

Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina

Denise A. C. Bezerra,¹ Andréia. V. Pereira,¹ Katiuscia M. S. Lôbo,¹ Onaldo G. Rodrigues,^{*,2} Ana C. R. Athayde,² Rinaldo A. Mota,³ Elizabeth. S. Medeiros,³ Sheina Campos Rodrigues²

¹Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, 58708-110 Patos-PB, Brasil

²Laboratório de Ciências Químicas e Biológicas, Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, 58708-110 Patos-PB, Brasil

³Laboratório de Doenças Infecto Contagiosas, Universidade Federal Rural do Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52071-030 Recife-PE. Brasil

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade do *Staphylococcus aureus* ao extrato da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.). Foram isoladas 25 cepas de *S. aureus* de amostras de leite de vacas com histórico de mastite clínica e subclínica, submetidas ao teste de atividade antimicrobiana do extrato de *M. tenuiflora*. Os testes de sensibilidade *in vitro* foram realizados utilizando o método de difusão em meio sólido. Em seguida foram inoculados 50 µL do extrato nas seguintes diluições 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512. As placas foram incubadas a 37 °C, por um período de 24 a 48 h. Os ensaios foram realizados em triplicata. Observou-se halos de inibição entre 6 e 25 mm de diâmetro. O percentual de sensibilidade das amostras testadas foi distribuído em: 1:1 a 1:32 (100%); 1:64 (92%); 1:128 (72%); 1:256 (28%); 1:512 (0%). O estudo da *M. tenuiflora* sobre as amostras de *S. aureus* testadas demonstrou que a planta tem ação antimicrobiana.

Unitermos: Jurema-preta, *Mimosa tenuiflora*, sensibilidade bacteriana, produtos naturais, bovinos.

ABSTRACT: “Biological Activity of jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) on *Staphylococcus aureus* isolated of mastitis cattle.” The aim of this study was to evaluate the sensitivity of the *S. aureus* to the extract of *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir. (jurema-preta). Twenty five strains of *S. aureus* were isolated from milk samples with description of clinical and subclinical mastitis and submitted to antimicrobial activity test of the *M. tenuiflora* extract. The sensitivity *in vitro* tests were carried out using the agar diffusion method (well diffusion method). After that, 50µL of the extract were inoculated in the following dilutions: 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512. The plates were incubated at 37 °C during 24 and 48 h. The tests were made in triplicate. Halos of inhibition were observed between 6 and 25 mm of diameter. The percentage of sensitivity of the tested samples was distributed in: 1:1 to 1:32 (100%), 1:64 (92%); 1:128 (72%); 1:256 (28%); 1:512 (0%). The study of *M. tenuiflora* on the tested *S. aureus* samples it demonstrated that the plant has antimicrobial action.

Keywords: jurema-preta, *Mimosa tenuiflora*, bacterial sensitivity, natural products, cattle.

INTRODUÇÃO

Em medicina veterinária o gênero *Staphylococcus* é o prevalente agente causador de mastites. Houve um grande emprego de antibióticos no tratamento das mastites, resultando em seleção de cepas resistentes aos mesmos, aumentando o número de casos provocados por outros germes não habitualmente ligados a esses processos. Além dos altos custos com o tratamento, há uma preocupação

crescente com a presença de resíduos de antibióticos no leite, estimulando uma busca de métodos alternativos para a abordagem clássica dos antibióticos (Costa et al., 1985).

Atualmente, 95% das cepas de *Staphylococcus aureus*, de todo o mundo, são resistentes à penicilina, ampicilina e penicilina antipseudomonas. A indústria farmacêutica respondeu a esta crise com a síntese da methicilina (penicilina semi-sintética). Mas desde 1980 tem-se notado o aumento da resistência de *S. aureus* a este

antibiótico em vários hospitais do mundo (Neu, 1992). A resistência bacteriana aos antibióticos é mundial. Os riscos da transmissão de bactérias resistentes para o homem é extremamente efetivo através da alimentação (WHO, 1997).

Devido ao intenso uso das plantas na medicina popular, desde as épocas mais remotas, estas têm sido valorizadas como produtos naturais importantes para a manutenção da saúde humana, especialmente na última década, com a realização de muitos estudos sobre terapias naturais (Corrêa et al., 2001). As propriedades terapêuticas dos princípios e medicamentos fitoterápicos começam a ganhar cada vez mais espaço no tratamento veterinário, profissionais adeptos da fitoterapia revelam alta frequência de sucessos em tratamento de parasitoses e enfermidades infecciosas, inclusive em tratamentos de mastites (Costa et al., 1985)

A jurema-preta pertence à família *Leguminosae* e subfamília *Mimosoidae*, característica da Caatinga, e apresenta grande potencial de produção de forragem constituindo, na maioria das vezes, a principal fonte de alimentação animal nesta região (Caldas Pinto, 2006). É também utilizada como madeira e carvão, bem como na medicina caseira, em tratamentos de queimaduras, acne e problemas de pele (Maia, 2004).

Da casca da *M. tenuiflora* (Willd.) Poir., foram isolados vários compostos com atividade biológica que vêm sendo estudadas e publicadas nos últimos anos, dando cada vez mais destaque à espécie nos avanços do conhecimento químico-farmacológico. A abundância de taninos e flavonóides detectados no extrato acetato de etila de *M. tenuiflora* são os prováveis responsáveis pela atividade antimicrobiana da planta (Meckes-Lozoya et al., 1990).

Diante do potencial antimicrobiano desta planta este estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade do *S. aureus* isolado de casos de mastite clínica e subclínica em bovinos ao extrato da *M. tenuiflora*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ciências Químicas e Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, e no Laboratório de Doenças Infecto Contagiosas da Universidade Federal Rural do Pernambuco. Foi realizada a coleta da jurema-preta na fazenda do Núcleo de Pesquisa para o Desenvolvimento do Semi-árido, pertencente à Universidade Federal de Campina Grande, no município de Patos-PB. A parte da planta utilizada no estudo foi a casca. A identificação botânica e preparação de exsiccata foi realizada no Herbário Caririensis Dárdano de Andrade Lima na Universidade Regional do Cariri, Crato-CE, pela botânica curadora do Herbário, Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva. A exsiccata foi depositada no herbário sob o No. #3275.

Após a colheita e identificação botânica as amostras foram acondicionadas em sacos de papel comum, aerados e em seguida postas para secagem em estufa de ventilação forçada a 40 °C. Após 72 h a amostra foi moída e acondicionada em reservatórios de vidro estéreis até seu uso.

Obtenção do extrato etanólico

Os extratos foram obtidos a partir de 500 g do material seco e moído e adicionado 1000 mL de etanol PA., segundo a metodologia descrita por Matos (1997). A concentração final do extrato da jurema-preta foi de 0,5 g/mL com rendimento de 57 g de extrato bruto. Para os ensaios, foi utilizado o extrato bruto nas seguintes diluições: 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512.

Aquisição de amostras de animais infectados

Utilizou-se cem vacas de diferentes estágios de lactação primíparas e múltiparas. Os animais apresentavam boas condições de saúde, eram alimentados e suplementados adequadamente e recebiam sal mineral e água *ad libitum*. Foram coletadas amostras de 5 mL de leite por cada quarto mamário de maneira asséptica, totalizando quatrocentas amostras segundo a metodologia de Bouchot et al. (1985), para a realização do exame microbiológico, e identificação do *S. aureus* e encaminhadas, sob refrigeração, ao Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Exames microbiológicos

A lactocultura foi feita em placas contendo ágar base acrescido de 8% (v/v) de sangue ovino desfibrinado. As placas foram incubadas em aerobiose a 37 °C, em estufa microbiológica e analisadas após 24 e 48 h (NMC, 1990). Foram observadas as características de crescimento das colônias em placa, como produção de hemólise, pigmento e características morfo-tintoriais, utilizando o método de coloração pela técnica de Gram. A classificação das bactérias Gram positivas foi realizada de acordo com Quinn et al. (1994).

Identificação das cepas de *Staphylococcus aureus*

Para a identificação de *S. aureus* todas as cepas de estafilococos foram submetidas aos testes de produção de coagulase livre (Plasma Coagulase EDTA, Coagu-Plasma LB - Laborclin, Brasil), DNase (Agar DNase - DFICO) e catalase (Silva et al., 1997). As provas de produção de acetoina, fermentação da glicose (aerobiose) e do manitol (aerobiose e anaerobiose) foram realizadas segundo Mac Faddin (1980) e os isolados, classificados de acordo com Baird-Parker (1990).

Estudo da atividade antimicrobiana da jurema-preta

As linhagens foram cultivadas em caldo nutritivo (BHI- Brain Heart Infusion - DIFCO); incubadas a 37 °C por 24 h. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato alcoólico de *M. tenuiflora* sobre as linhagens bacterianas. Utilizou-se orifícios de 6 mm de diâmetro os quais foram preenchidos com 50 µL da solução do extrato diluída em água destilada, nas concentrações pré-estabelecidas. A sensibilidade da amostra foi considerada para medidas de halos superiores a 12 mm. Os ensaios foram realizados em duplicata acompanhados de controle positivo com o antibiótico amoxicilina (10 mg) e como controle positivo e disco embebido com etanol 70% controle negativo (CECON/SP). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por um período de 24 h e a leitura efetuada após 24 e 48 h. Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento bacteriano, observada pela presença do halo de inibição. (Silva et al, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram a eficácia do extrato de *M. tenuiflora* sobre cepas de *S. aureus* em diferentes concentrações, sendo observado halos de inibição entre 6 e 25 mm. Das amostras testadas, as diluições de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32 apresentaram halos superiores ao halo mínimo de 12 mm estabelecido por Silva et al. (2003), enquanto que as diluições 1:64; 1:128; 1:256; 1:512 apresentaram percentual de atividade de 92%, 72%, 28% e 0% respectivamente. O microrganismo testado não apresentou halo de inibição no disco controle negativo embebido com álcool 70% e no teste controle positivo o microrganismo foi resistente em 28,8% das amostras, e apresentou um percentual de sensibilidade de 53,7%.

Observou-se que a diluição é inversamente proporcional a eficácia do extrato, como demonstram os resultados obtidos por Heinrich et al. (1992), onde cepas de *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus* sp foram sensíveis ao extrato de *M. tenuiflora*, apresentando uma redução na atividade biológica: 1:64 (90%); 1:128 (80%); 1:256 (65%); 1:512 (45%). Em estudos realizados por Pereira et al. (2009a), os extratos etanólicos de *M. tenuiflora* foram utilizados no tratamento de búfalas com diagnóstico de mastite clínica e subclínica, apresentando ser eficaz no tratamento da doença causada por cepas de *S. aureus* coagulase positivo e negativo quando comparado ao extrato de *Azadiracta indica*, confirmando os resultados obtidos. Os resultados deste estudo demonstraram a eficácia do extrato de *M. tenuiflora* em diferentes concentrações, corroborando com os resultados obtidos por Pereira et al. (2009b) que avaliou o extrato de *M. tenuiflora*, *Caesalpinia férrea* e *Punica granatum* observando que os halos de inibição

formados pelo extrato da *M. tenuiflora* variaram entre 6 e 30 mm e foram superiores aos encontrados nas outras espécies e ao apresentado pelos antibióticos penicilina e azitromicina cujos os halos foram entre 5- 9mm.

A atividade antimicrobiana do extrato de jurema-preta pode estar vinculada a presença de taninos e flavonóides nessa parte da planta como descrito por Meckes-Lozoya et al. (1990). Essa atividade também foi verificada em *Staphylococcus epidermitis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* e *Acinetobacter calcoaceticus*, além de fungos como *Microsporium gypseum*, *M. canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubus* e *Chaetomium indicum* (Lozoya et al., 1989). Em extrato hidroalcoólico de jurema preta, Gonçalves et al. (2005) demonstraram que houve atividade sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*, obtendo resultados que confirmam a sensibilidade destes microrganismos ao extrato da planta.

Trabalhos posteriores realizados em 2006, pelo mesmo autor demonstraram que a jurema-preta apresentou excelente atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp coagulase negativa e outros microrganismos formando halos de inibição de 23 e 12 mm respectivamente. Em estudos utilizando extrato de *M. tenuiflora*, Heinrich et al. (1992) também verificou a sua atividade antimicrobiana sobre cepas de *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* apresentando também eficácia sobre *Proteus mirabilis* e *Shigella sonnei*.

CONCLUSÃO

O estudo da *Mimosa tenuiflora* sobre amostras de *Staphylococcus aureus* identificadas e isoladas de leite de vacas com histórico de mastite clínica ou subclínica, demonstrou que a mesma tem ação antimicrobiana, sendo, portanto uma confirmação do potencial deste extrato para a possível utilização dessa planta como indicação terapêutica.

REFERÊNCIAS

- Baird-Parker AC 1990. The *Staphylococci*: an introduction. *J Appl Bacteriol* 19: 15-85.
- Bouchot MC, Catel J, Chirol C, Ganiere JP, Menec ML 1985. Diagnostic bactériologique des infections mammaires des bovins. *Rec Med Vet* 19: 567-577.
- Caldas Pinto MS, Borges Cavalcante M A, Meira de Andrade MV. 2006. Potencial forrageiro da caatinga, fenologia, métodos de avaliação da área foliar e o efeito do déficit hídrico sobre o crescimento de plantas. *Rev Eletr Vet* 7: 1-10.
- Corrêa AD, Batista RS, Quintas LE 2001. *Plantas Medicinais: do cultivo à terapêutica*. Petrópolis: Vozes.
- Costa EO, Coutinho SD, Castilho W 1985. Sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos de bactérias isoladas de mastite bovina. *Pesq Vet Bras* 5: 65-69.

- Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol* 72: 353-358.
- Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H 2006. Efeitos antimicrobianos de algumas árvores medicinais nativas nas conjuntivites infecciosas. *Biologico* 68: 134-139.
- Heinrich MM, Kuhnt M, Wrigt CW, Rimpler H, Phillipson JD, Schandelmaier A, Warhurst DC 1992. Parasitological and microbiological evaluation of mixe indian medical plants. *J Ethnopharmacol* 36: 81-85.
- Lozoya X, Navarro V, Arnason JT, Kourany E 1989. Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir. (tepescohuite) I - Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. *Arch Invest Med* 20: 87-93.
- Mac Fadin J 1980. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de interesse clínico*. Buenos Aires. Panamericana.
- Maia GN 2004. *Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades*. São Paulo D&Z Computação Gráfica e Editora. p.237-246.
- Matos FJA 1997. *Introdução à fitoquímica experimental*. UFC Edições.
- Meckes-Lozoya M, Lozoya X, Marles RJ, Soucy Breau C, Sen A, Arnason JT 1990. N,N-Dimethyltryptamine alkaloid in *Mimosa tenuiflora* Bark (Tepescohuite). *Arch Inv Med* 2: 175-177.
- NMC 1990. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. *National Mastitis Council* 34 p.
- Neu HC 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257: 1064-1074.
- Pereira AV, Lôbo KMS, Bezerra DAC, Rodrigues OG, Athayde ACR, Mota RA, De Lima EQ, De Medeiros ES 2009a. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de jurema-preta e neem sobre amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em búfalas. *Arq Inst Biol* 76: 341-346.
- Pereira AV, Rodrigues OG, Azevêdo TKB, Bezerra DAC, De Lima EQ, Pereira MS 2009b. Perfil de extrato de plantas sobre *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. *Rev Biol Farm* 3: 1-5.
- Quinn PJJ, Carter ME, Markey B, Carter GR 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Philadelphia: Mosby, p.170-174.
- Silva MAR 2003. Influência do extrato da romã (*Punica granatum* Linn.) sobre plasmídeos nos processos de cura e transmissibilidade genética de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. *49º Congresso Brasileiro de Genética*, Gramado, RS.
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. 1997. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela, p. 295.
- WHO 1997. The medical impact of antimicrobial use in foods animals. *Report of a WHO Meeting*. Berlim, Germany. 13-17 October (WHO/EMC/ZOO/97.4).