p. 1423-1429, 2009.

BATISTA, F.; COSTA W. F.; SANTOS, S. C.; SANTOS L. R.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 552-556, dez. 2006.

BEEKHUIS-GIBBON. L.; WHYTE, P.; O'GRADY, L.; MORE, S. J.; DOHERTY, M. L. A HACCP-based approach to mastitis control in dairy herds. Part 1: Development. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 64, n. 1, p 2, 2011a.

BEEKHUIS-GIBBON, L.; DEVITT, C.; WHYTE, P. A; O'GRADY, L.; MORE, S. J.; REDMOND, B.; QUIN, S.; DOHERTY, M. L. HACCP-based approach to mastitis control in dairy herds. Part 2: Implementation and evaluation. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 64, n. 1, p. 7, 2011b.

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of brazilian cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, Goiânia, v. 73, n. 5, p. 428-430, 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Programa Nacional de Conservação da Biodiversidade. **A Convenção sobre a diversidade biológica**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2000. 30p. Cópia do Decreto Legislativo no. 2, de 5 de junho de 1992 Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/\\_arquivos/cdbport.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/cdbport.pdf)>. Acesso em: 19 jun. 2010.

BRASIL, Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Medida Provisória N° 2.186-16**, de 23 de agosto de 2001. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição, os arts. 1º, 8º, alínea "j", 10, alínea "c", 15 e 16, alíneas 3 e 4 da Convenção sobre Diversidade Biológica, dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. Brasília, DF: Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos, 2001. Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/mpv/2186-16.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/mpv/2186-16.htm)>. Acesso em: 20 jun.2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa N° 51**, de 18 de setembro de 2002. Aprova regulamento técnico para leite e seus Anexos III (Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo C), IV (Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado), V (Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite pasteurizado) e VI (Regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel). Brasília, DF: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2002. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov>>. Acesso em: 18 out. 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n° 13**, de 03 de outubro de 2003. Aprova o regulamento de boas práticas de fabricação de produtos de uso veterinário e o glossário, constantes dos Anexos I e II. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2003. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov>>. Acesso em: 20 jun.2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 48**, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos Fitoterápicos. Brasília, DF, 2004a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 23 ago.2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Decreto n° 5.053**, 22 de abril de 2004. Aprova o regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comerciem, e dá outras providências. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2004b. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov>>. Acesso em: 20 jun.2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução Específica (RE) nº 90**, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da "Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos". Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2004c. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 jun.2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução Específica (RE) nº 01**, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 jun.2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisa de plantas medicinais da central de medicamentos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006a. 148p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006b. 60p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006c. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 13 set. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de atenção básica, Secretaria de Atenção à Saúde. **Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006**. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006d. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa nº 05**, de 11 de dezembro de 2008. Determina a publicação da "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado". Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2008a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 95**, de 11 de dezembro de 2008. Regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2008b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF/SCTIE/MS). **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2008c. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2009.

BRASIL. Secretaria Municipal de Desenvolvimento Econômico, Turismo, Ciência e Tecnologia. Prefeitura de Montes Claros, MG. **Coletânea de informações sobre o município de Montes Claros. Montes Claros, MG, 2009**. Disponível em: <[www.montesclaros.mg.gov.br](http://www.montesclaros.mg.gov.br)>. Acesso em: 15 set. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 14** de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos Fitoterápicos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 19 jun. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 10** de 10 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 17** de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010c. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa n° 05**, de 31 de março de 2010. Fica estabelecida a “Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos”. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010d. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M.; VARGAS, O. L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio Janeiro, v. 18, n. 1, p. 39 - 44, mar. 1998.

BUAINAIN, A. M; SOUZA FILHO, H. M. **Agricultura familiar, agroecologia e desenvolvimento sustentável**: questões para debate. Brasília, DF: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 2006. 135 p.

BURAGOHAIN, J.; DUTTA, G. N. Evaluation of an externally applied herbal gel, AV/AMP/14, for the treatment of bovine subclinical mastitis. **Indian veterinary Journal**, Khanpara, v. 75, n. 1, p. 734-735. Aug. 1998.

BRITISH PHARMACOPEIA COMMISSION OFFICE. **A.test for sterility.test for microbial contamination**. London, Stationery Office on Behalf of The Medicines and Health Care Products Regulatory Agency..2007. Supplement (Appendix XVI A, B.)

CAC/RCP 1. **Recommended international code of practice - general principles of food hygiene**. 2003. Disponível em <[http://www.codexalimentarius.net/download/standards/23/cxp\\_001e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/23/cxp_001e.pdf)>. Acesso em 15 de out. 2010.:

CAC/RCP 57. **Code of hygienic practice for milk and milk products**. 2004. Disponível em: <[http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10087/cxp\\_057e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10087/cxp_057e.pdf)>. Acesso em: 15 de out. 2010.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; MACHADO NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **Revista T&C Amazônica**, Brasília, DF, v. 5, n. 11, p. 26-32, jun. 2007.

CASTELLANI, D.C.; CASTRO, D. M.; DIAS, J. E.; MARTINS, E. R. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 220 p.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas orientado para análise biológica: obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 47-76.

CONFESSOR, M. V. A.; MENDONÇA, L. E. T.; MOURÃO, J. S.; ALVES, R. R. N. Animals to health animals: ethnoveterinary practices in semiarid region, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, Campina Grande, v. 5, n. 37, p. 1-9, 26, nov. 2009.

CORBELLINI, C. N. Actualizacion en la patogenia y diagnostico de las mastitis. In: CONGRESO NACIONAL DE CALIDAD DE LECHE Y MASTITIS, 1996, Rio Cuarto. **Memórias apresentadas a Asociación Argentina de Lucha contra la Mastitis, en lo Congreso nacional de calidad de leche y mastitis**. Rio Quatro, 1996. p. 37-48.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNADI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1999. p. 422-434.

COSTA, E. O.; WATANABE, E. T. Tratamento de mastite. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu. **Anais do 3º Encontro de Pesquisadores em Mastites. 20 e 21 de agosto de 1999.** Botucatu: FMVZ – UNESP/SP, 1999. p. 87-101.

COSTA, G. M.; SILVA, N.; ROSA, C. A.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA, U. P. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p.1938 - 1942, out. 2008.

CURY, L. Plantas medicinais: da tradição à ciência. **Pharmacia Brasileira**, Brasília, DF: ESDEVA, Conselho Federal de Farmácia (CFF), 2010. p. 50. (Fitos).

DEBUF, Y. M. **The veterinary formulary**: handbook of medicines used in veterinary practice. London: The Pharmaceutical, 1991. p. 263-276.

DUBAL, Z. B.; AVASTHE, R. K.; HAQUE, N.; TOPPO, S.; MURUGKAR, H. V.; BARBUDDHE, S. B. Efficacy of medicinal plant extracts and antimicrobials on different serotypes of *Escherichia coli*. **Indian Journal of Animal Sciences**, Sikkim, v. 79, n. 1, p. 15-18, Jan. 2009.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. de. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, RS: UFRGS; Florianópolis, SC: UFSC, 2007. p. 107 - 122.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SMIÕES, C. M. O. Introdução a análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, RS: UFRGS, 2007. p. 229 - 245.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Genetics and animal health**. Rome: FAO, 2002. (Spotlight) Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/magazine/0212sp2.htm>> Acesso em: 23 out. 2009

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, RS: UFRGS; Florianópolis, SC: UFSC, 2007. p. 261 - 288.

FARMACOPEIA BRASILEIRA IV. Parte II. 4º Fascículo. **Barbatimão. Barbadetimani cortex. Monografia 176**, 4. ed. Atheneu, São Paulo, 2002.

FELFILI, J. M.; SILVA JUNIOR, M. C.; DIAS, B. J.; REZENDE, A. V. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado sensu stricto da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 1, abr. 1999.

FELIPE, A. M. M.; GALINA, K. J.; NOZAWA, C.; RINCÃO, V. P.; TOLEDO, C. E. M.; BENATI, F. J.; LOPES, G, C.; LINHARES, R. E. C.; MELLO, J. C. P. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. **Biological & Pharmaceutical Bulletin. Pharmaceutical Society of Japan**, Londrina, v. 29. n. 6, p. 1092-1095, 2006.

FERNANDES, M. C.; RIBEIRO, M. G.; SIQUEIRA, A. K.; SALERNO, T.; LARA, G. H. B., LISTONI, F. J. P. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 745 - 748, 2009.

FERREIRA, S. B.; PALMEIRA, J. D.; SOUZA, J. H.; ALMEIDA, J. M.; FIGUEIREDO, M. C. P.; PEQUENO, A. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R.; Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcolólico de *Stryphnodendron adstringens*(Mart) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus* / Evaluation of the antimicrobial activity *in vitro* of the hydroalcoholic extract *Stryphnodendron adstringens* against of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Campina Grande, v. 42. n. 1, p. 27-31, 2010.

GABBARDO, M. **Borras finas e manoproteínas na maturação de vinho tinto Cabernet Sauvignon**. 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia Agroindustrial) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2009.

GALES, A. C.; MENDES, R. E.; RODRIGUES, J.; SADER, H. S. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastatina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 13 - 20, 2002.

GATYAS, G.; SAVAGE, C. IMS forecasts global pharmaceutical market growth of 5-8% annually through 2014; maintains expectations of 4-6% growth in 2010. **IMS Health Incorporated**. Disponível em: <<http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth/menuitem.a46c6d4df3db4b3d88f611019418c22a/?vgnnextoid=4b8c410b6c718210VgnVCM100000ed152ca2RCRD&vgnnextchannel=b5e57900b55a5110VgnVCM10000071812ca2RCRD>> Acesso em: 18 jun. 2010.

GIACINTI, G.; ROSATI, R.; BOSELLI, C.; TAMMARO, A.; AMATISTE, S.; RONCHI, B. Control of bovine sub-clinical mastitis by using herbal extract during lactation. In: **ORGANIC WORLD CONGRESS**, 16, 2008, Modena..**Proceedings**. Modena: International Society of Organic Agriculture Research: 2008.4 p. Disponível em: <<http://orgprints.org/12239/>> Acesso em: 23 out 2009.



GIDAY, M.; ASFAW, Z.; WOLDU, Z.; TEKLEHAYMANOT, T. Medicinal plant knowledge of the Bench ethnic group of Ethiopia: an ethnobotanical investigation. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, Addis Ababa, v. 5, n. 34, p. 1 - 10, nov. 2009.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. 2. ed. Porto Alegre, RS: UFRGS, 2001. 654 p.

HÄNSEL, R.; TYLER, V. E.; SCHULZ, V; **Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. Barueri, SP: Manole, 2002. 386 p.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**. Sheffield, v. 59, n. 2, p. 205 - 215, 1996.

HERZOG-SOARES, J. D.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERRA, J. C. B.; GOMES, M. H. SANTOS. S. C.; FERRI, P. H. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Goiânia, v. 12, suplemento, p. 1 - 2, 2002.

HEYMAN, H. M.; HUSSEIN, A. A.; MEYER, J. J. M.; LALL, N.. Antibacterial activity of South African medicinal plants methicilin resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutical Biology**, Pretoria, v. 47, n.1, p. 67 – 71, 2009.

HOEFEL, H. H. K.; LAUTERT, L. Administração endovenosa de antibióticos e resistência bacteriana: Responsabilidade da enfermagem. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, Goiás, v. 8, n. 3, p. 441 - 449, 2006. Disponível em: <[http://www.fen.ufg.br/revista/revista8\\_3/v8n3a15.htm](http://www.fen.ufg.br/revista/revista8_3/v8n3a15.htm)>. Acessado em: 11 de novembro de 2011.

HOLETZ, F. B.; NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P.; DIAZ, J. A. M.; TOLEDO, C. E. M.; NAKAMURA, C. V. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpeessoai*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, p. 397 - 401, 2005

ISHIDA, K.; ROZENTAL, S.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA C. V. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 29, 2009.

ISHIDA, K.; MELLO, J. C. P.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C, V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Maringá, v. 58, n. 5, p. 942-949, 2006.

KALLIO, H.; PALLASAHO, S.; KÄRPPÄ, J.; LINKO, R. R. Comparison of the Half-Lives of the Anthocyanins in the Juice of Crowberry, *Empetrum nigrum*. **Journal of Food Science**, Beginning, v. 51, n. 2, p. 408 – 410. 1986.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M. T. R. L.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al* (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, Porto Alegre, RS: UFRGS, 2007. p. 247-262.

LESLIE, K. E. New concepts on bovine mastitis control. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 23., 2004, Québec, **Proceedings of the WBC Congress**. Québec: World Association for Buiatrics. 2004. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2004/WBC2004-Leslie-simple.pdf>> Acesso em: 11 de novembro de 2011.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.; CALIXTO, J B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 481-501.

LIMA, J. B. A.; SKARE, T. L.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J. M.; MICHAELIS, T.; MARCONDES, F.; MACEDO, R. A. C. Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos induzida por sepse: estudo experimental em ratos. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 95 – 102, jun. 2011.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SOUZA JÚNIOR, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. **Phytotherapy Research**, Cuiabá, v. 12, n. 3, p. 218-220, 1998.

LOGUERCIO, A. P.; GOFF, A. C. M.; PEDROZZO, A. F.; WITT, N. M. SILVA, M. S.; VARGAS, A. C. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41. n. 2, p. 347 - 349, fev. 2006.

LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P.; Estudo físico-químico, químico e biológico de extrato das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Maringá, v. 13, supl. 2. p. 24 - 27, 2003.

LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; HERNANDES, L.; MELLO, J. C. P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Maringá, v. 99, n. 2, p.265-272, 2005.

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Maringá, v. 41, n. 1, p. 85 - 94, 2005.

MADAN, P.; PANDEY, S.K.; CHHABRA, M.B.; SAXENA, M.J. Efficacy of a topical herbal gel for mastitis control. **Indian Journal of Animal Sciences**, Sahibabad, v. 11, n. 1, p. 289 – 291, 1996.

MACEDO, F. M.; MARTINS, G. T.; OLIVEIRA, D. A.; RODRIGUES, C, G. Triagem fitoquímica do barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1166 - 1168, 2007.

MACHADO NETTO, E.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; BALBINO, E. E.; CARVALHO, A. C. B. Pesquisa, desenvolvimento e inovação em fitoterápicos. **Revista Fitos**, Brasília, DF, v. 1, n. 3, p. 09-17, mar. 2006.

MARTINEZ, J. E. Princípio da rotação de desinfetantes: verdadeiro ou falso. **Pharmaceutical Technology**, Caguas, v. 13, n. 3, p. 32 -56, 2009.

MEDEIROS, E, S.; MOTA, R. A.; SANTOS, M. V.; FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; TELES J. A. A. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 569 - 574, jul. 2009.

MELLO, J. C. P. Taninos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville - (Mimosaceae) – barbatimão. **Caderno de Farmácia**, Maringá, v. 13, n. 2, p. 105 - 109, 1997.

MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, New York, v. 41, n. 3, p. 807 - 813, 1996a.

MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, New York. v. 51, n. 8, p. 1105 - 1107, Aug. 1999.

MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, New York. V. 42, n. 3, p. 857 - 862, Jun. 1996b.

MIRIAGOU, V.; TZELEPI, E.; GIANNELI, D.; TZOUVELEKIS, L. S. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo- $\beta$ -lactamase VIM-1. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 47, n. 1, p. 395 – 397, Jan. 2003.

MOLINA, D. ANVISA atualiza regulamentação de medicamentos fitoterápicos. **Pharmacia Brasileira**, Brasília, DF, p. 49, abr, 2010. Disponível em: <[http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/125/049a050\\_fitoterApicos.pdf](http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/125/049a050_fitoterApicos.pdf)> Acesso em: .23 de out 2009.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.5, p.892-896, out. 2005.

MÜLLER, E. E. Profilaxia e controle da mastite. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu. **Anais do 3º Encontro de Pesquisadores em Mastites. 20 e 21 de agosto de 1999**. Botucatu: FMVZ – UNESP/SP, 1999. p. 57 - 61.

MUKHERJEE, R. Antibacterial and therapeutic potential of *Ocimum Sanctum* in bovine sub clinical mastitis. **Indian Veterinary Journal**. Izatanagar, v. 83, n. 1. p. 189 - 197. 2009.

MUKHERJEE, R. Expression of cytokines and respiratory burst activity of milk in response to *Azadirachta indica* during bovine mastitis. **Tropical Animal Health and Production**. Izainágar, v. 41, n. 1. p. 522 - 524. 2006.

MUKHERJEE, R.; DASH, P. K.; RAM, G. C. Immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* (L) in bovine subclinical mastitis. **Research in Veterinary Science**, Izatnágár, v. 79, n. 1, p. 37 – 43, 2005.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A.; R. Micoses oportunistas. In: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S; MICHAEL, A. P. **Microbiologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 980 p.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6. ed. Wayne, PA: NCCLS, 2003a. (NCCLS document M7-A6) Substituí a Norma M7-A5. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas\\_publicacoes\\_bac\\_cresc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_publicacoes_bac_cresc.pdf)>. Acesso em: 23 out. 2009.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard**. 8. ed. Wayne, PA: NCCLS, 2003b. (NCCLS document M2-A8) Substituí a norma M2-A7. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas\\_public\\_disco\\_difusao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_disco_difusao.pdf)>. Acesso em: 23 out. 2009.

NCCLS. Clinical and Laboratory Standards Institute **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement**. Wayne, PA.; NCCLS 2005. (CLSI/NCCLS document M100-S15) Substitui a Norma M100-S14, Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas\\_public\\_teste\\_sensibilidade.pdf](http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_teste_sensibilidade.pdf)>. Acesso em: 23 out. 2009.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, RS: UFRGS; Florianópolis, SC: UFSC, 2007. p. 29 - 43.

NUNNENKAMP, T. **E quanto aos fitoterápicos?** Porto Alegre: Associação dos Laboratórios Farmacêuticos Nacionais (ALANAC), 19 set. 2007. Entrevista concedida à Associação dos Laboratórios Farmacêuticos Nacionais (ALANAC). Disponível em: <<http://www.alanac.org.br/imp.asp?id=4&tb=4>>. Acesso em: 13 set. 2009.

OLIVEIRA, A. L. S.; FIGUEIREDO, A. D. L. Prospecção fitoquímica das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 384 - 386, 2007.

OLIVEIRA, I. S.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. Triagem da atividade antibacteriana *in vitro* do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 4, p. 587 - 593, dez. 2008.

OMS. Organización Mundial de la Salud. **Estratégia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Genebra: OMS, 2002. Disponível em: <<http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/op000023.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2009.

OMS. Organização Mundial da Saúde; UNICEF. **Cuidados primários de saúde**: Brasília, DF: Ministério da Saúde, 1979. Relatório da conferência internacional sobre cuidados primários da saúde, Alma-Ata, URSS, 6 a 12 de setembro de 1978. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/coletiva/uploadArq/Alma-Ata.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2009.

PENNA, T. C. V.; MACHOSVILI, I. A. Esterilização térmica. conceitos básicos da cinética de morte microbiana. **Revista de Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.1, supl.1, p.1 - 5, 1997.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Campinas, SP: Milkbizz do Brasil, 2002. 191 p.

PINTO, M. S. **Efeito antimicrobiano de própolis verde do estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite.** 2000. 92 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** São Paulo, v. 38, n. 6, 2001.

PRADHAN, N. R. Utility of herbal topical gel in mastitis control and udder health improvement. **Indian Veterinary Journal.** Izatanagar v. 76, n. 1, p. 546 - 548. Jun. 1999.

PYÖRÄLÄ, S. Antimicrobial treatment of mastitis: choice of the route of administration and efficacy. In: BRITISH MASTITIS CONFERENCE, 2002, **Proceedings.** Brockworth: Institute for Animal Health/Milk Development Council, 2002. p. 20-29.

QUINN, P.J; MARKEY, B. K; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J. C; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Porto Alegre, RS: ARTMED, 2005. p. 451-460.

RAHMAN, H.; SHARMA, K. Efficacy of mastilep as supportive therapy for clinical mastitis in cows. **Indian Veterinary Journal.** Izatanagar, v. 77, n. 1, p. 50 - 52. Jan. 2000.

REBHUN, W. C.; GUARD, C.; RICHARDS, C. M. **Doenças do gado leiteiro.** São Paulo, SP: Rocca, 2000. p. 339 - 377.

REIS, S. R.; SILVA, N.; BRESCIA, M. V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v. 55, n. 6, p. 651 – 658, 2003.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análises estatísticas no SAEG.** Viçosa: UFV, 2001. 301 p.

RODOSTIST, O. M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos.** 9. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2002. p. 541-629.

SAEG. **Sistema para Análises Estatísticas, versão 9.1.** Viçosa: Fundação Arthur Bernardes,UFV, 2007.

SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** São Paulo, v. 41, n. 1, mar. 2005.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri, SP: Manole, 2007. 314 p.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, RS: UFRGS; Florianópolis, SC: UFSC, 2007. p. 615 - 656.

SANTOS, S. C.; COSTA, W. F.; RIBEIRO, J. P.; GUIMARÃES, D. O.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D; SERAPHINC, J. C. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, n. 4, p. 292 – 299, 2002.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, RS: UFRGS; Florianópolis, SC: UFSC, 2007. p. 403 - 466.

SCHAECHTER, M. Biologia dos agentes infecciosos. In: EISENSTEIN, B. I.; ENGLEBERG, N. C.; MEDOFF, G.; SCHAECHTER, M (Org.). **Microbiologia: mecanismos de doenças infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2002. p. 16 - 34.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, RS: UFRGS; Florianópolis, SC: UFSC, 2007. p. 711-740.

SCHMIDT, F. B.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Efeito da sazonalidade sobre o potencial antibacteriano de extratos etanólicos de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n. 2, p.1 - 5, 2008.

SCHUCH, L. F. D. **Plantas medicinais em atenção primária veterinária: atividade antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e a dermatófitos**. 2007. 205 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SCHUCH, L. F. D.; WIEST, J. M.; COIMBRA, H. S.; PRESTES, L. S.; TONI, L.; LEMOS, J. S. Cinética da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos naturais frente a *micro-organismos* relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, Pelotas, v. 9, n. 1, p. 161 - 169, 2008.

SEVILLA-GUZMAN, E. Uma estratégia de sustentabilidade a partir da agroecologia. **Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 2, p. 35 - 45. 2001.

SILVA, F. M.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian cerrado medicinal plants. **Mycoses**, Brasília, DF, v. 52, p. 511 - 517, 2009.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 1, p.5 - 19, abr. 1999.

SILVA, N. Diagnóstico de mamite em animais de importância econômica. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu. **Anais do 3º Encontro de Pesquisadores em Mastites. 20 e 21 de agosto de 1999**. Botucatu: FMVZ – UNESP/SP, 1999. p. 51 - 55.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M.; TEREZI, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 844 - 855, 2006.

SOARES, S. P.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C. SILVA, M, L, A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. M. Antibacterial activity of the crude hydroalcoholic extract of *Stryphnodendron adstringens* on dental caries microorganisms. *Journal of Dental Science*, Franca, v. 23, n. 2, p. 141-144, 2008.

SOFIATI, F. T. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de *Polygonum acre* (Polygonaceae) H.B.K. e *Synadenium carinatum* (Euphorbiaceae) Boiss.** 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2009.

SOLUTIONS BIOMED, LLC. Brian G. Larson; Daryl J.Tichy. **Desinfetantes e esterilizantes aquosos**. PI.0608399-4A2, 24 fev. 2006. Publicação: 29 Dez. 2009. PCT.US.2006006434. 24 fev.2006. WO 006/093792. 08 set. 2006.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. D. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, RS: UFRGS; Florianópolis, SC: UFSC, 2007. p. 289-326.

SOUZA, A. A.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, ervasanta), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 3, p.23 - 29, jan. 2007.



SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade antisséptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Araraquara, v. 17, n. 1, p. 71 - 75, 2007a.

SOUZA, T. M.; SEVERI, J. A.; SILVA, V. Y. A.; SANTOS, E.; PIETRO, R. C. L. R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) (Coville, Leguminosae-Mimosoidae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, Araraquara, v. 28, n. 2, p.221 - 226, dez. 2007b.

SYNGENTA PARTICIPATIONS AG. Christian Schlatter; Ravi Ramachandran. **Composições fúngicas aquosas para tratamento de sementes**. PI.0520185-3A2. 25 abr. 2005. Publicação: 22 abr. 2009. PCT IB2005003283. 25 abr. 2005. WO. 2006/035316. 06 abr. 2006.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, p. 281 - 301, jun. 2000.

TOMLINSON, T. R.; AKERELE, O. **Medicinal plants: their role in health and biodiversity**. Philadelphia: University of Pennsylvania Press, 1998. 217p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. I R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre, RS: ARTMED, 2005. 894 p.

TOYANG, N. J.; WANYAMA, J.; NUWANYAKPA, M.; DJANGO, S.; **Ethnoveterinary medicine: a practical approach to the treatment of cattle diseases in sub-Saharan Africa**. 2 ed. Roosendaal, Netherlands: Agromisa Foundation and CTA, 2007. 88 p.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. **The United States pharmacopeial convention: microbiological tests**, Waschington, DC, v.3, p. 67, 2009. (USP-32. NF 27 the national formulary.)

VASCONCELOS, M. C. A.; RODOVALHO, N. C. M.; POTT, A.; POTT, V. J.; FERREIRA, A. M. T.; ARRUDA, A. L. A.; MAQUES, M. C. S.; CASTILHO, R. O.; BUENO, N. R. Avaliação de atividades biológicas das sementes de *Stryphnodendron obovatum* Benth. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 14, n. 1, p. 121 – 127, maio. 2004.

VERMA, A. K., NAURIYAL, D. S. Therapeutic potential of a topical herbal gel against bovine subclinical mastitis. **Indian Journal of Animal Sciences**, Gujarat, v. 79, n. 3, p. 275 - 277, Mar. 2009.

VINAUD, M. C.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. B. Avaliação da atividade larvicida de plantas fitoterápicas do cerrado do gênero *Stryphnodendron* spp. sobre miracídios e cercárias de *Schistosoma mansoni*. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 2, p. 137-143, 2005.

WALLER, K.; BERNES, G.; THAMSBORG, S. M.; SUKURA, A.; RICHTER, S. H.; INGEBRIGTSEN, P. J.; HÖGLUND, J. Plants as de-worming agents of livestock in the nordic countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future, **Acta Veterinaria Scandinavica**, Uppsala, Sweden, v. 42, n. 1, p. 31 - 44, 2001.

WANZALA, W.; ZESSIN, K. H.; KYULE, N. M.; BAUMANN, M. P. O.; MATHIAS, E.; HASSANALI, A. Ethnoveterinary medicine: a critical review of its evolution, perception, understanding and the way forward **Livestock Research for Rural Development**, Cali, v. 17, n. 11, p. 2, 2005.

WOOLEY, R. E.; SPEARS, K. R.; BROWN, J.; NOLAN, L. K.; FLETCHER, O. J. Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, Arizona, v. 36, n. 3, p. 679 - 684, Sept. 1992.

XAVIER, M. T. R.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R.; COSTA, J. P. R.; MORAIS, G.; TEIXEIRA, L. M. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Stryphnodendron adstringens* frente a *micro-organismos* isolados de mastite ovina, norte de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 4., 2008, João Pessoa. **Anais**. João Pessoa: UFPB/ABZ, 2008. 5 p. Disponível em: <<http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anais-zootec/artigos-cientificos/sistemas-producao-agronegocio/4359-Avaliao-atividade-antimicrobiana-vitro-extrato-Stryphnodendron-adstringens-frente-microorganismos-isolados-mastite-ovina-norte-Minas-Gerais.html>> Acesso em: 15 de out. 2010

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA J. V.; RESENDE, F. D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 577 - 585, 2007.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, RS: UFRGS; Florianópolis, SC: UFSC, 2007. p. 577 - 615.

# APÊNDICES

## APÊNDICE A

Resultado da leitura das contagens das unidades formadoras de colônias – UFC/100µl de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), nos diferentes tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas), frente às distintas concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml)

| Concentrações do extrato aquoso (mg/ml) | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |     |      |       |       |
|---|---|-----|------|-------|-------|
|   | 0   | 6   | 12   | 18    | 24    |
|   | UFC   | UFC | UFC  | UFC   | UFC   |
| <b>1,00</b>                             | 191   | 137 | 3430 | 10000 | 10000 |
|   | 182   | 152 | 3220 | 10000 | 10000 |
|   | 201   | 163 | 3500 | 10000 | 10000 |
| <b>5,00</b>                             | 132   | 17  | 188  | 10000 | 10000 |
|   | 116   | 24  | 193  | 10000 | 10000 |
|   | 152   | 18  | 194  | 10000 | 10000 |
| <b>25,00</b>                            | 62  | 9   | 32   | 520   | 10000 |
|   | 60  | 10  | 37   | 714   | 10000 |
|   | 64  | 14  | 54   | 590   | 10000 |
| <b>50,00</b>                            | 32  | 4   | 1    | 726   | 479   |
|   | 24  | 3   | 3    | 744   | 472   |
|   | 36  | 4   | 0    | 739   | 450   |
| <b>75,00</b>                            | 13  | 1   | 1    | 89    | 8     |
|   | 10  | 2   | 0    | 116   | 2     |
|   | 14  | 0   | 0    | 104   | 14    |

## APÊNDICE B

Resultados, médias e desvios padrão das leituras das contagens das unidades formadoras de colônias – UFC/100µl de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), transformadas pela equação Log (X+1), nos diferentes tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas), frente às distintas concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml)

| Concentrações do extrato aquoso (mg/ml) | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |      |      |      |      |
|---|---|------|------|------|------|
|   | 0   | 6    | 12   | 18   | 24   |
|   | UFC   | UFC  | UFC  | UFC  | UFC  |
| <b>1,00</b>                             | 2,28  | 2,14 | 3,54 | 4,00 | 4,00 |
|   | 2,26  | 2,18 | 3,51 | 4,00 | 4,00 |
|   | 2,31  | 2,21 | 3,54 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Média</b>                            | 2,28  | 2,18 | 3,53 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Desvio</b>                           | 0,02  | 0,04 | 0,02 | 0,00 | 0,00 |
| <b>5,00</b>                             | 2,12  | 1,26 | 2,28 | 4,00 | 4,00 |
|   | 2,07  | 1,40 | 2,29 | 4,00 | 4,00 |
|   | 2,18  | 1,28 | 2,29 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Média</b>                            | 2,13  | 1,31 | 2,28 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Desvio</b>                           | 0,06  | 0,08 | 0,01 | 0,00 | 0,00 |
| <b>25,00</b>                            | 1,80  | 1,00 | 1,52 | 2,72 | 4,00 |
|   | 1,79  | 1,04 | 1,58 | 2,85 | 4,00 |
|   | 1,81  | 1,18 | 1,74 | 2,77 | 4,00 |
| <b>Média</b>                            | 1,80  | 1,07 | 1,61 | 2,78 | 4,00 |
| <b>Desvio</b>                           | 0,01  | 0,09 | 0,11 | 0,07 | 0,00 |
| <b>50,00</b>                            | 1,52  | 0,70 | 0,30 | 2,86 | 2,68 |
|   | 1,40  | 0,60 | 0,60 | 2,87 | 2,67 |
|   | 1,57  | 0,70 | 0,00 | 2,87 | 2,65 |
| <b>Média</b>                            | 1,49  | 0,67 | 0,30 | 2,87 | 2,67 |
| <b>Desvio</b>                           | 0,09  | 0,06 | 0,30 | 0,01 | 0,01 |
| <b>75,00</b>                            | 1,15  | 0,30 | 0,30 | 1,95 | 0,95 |
|   | 1,04  | 0,48 | 0,00 | 2,07 | 0,48 |
|   | 1,18  | 0,00 | 0,00 | 2,02 | 1,18 |
| <b>Média</b>                            | 1,12  | 0,26 | 0,10 | 2,01 | 0,87 |
| <b>Desvio</b>                           | 0,07  | 0,24 | 0,17 | 0,06 | 0,36 |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

## APÊNDICE C

Resultado da leitura das contagens das unidades formadoras de colônias – UFC/100 $\mu$ l de *Escherichia coli* (ATCC 8739), nos diferentes tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas), frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml)

| Concentrações do extrato aquoso mg/ml | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |       |       |       |       |
|---------------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|
|                                       | 0   | 6     | 12    | 18    | 24    |
|                                       | UFC   | UFC   | UFC   | UFC   | UFC   |
| <b>1,00</b>                           | 234   | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 |
|                                       | 286   | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 |
|                                       | 242   | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 |
| <b>5,00</b>                           | 23  | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 |
|                                       | 26  | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 |
|                                       | 26  | 10000 | 10000 | 10000 | 10000 |
| <b>25,00</b>                          | 43  | 39    | 10000 | 10000 | 10000 |
|                                       | 60  | 40    | 10000 | 10000 | 10000 |
|                                       | 32  | 56    | 10000 | 10000 | 10000 |
| <b>50,00</b>                          | 26  | 25    | 10000 | 10000 | 740   |
|                                       | 14  | 38    | 10000 | 10000 | 678   |
|                                       | 36  | 26    | 10000 | 10000 | 710   |
| <b>75,00</b>                          | 5   | 2     | 3465  | 2352  | 960   |
|                                       | 6   | 0     | 4914  | 2576  | 1360  |
|                                       | 4   | 1     | 3654  | 2184  | 1560  |

---

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

## APÊNDICE D

Resultados, médias e desvios padrão das leituras das contagens das unidades formadoras de colônias – UFC/100µl de *Escherichia coli* (ATCC 8739), transformadas pela equação Log (X+1), nos diferentes tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas), frente às distintas concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml)

| Concentrações do extrato aquoso mg/ml | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |      |      |      |      |
|---------------------------------------|---|------|------|------|------|
|                                       | 0   | 6    | 12   | 18   | 24   |
|                                       | UFC   | UFC  | UFC  | UFC  | UFC  |
| <b>1,00</b>                           | 2,37  | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
|                                       | 2,46  | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
|                                       | 2,39  | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Média</b>                          | 2,40  | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,05  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>5,00</b>                           | 1,38  | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
|                                       | 1,43  | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
|                                       | 1,43  | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Média</b>                          | 1,41  | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,03  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>25,00</b>                          | 1,64  | 1,60 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
|                                       | 1,79  | 1,61 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
|                                       | 1,52  | 1,76 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Média</b>                          | 1,65  | 1,66 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,13  | 0,09 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>50,00</b>                          | 1,43  | 1,41 | 4,00 | 4,00 | 2,87 |
|                                       | 1,18  | 1,59 | 4,00 | 4,00 | 2,83 |
|                                       | 1,57  | 1,43 | 4,00 | 4,00 | 2,85 |
| <b>Média</b>                          | 1,39  | 1,48 | 4,00 | 4,00 | 2,85 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,20  | 0,10 | 0,00 | 0,00 | 0,02 |
| <b>75,00</b>                          | 0,78  | 0,48 | 3,54 | 3,37 | 2,98 |
|                                       | 0,85  | 0,00 | 3,69 | 3,41 | 3,13 |
|                                       | 0,70  | 0,30 | 3,56 | 3,34 | 3,19 |
| <b>Média</b>                          | 0,77  | 0,26 | 3,60 | 3,37 | 3,10 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,07  | 0,24 | 0,08 | 0,04 | 0,11 |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

## APÊNDICE E

Resultado da leitura das contagens das unidades formadoras de colônias – UFC/100µl de *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), nos diferentes tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas), frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml)

| Concentrações do extrato aquoso mg/ml | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |     |     |       |     |
|---------------------------------------|---|-----|-----|-------|-----|
|                                       | 0   | 6   | 12  | 18    | 24  |
|                                       | UFC   | UFC | UFC | UFC   | UFC |
| 1,00                                  | 26  | 0   | 93  | 10000 | 0   |
|                                       | 20  | 1   | 54  | 10000 | 0   |
|                                       | 34  | 0   | 128 | 10000 | 0   |
| 5,00                                  | 31  | 2   | 8   | 10000 | 0   |
|                                       | 26  | 1   | 4   | 10000 | 0   |
|                                       | 38  | 3   | 6   | 10000 | 0   |
| 25,00                                 | 27  | 0   | 0   | 10000 | 0   |
|                                       | 28  | 0   | 0   | 10000 | 0   |
|                                       | 26  | 0   | 0   | 10000 | 0   |
| 50,00                                 | 12  | 0   | 0   | 158   | 0   |
|                                       | 10  | 0   | 0   | 144   | 0   |
|                                       | 14  | 0   | 0   | 212   | 0   |
| 75,00                                 | 10  | 0   | 0   | 23    | 0   |
|                                       | 8   | 0   | 0   | 26    | 0   |
|                                       | 12  | 0   | 0   | 18    | 0   |



## APÊNDICE F

Resultados, médias e desvios padrão das leituras das contagens das unidades formadoras de colônias – UFC/100µl de *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), transformadas pela equação  $\text{Log}(X+1)$ , nos diferentes tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas), frente às distintas concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml)

| Concentrações<br>do extrato<br>aquoso mg/ml | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |      |      |      |      |
|---|---|------|------|------|------|
|   | 0   | 6    | 12   | 18   | 24   |
|   | UFC   | UFC  | UFC  | UFC  | UFC  |
| <b>1,00</b>                                 | 1,43  | 0,00 | 1,97 | 4,00 | 0,00 |
|   | 1,32  | 0,30 | 1,74 | 4,00 | 0,00 |
|   | 1,54  | 0,00 | 2,11 | 4,00 | 0,00 |
| <b>Média</b>                                | 1,43  | 0,10 | 1,94 | 4,00 | 0,00 |
| <b>Desvio</b>                               | 0,11  | 0,17 | 0,19 | 0,00 | 0,00 |
| <b>5,00</b>                                 | 1,51  | 0,48 | 0,95 | 4,00 | 0,00 |
|   | 1,43  | 0,30 | 0,70 | 4,00 | 0,00 |
|   | 1,59  | 0,60 | 0,85 | 4,00 | 0,00 |
| <b>Média</b>                                | 1,51  | 0,46 | 0,83 | 4,00 | 0,00 |
| <b>Desvio</b>                               | 0,08  | 0,15 | 0,13 | 0,00 | 0,00 |
| <b>25,00</b>                                | 1,45  | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 0,00 |
|   | 1,46  | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 0,00 |
|   | 1,43  | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 0,00 |
| <b>Média</b>                                | 1,45  | 0,00 | 0,00 | 4,00 | 0,00 |
| <b>Desvio</b>                               | 0,02  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>50,00</b>                                | 1,11  | 0,00 | 0,00 | 2,20 | 0,00 |
|   | 1,04  | 0,00 | 0,00 | 2,16 | 0,00 |
|   | 1,18  | 0,00 | 0,00 | 2,33 | 0,00 |
| <b>Média</b>                                | 1,11  | 0,00 | 0,00 | 2,23 | 0,00 |
| <b>Desvio</b>                               | 0,07  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>75,00</b>                                | 1,04  | 0,00 | 0,00 | 1,38 | 0,00 |
|   | 0,95  | 0,00 | 0,00 | 1,43 | 0,00 |
|   | 1,11  | 0,00 | 0,00 | 1,28 | 0,00 |
| <b>Média</b>                                | 1,04  | 0,00 | 0,00 | 1,36 | 0,00 |
| <b>Desvio</b>                               | 0,08  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

## APÊNDICE G

Resultado da leitura das contagens das unidades formadoras de colônias – UFC/100 $\mu$ l de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), nos diferentes tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas), frente às diversas concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml)

| Concentrações do extrato aquoso mg/ml | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |     |     |       |       |
|---------------------------------------|---|-----|-----|-------|-------|
|                                       | 0   | 6   | 12  | 18    | 24    |
|                                       | UFC   | UFC | UFC | UFC   | UFC   |
| <b>1,00</b>                           | 67  | 26  | 100 | 10000 | 10000 |
|                                       | 70  | 20  | 130 | 10000 | 10000 |
|                                       | 62  | 34  | 88  | 10000 | 10000 |
| <b>5,00</b>                           | 77  | 1   | 5   | 160   | 516   |
|                                       | 80  | 1   | 6   | 182   | 420   |
|                                       | 84  | 0   | 4   | 191   | 464   |
| <b>25,00</b>                          | 39  | 0   | 0   | 0     | 0     |
|                                       | 50  | 0   | 0   | 0     | 0     |
|                                       | 34  | 0   | 0   | 0     | 0     |
| <b>50,00</b>                          | 14  | 0   | 0   | 0     | 0     |
|                                       | 16  | 0   | 0   | 0     | 0     |
|                                       | 14  | 0   | 0   | 0     | 0     |
| <b>75,00</b>                          | 4   | 0   | 0   | 0     | 0     |
|                                       | 2   | 0   | 0   | 0     | 0     |
|                                       | 6   | 0   | 0   | 0     | 0     |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

## APÊNDICE H

Resultados, médias e desvios padrão das leituras das contagens das unidades formadoras de colônias – UFC/100µl de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), transformadas pela equação Log (X+1), nos diferentes tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas), frente às distintas concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml)

| Concentrações do extrato aquoso mg/ml | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |      |      |      |      |
|---------------------------------------|---|------|------|------|------|
|                                       | 0   | 6    | 12   | 18   | 24   |
|                                       | UFC   | UFC  | UFC  | UFC  | UFC  |
| <b>1,00</b>                           | 1,83  | 1,43 | 2,00 | 4,00 | 4,00 |
|                                       | 1,85  | 1,32 | 2,12 | 4,00 | 4,00 |
|                                       | 1,80  | 1,54 | 1,95 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Média</b>                          | 1,80  | 1,43 | 2,02 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,03  | 0,11 | 0,09 | 0,00 | 0,00 |
| <b>5,00</b>                           | 1,89  | 0,30 | 0,78 | 2,21 | 2,71 |
|                                       | 1,91  | 0,30 | 0,85 | 2,26 | 2,62 |
|                                       | 1,93  | 0,00 | 0,70 | 2,28 | 2,67 |
| <b>Média</b>                          | 1,91  | 0,20 | 0,77 | 2,25 | 2,67 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,02  | 0,17 | 0,08 | 0,04 | 0,05 |
| <b>25,00</b>                          | 1,60  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
|                                       | 1,71  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
|                                       | 1,54  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>Média</b>                          | 1,62  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,09  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>50,00</b>                          | 1,18  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
|                                       | 1,23  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
|                                       | 1,18  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>Média</b>                          | 1,19  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,03  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>75,00</b>                          | 0,70  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
|                                       | 0,48  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
|                                       | 0,85  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>Média</b>                          | 0,67  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,19  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

## APÊNDICE I

Resultado da leitura das contagens das unidades formadoras de colônias – UFC/100 $\mu$ l de *Candida albicans* (ATCC 10231), nos diferentes tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas), frente às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml)

| Concentrações<br>do extrato<br>aquoso mg/ml | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |     |      |       |       |
|---|---|-----|------|-------|-------|
|   | 0   | 6   | 12   | 18    | 24    |
|   | UFC   | UFC | UFC  | UFC   | UFC   |
| <b>1,00</b>                                 | 87  | 322 | 5607 | 10000 | 10000 |
|   | 77  | 280 | 7371 | 10000 | 10000 |
|   | 106   | 348 | 6804 | 10000 | 10000 |
| <b>5,00</b>                                 | 73  | 193 | 1120 | 1116  | 1932  |
|   | 68  | 199 | 1028 | 1092  | 2760  |
|   | 77  | 190 | 1134 | 1400  | 1560  |
| <b>25,00</b>                                | 74  | 79  | 236  | 400   | 86    |
|   | 66  | 66  | 346  | 292   | 92    |
|   | 84  | 96  | 291  | 370   | 90    |
| <b>50,00</b>                                | 34  | 37  | 14   | 36    | 0     |
|   | 40  | 40  | 24   | 32    | 0     |
|   | 31  | 36  | 32   | 38    | 0     |
| <b>75,00</b>                                | 56  | 11  | 18   | 16    | 0     |
|   | 66  | 14  | 22   | 14    | 0     |
|   | 46  | 8   | 16   | 14    | 0     |

---

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

## APÊNDICE J

Resultados, médias e desvios padrão das leituras das contagens das unidades formadoras de colônias – UFC/100 $\mu$ l de *Candida albicans* (ATCC 10231), transformadas pela equação  $\text{Log}(X+1)$ , nos diferentes tempos de contato (0, 6, 12, 18 e 24 horas), frente às distintas concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml)

| Concentrações do extrato aquoso mg/ml | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |      |      |      |      |
|---------------------------------------|---|------|------|------|------|
|                                       | 0   | 6    | 12   | 18   | 24   |
|                                       | UFC   | UFC  | UFC  | UFC  | UFC  |
| <b>1,00</b>                           | 1,94  | 2,51 | 3,75 | 4,00 | 4,00 |
|                                       | 1,89  | 2,45 | 3,87 | 4,00 | 4,00 |
|                                       | 2,03  | 2,54 | 3,83 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Média</b>                          | 1,96  | 2,50 | 3,82 | 4,00 | 4,00 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,07  | 0,05 | 0,06 | 0,00 | 0,00 |
| <b>5,00</b>                           | 1,87  | 2,29 | 3,05 | 3,05 | 3,29 |
|                                       | 1,84  | 2,30 | 3,01 | 3,04 | 3,44 |
|                                       | 1,89  | 2,28 | 3,05 | 3,15 | 3,19 |
| <b>Média</b>                          | 1,87  | 2,29 | 3,04 | 3,08 | 3,31 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,03  | 0,01 | 0,02 | 0,06 | 0,13 |
| <b>25,00</b>                          | 1,88  | 1,90 | 2,37 | 2,60 | 1,94 |
|                                       | 1,83  | 1,83 | 2,54 | 2,47 | 1,97 |
|                                       | 1,93  | 1,99 | 2,47 | 2,57 | 1,96 |
| <b>Média</b>                          | 1,88  | 1,91 | 2,46 | 2,55 | 1,96 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,05  | 0,08 | 0,09 | 0,07 | 0,02 |
| <b>50,00</b>                          | 1,54  | 1,58 | 1,18 | 1,57 | 0,00 |
|                                       | 1,61  | 1,61 | 1,40 | 1,52 | 0,00 |
|                                       | 1,51  | 1,57 | 1,52 | 1,59 | 0,00 |
| <b>Média</b>                          | 1,55  | 1,59 | 1,36 | 1,56 | 0,00 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,05  | 0,02 | 0,17 | 0,04 | 0,00 |
| <b>75,00</b>                          | 1,76  | 1,08 | 1,28 | 1,23 | 0,00 |
|                                       | 1,83  | 1,18 | 1,36 | 1,18 | 0,00 |
|                                       | 1,67  | 0,95 | 1,23 | 1,18 | 0,00 |
| <b>Média</b>                          | 1,75  | 1,07 | 1,29 | 1,19 | 0,00 |
| <b>Desvio</b>                         | 0,08  | 0,12 | 0,07 | 0,03 | 0,00 |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

## APÊNDICE K

Médias das contagens de unidades formadoras de colônias viáveis – UFC/100µl de *Staphylococcus aureus*; de *Escherichia coli*, de *Streptococcus pyogenes*; de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Candida albicans* transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (1 e 5 mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h)

| Concentração do extrato aquoso de <i>S. adstringens</i> - 1,00 mg/ml |   |            |            |            |            |
|--|---|------------|------------|------------|------------|
| Patógenos  | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |            |            |            |            |
|  | 0   | 6          | 12         | 18         | 24         |
| <i>S. aureus</i>   | 2,28 A , c                                      | 2,18 C , c | 3,53 B , b | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| <i>E. coli</i>   | 2,40 A , b                                      | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| <i>S. pyogenes</i>   | 1,43 C , c                                      | 0,10 E , d | 1,94 C , b | 4,00 A , a | 0,00 B , d |
| <i>P. aeruginosa</i>   | 1,83 B , b                                      | 1,43 D , c | 2,02 C , b | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| <i>C. albicans</i>   | 1,96 B , c                                      | 2,50 B , d | 3,82 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| Concentração do extrato aquoso de <i>S. adstringens</i> - 5,00 mg/ml |   |            |            |            |            |
| Patógenos  | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |            |            |            |            |
|  | 0   | 6          | 12         | 18         | 24         |
| <i>S. aureus</i>   | 2,13 A , b                                      | 1,31 C , c | 2,28 C , b | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| <i>E. coli</i>   | 1,41 C , b                                      | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| <i>S. pyogenes</i>   | 1,51 C , b                                      | 0,46 D , d | 0,83 D , c | 4,00 A , a | 0,00 D , e |
| <i>P. aeruginosa</i>   | 1,91 AB,c                                       | 0,20 E , e | 0,77 D , d | 2,25 C , b | 2,67 C , a |
| <i>C. albicans</i>   | 1,87 B , d                                      | 2,29 B , c | 3,04 B , b | 3,08 B , b | 3,31 B , a |
| <b>C.V.(%)</b>   | 4,55%   |            |            |            |            |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

Notas: A) Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam semelhança estatística.  
 (a) Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam semelhança estatística.  
 Os valores seguidos de letras iguais são semelhantes estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ )  
 C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

## APÊNDICE L

Médias das contagens de unidades formadoras de colônias viáveis – UFC/100µl de *Staphylococcus aureus*; de *Escherichia coli*, de *Streptococcus pyogenes*; de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Candida albicans* transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (25 e 50 mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h)

| Concentração do extrato aquoso de <i>S. adstringens</i> – 25,00 mg/ml |   |            |            |            |            |
|---|---|------------|------------|------------|------------|
| Patógenos   | Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h) |            |            |            |            |
|   | 0   | 6          | 12         | 18         | 24         |
| <i>S. aureus</i>  | 1,80 AB,c                                       | 1,07 C , d | 1,61 C , c | 2,78 B , b | 4,00 A , a |
| <i>E. coli</i>  | 1,65 BC,b                                       | 1,66 B , b | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a |
| <i>S. pyogenes</i>  | 1,45 C , b                                      | 0,00 D , c | 0,00 D , c | 4,00 A , a | 0,00 C , c |
| <i>P. aeruginosa</i>  | 1,62 BC,a                                       | 0,00 D , b | 0,00 D , b | 0,00 D , b | 0,00 C , b |
| <i>C. albicans</i>  | 1,88 A , b                                      | 1,91 A , b | 2,46 B , a | 2,55 C , a | 1,96 B , b |

| Concentração do extrato aquoso de <i>S. adstringens</i> – 50,00 mg/ml |   |            |            |            |            |
|---|---|------------|------------|------------|------------|
| Patógenos   | Tempo de contato do extrato aquoso em horas (h) |            |            |            |            |
|   | 0   | 6          | 12         | 18         | 24         |
| <i>S. aureus</i>  | 1,49 A , b                                      | 0,67 B , c | 0,30 C , d | 2,87 B , a | 2,67 A , a |
| <i>E. coli</i>  | 1,39 AB,c                                       | 1,48 A , c | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 2,85 A , b |
| <i>S. pyogenes</i>  | 1,11 C , b                                      | 0,00 C , c | 0,00 D , c | 2,23 C , a | 0,00 B , c |
| <i>P. aeruginosa</i>  | 1,19 BC,a                                       | 0,00 C , b | 0,00 D , b | 0,00 E , b | 0,00 B , b |
| <i>C. albicans</i>  | 1,55 A , a                                      | 1,59 A , a | 1,36 B , a | 1,56 D , a | 0,00 B , b |
| <b>C.V.(%)</b>  | 4,55%   |            |            |            |            |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

Notas: (A) Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam semelhança estatística.  
 (a) Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam semelhança estatística.  
 Os valores seguidos de letras iguais são semelhantes estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ).  
 C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

## APÊNDICE M

Médias das contagens de unidades formadoras de colônias viáveis – UFC/100µl de *Staphylococcus aureus*; de *Escherichia coli*, de *Streptococcus pyogenes*; de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Candida albicans* transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às concentrações do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (75 mg/ml), em função do tempo de exposição em horas (h)

| <b>Concentração do extrato aquoso de <i>S. adstringens</i> – 75,00 mg/ml</b> |  |            |            |            |            |
|--|--|------------|------------|------------|------------|
| <b>Patógenos</b>   | <b>Tempo de contato ao extrato aquoso em horas (h)</b> |            |            |            |            |
|  | <b>0</b>   | <b>6</b>   | <b>12</b>  | <b>18</b>  | <b>24</b>  |
| <b><i>S. aureus</i></b>  | 1,12 B , b   | 0,26 B , d | 0,10 C , d | 2,01 B , a | 0,87 B , c |
| <b><i>E. coli</i></b>  | 0,77 C , d   | 0,26 B , e | 3,60 A , a | 3,37 A , b | 3,10 A , c |
| <b><i>S. pyogenes</i></b>  | 1,04 B , b   | 0,00 C , c | 0,00 C , c | 1,36 C , a | 0,00 C , c |
| <b><i>P. aeruginosa</i></b>  | 0,67 C , a   | 0,00 C , b | 0,00 C , b | 0,00 D , b | 0,00 C , b |
| <b><i>C. albicans</i></b>  | 1,75 A , a   | 1,07 A , b | 1,29 B , b | 1,19 C , b | 0,00 C , c |
| <b>C.V.(%)</b>   | 4,55%  |            |            |            |            |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

Notas: (A) Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam semelhança estatística.

(a) Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam semelhança estatística.

Os valores seguidos de letras iguais são semelhantes estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.



## APÊNDICE N

Valores médios das contagens de UFC/100 $\mu$ l de *S. aureus*, *E. coli*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* e *Candida albicans*, transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às concentrações do extrato aquoso de *S. adstringens* (mg/ml), em função de tempos de contato de zero e seis horas

| Tempo de contato do extrato aquoso – 0 hora |  |            |            |            |            |
|---|--|------------|------------|------------|------------|
| Patógenos                                   | Concentração do extrato de <i>S. adstringens</i> (mg/ml) |            |            |            |            |
|   | 1,00   | 5,00       | 25,00      | 50,00      | 75,00      |
| <i>S. aureus</i>                            | 2,40 A , a   | 2,13 A , a | 1,80 AB,b  | 1,49 A , c | 1,12 B , d |
| <i>E. coli</i>                              | 2,28 A , a   | 1,41 C , c | 1,65 BC,b  | 1,39 AB,c  | 0,77 C , d |
| <i>S. pyogenes</i>                          | 1,43 C , a   | 1,51 C , a | 1,45 C , a | 1,11 C , b | 1,04 B , b |
| <i>P. aeruginosa</i>                        | 1,83 B,ab  | 1,91 AB,a  | 1,62 BC,b  | 1,19 BC,c  | 0,67 C , d |
| <i>C. albicans</i>                          | 1,96 B , a   | 1,87 B , a | 1,88 A , a | 1,55 A,ab  | 1,75 A , b |
| C.V.(%)                                     | 4,55%  |            |            |            |            |
| Tempo de contato do extrato aquoso – 6 hora |  |            |            |            |            |
| Patógenos                                   | Concentração do extrato de <i>S. adstringens</i> (mg/ml) |            |            |            |            |
|   | 1,00   | 5,00       | 25,00      | 50,00      | 75,00      |
| <i>S. aureus</i>                            | 2,18 C , a   | 1,31 C , b | 1,07 C , c | 0,67 B , d | 0,26 B , e |
| <i>E. coli</i>                              | 4,00 A , a   | 4,00 A , a | 1,66 B , b | 1,48 A , b | 0,26 B , c |
| <i>S. pyogenes</i>                          | 0,10 E , b   | 0,46 D , a | 0,00 D , b | 0,00 C , b | 0,00 C , b |
| <i>P. aeruginosa</i>                        | 1,43 D , a   | 0,20 E , b | 0,00 D , b | 0,00 C , b | 0,00 C , b |
| <i>C. albicans</i>                          | 2,50 B , a   | 2,29 B , a | 1,91 A , b | 1,59 A , c | 1,07 B , d |
| C.V.(%)                                     | 4,55%  |            |            |            |            |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

Notas: (A) Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam semelhança estatística.

(a) Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam semelhança estatística.

Os valores seguidos de letras iguais são semelhantes estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

## APÊNDICE O

Valores médios das contagens de UFC/100µl de *S. aureus*, *E. coli*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* e *Candida albicans*, transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às concentrações do extrato aquoso de *S. adstringens* (mg/ml), em função de tempos de contato de doze e dezoito horas

| Tempo de contato do extrato aquoso – 12 hora |  |            |            |            |            |
|--|--|------------|------------|------------|------------|
| Patógenos                                    | Concentração do extrato de <i>S. adstringens</i> (mg/ml) |            |            |            |            |
|  | 1,00   | 5,00       | 25,00      | 50,00      | 75,00      |
| <i>S. aureus</i>                             | 3,53 B , a   | 2,28 C , d | 1,61 C , c | 0,30 C , d | 0,10 C , d |
| <i>E. coli</i>                               | 4,00 A , a   | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 3,60 A , b |
| <i>S. pyogenes</i>                           | 1,94 C , a   | 0,83 D , b | 0,00 D , c | 0,00 D , c | 0,00 C , c |
| <i>P. aeruginosa</i>                         | 2,02 C , a   | 0,77 D , b | 0,00 D , c | 0,00 D , c | 0,00 C , c |
| <i>C. albicans</i>                           | 3,82 A , a   | 3,04 B , b | 2,46 B , c | 1,36 B , d | 1,29 B , d |
| C.V.(%)                                      | 4,55%  |            |            |            |            |
| Tempo de contato do extrato aquoso – 18 hora |  |            |            |            |            |
| Patógenos                                    | Concentração do extrato de <i>S. adstringens</i> (mg/ml) |            |            |            |            |
|  | 1,00   | 5,00       | 25,00      | 50,00      | 75,00      |
| <i>S. aureus</i>                             | 4,00 A , a   | 4,00 A , a | 2,78 B , b | 2,87 B , b | 2,01 B , c |
| <i>E. coli</i>                               | 4,00 A , a   | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 3,37 A , b |
| <i>S. pyogenes</i>                           | 4,00 A , a   | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 2,23 C , b | 1,36 C , c |
| <i>P. aeruginosa</i>                         | 4,00 A , a   | 2,25 B , b | 0,00 D , c | 0,00 E , c | 0,00 D , c |
| <i>C. albicans</i>                           | 4,00 A , a   | 3,08 C , b | 2,55 C , c | 1,56 D , d | 1,19 C , e |
| C.V.(%)                                      | 4,55%  |            |            |            |            |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

Notas: (A) Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam semelhança estatística.  
 (a) Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam semelhança estatística.  
 Os valores seguidos de letras iguais são semelhantes estatisticamente, pelo teste Tukey (p<0,01).  
 C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

## APÊNDICE P

Valores médios das contagens de UFC/100µl de *S. aureus*, *E. coli*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* e *Candida albicans*, transformadas pela expressão logarítmica,  $\text{Log}(X+1)$ , frente às concentrações do extrato aquoso de *S. adstringens* (mg/ml), em função de tempos de contato de vinte e quatro horas

| Tempo de exposição do extrato aquoso – 24 hora |  |            |            |            |            |
|--|--|------------|------------|------------|------------|
| Patógenos                                      | Concentração do extrato de <i>S. adstringens</i> (mg/ml) |            |            |            |            |
|  | 1,00   | 5,00       | 25,00      | 50,00      | 75,00      |
| <i>S. aureus</i>                               | 4,00 A , a   | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 2,67 A , b | 0,87 B , c |
| <i>E. coli</i>                                 | 4,00 A , a   | 4,00 A , a | 4,00 A , a | 2,85 A , c | 3,10 A , b |
| <i>S. pyogenes</i>                             | 0,00 B , a   | 0,00 D , a | 0,00 C , a | 0,00 B , a | 0,00 C , a |
| <i>P. aeruginosa</i>                           | 4,00 A , a   | 2,67 C , b | 0,00 C , a | 0,00 B , a | 0,00 C , a |
| <i>C. albicans</i>                             | 4,00 A , a   | 3,31 B , b | 1,96 B , c | 0,00 B , d | 0,00 C , d |
| <b>C.V.(%)</b>                                 | 4,55%  |            |            |            |            |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

Notas: (A) Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam semelhança estatística.  
 (a) Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam semelhança estatística.  
 Os valores seguidos de letras iguais são semelhantes estatisticamente, pelo teste Tukey ( $p \leq 0,01$ ).  
 C.V.(%) = Coeficiente de variação em porcentagem.

## APÊNDICE Q

Análise de Variância dos dados balanceados, pelo procedimento do arranjo fatorial triplo, processada no software SAEG 9.1 – 2007 obtido das contagens das unidades formadoras de colônias UFC/100µl, dos cinco micro-organismos testados, transformadas pela expressão logarítmica, Log (X+1), frente às cinco concentrações extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (mg/ml), em função dos cinco tempos de exposição em horas (h)

1. Efeitos:

| Efeitos | MICRO.          | CONC.        | TEMPO | REP.      |
|---------|-----------------|--------------|-------|-----------|
|         | Micro-organismo | Concentração | Tempo | Repetição |

2. Análise de Variância dos dados balanceados:

| Fontes de Variação               | Graus de Liberdade | Soma do Quadrado | Quadrado Médio | Teste F | Significância |
|----------------------------------|--------------------|------------------|----------------|---------|---------------|
| <b>Total</b>                     | 374                | 778,03           |                |         |               |
| <b>Total de redução</b>          | 124                | 776,26           | 6,26           | 882,80  | 0,000000      |
| <b>CONC.</b>                     | 4                  | 180,47           | 45,12          | 6362,39 | 0,000000      |
| <b>TEMPO</b>                     | 4                  | 108,97           | 27,24          | 3841,84 | 0,000000      |
| <b>MICRO.</b>                    | 4                  | 224,09           | 56,02          | 7900,25 | 0,000000      |
| <b>CONC*TEMPO</b>                | 16                 | 21,57            | 1,35           | 190,10  | 0,000000      |
| <b>CONC*MICRO</b>                | 16                 | 28,68            | 1,79           | 252,76  | 0,000000      |
| <b>TEMPO*MICRO</b>               | 16                 | 133,07           | 8,32           | 1172,84 | 0,000000      |
| <b>CONC*TEMPO*MICRO</b>          | 64                 | 79,41            | 1,24           | 174,97  | 0,000000      |
| <b>Resíduo</b>                   | 250                | 1,77             | 0,007091273    |         |               |
| <b>Média geral</b>               |                    |                  | 1,85           |         |               |
| <b>Coeficiente de Variação %</b> |                    |                  | 4,55           |         |               |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

## APÊNDICE R

Análise de variância pelo procedimento do arranjo fatorial simples, processada no software SAEG 9.1 – 2007, utilizando os diâmetros médios dos halos de inibição, em milímetros (mm) causados pelas concentrações do extrato de *Stryphnodendron adstringens* (1,00; 5,00; 25,00; 50,00 e 75,00 mg/ml) sobre; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*; *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* no delineamento inteiramente casualizado – DIC, após incubação de 24 horas

### 1. Efeitos:

| Efeitos | MICRO.          | CONC.        |
|---------|-----------------|--------------|
|         | Micro-organismo | Concentração |

### 2. Análise de Variância dos dados balanceados:

| Fontes de Variação               | Graus de Liberdade | Soma do Quadrado | Quadrado Médio | Teste F | Significância |
|----------------------------------|--------------------|------------------|----------------|---------|---------------|
| <b>MICRO.</b>                    | 4                  | 131,65           | 32,91          | 10,26   | 0,00001       |
| <b>CONC.</b>                     | 4                  | 928,49           | 232,12         | 72,34   | 0,00000       |
| <b>CONC*MICRO</b>                | 16                 | 121,63           | 7,60           | 2,37    | 0,00497       |
| <b>Resíduo</b>                   | 100                | 320,88           | 3,21           |         |               |
| <b>Média geral</b>               |                    |                  | 8,93           |         |               |
| <b>Desvio</b>                    |                    |                  | 3,48           |         |               |
| <b>Coeficiente de Variação %</b> |                    |                  | 20,67          |         |               |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.