



## Ação dos extratos de Catingueira, Favela e Nim sobre bactérias isoladas de tetos de cabras de aptidão leiteira

Cristiane R. Lucas Amorim<sup>1</sup>; Carolina Barbosa Carvalho<sup>2</sup>; Francisco Marlon Carneiro Feijó<sup>3</sup>; Jaécio Carlos Diniz<sup>4</sup>; Anna Jacinta Dantas de Medeiros<sup>1</sup>; Jéssica Nicolle Rodrigues Matias<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Mestrandas do Programa de Pós-Graduação Meio Ambiente, Tecnologia e Sociedade – UFERSA. crisribeirolucas@ufersa.edu.br; annajacinta@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Graduanda em Medicina Veterinária – UFERSA. Bolsista CNPq. carol\_pedras@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Professor adjunto do Departamento de Ciências Animais, UFERSA. marlon@ufersa.edu.br

<sup>4</sup>Professor do Departamento de Química, UERN. [jaeciocarlos@uern.br](mailto:jaeciocarlos@uern.br)

<sup>5</sup>Graduanda de licenciatura em Química – IFRN. nicollehvalo@gmail.com

**RESUMO:** O trabalho foi realizado durante o período de agosto de 2011 a junho de 2012, onde foram colhidas amostras bacterianas de tetos de cabras leiteiras em atividade com auxílio de dois suabes estéreis, sendo um para cada teto. As amostras foram semeadas em BHI a 37°C por 24 horas em aerobiose. A identificação dos microrganismos foi realizada de acordo com a citologia das bactérias, por meio da coloração de Gram e provas bioquímicas. Os antibiogramas foram realizados, em triplicata, com os extratos de Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*), Favela (*Cnidioscolus phyllacanthus*) e Nim (*Azadiracta indica*) a 3, 5 e 8%, com um controle negativo (água destilada) e dois controles positivos (iodo 2% e gentamicina), sendo utilizado a técnica difusão em ágar de poço em Müller Hinton. A análise dos dados baseou-se na comparação da média dos diâmetros dos halos estaticamente através do teste de Qui-quadrado. Foram isolados dezoito diferentes bactérias: *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, *Rhotia* spp., *Cellulomonas* spp., *Chromobacterium* sp., *Actinobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* spp., *Actinobacter* sp., *Moraxella* spp., *Aeromonas* sp., *Actinomyces* sp., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium haemolyticum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Planococcus* sp. Apresentaram-se com maior frequência *Corynebacterium* spp., *Rhotia* spp, *Cellulomonas* spp. e *C. Jeikeium* ( $p \leq 0,05$ ). Das cepas analisadas observou-se eficácia do extrato de Catingueira 8% para as bactérias *Cellulomonas* spp. e *Micrococcus* sp.; ao extrato de Favela 8%, *Staphylococcus* sp. coagulase negativa. Os resultados obtidos através da análise estatística não diferiram dos controles positivos ( $p \leq 0,05$ ). Das cepas adquiridas no estudo *in vitro* observou-se eficácia dos extratos da catingueira 8% para *Cellulomonas* spp. e *Micrococcus* sp.; e da favela 8% para *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, concluindo-se que os extratos podem ser utilizados como antissépticos naturais em cabras de aptidão leiteira.

**PALAVRAS-CHAVE:** antibiograma, *Azadiracta indica*, *Caesalpinia pyramidalis*, *Cnidioscolus phyllacanthus*, caprinocultura

### 1. INTRODUÇÃO

Há milhares de anos, diversos compostos naturais têm sido utilizados na medicina popular para o tratamento de inúmeras doenças. Até meados do século XX, os medicamentos de origem vegetal constituíam a base da terapia medicamentosa. Nos últimos anos, o interesse pelos medicamentos de origem natural voltou a crescer, acompanhado de um aumento significativo nos investimentos em pesquisa (RATES, 2001). Cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 30% são originários de plantas, isolados diretamente ou produzidos por síntese a partir de um precursor vegetal (KIRKPATRICK, 2002).

A necessidade de encontrar alternativas para o controle microbiano tem direcionado muitas pesquisas no sentido de buscar produtos que sejam eficazes, econômicos e ecologicamente viáveis. Estudos realizados com produtos naturais possuindo atividade biológica têm sido direcionados no sentido de oferecer alternativas confiáveis para o controle microbiano, principalmente a partir de produtos bioativos obtidos de plantas com propriedades terapêuticas de uso rotineiro



(ALBUQUERQUE, 2002). É verdade, também, que muitos constituintes de plantas e/ou seus derivados semi-sintéticos constituem uma parcela apreciável dos medicamentos recém-introduzidos no mercado (WILSON, 2006).

O consumo atual de medicamentos fitoterápicos pela população decorre basicamente do fato de que representam formas de terapia mais econômicas e/ou naturais que aquelas normalmente oferecidas e preconizadas pela indústria farmacêutica e a medicina alopática. Dentro desse contexto, o aumento do uso destas plantas seria de grande utilidade principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil, que possui grande biodiversidade e tem uma posição privilegiada por possuir cerca de 25% da flora mundial, apesar de que, o desenvolvimento desses medicamentos ainda é extremamente complexo, envolvendo estudos químicos, farmacológicos e clínicos.

No Nordeste brasileiro, cuja vegetação predominante é a Caatinga, muitas plantas nativas ou exóticas, são potencialmente ricas em propriedades curativas, porém pouco exploradas ainda pela ciência e, muitas vezes, o conhecimento da população sobre os produtos naturais que as rodeiam pode ajudar os pesquisadores a direcionar suas buscas por produtos que realmente apresentem efetividade contra enfermidades.

Em razão de sua importância econômica e social, de modo particular para os estados do Nordeste, a caprinocultura requer atenção cuidadosa para que possa desenvolver-se como atividade produtiva de mercado. Se a saúde não estiver bem, haverá queda na produção, comprometimento da reprodução, gastos com os animais doentes e, em alguns casos, até a morte. Considerando os aspectos sanitários na criação destes animais, a ocorrência de ectoparasitoses e verminoses, e de doenças como linfadenite caseosa, pododermatite, mastite, raiva e clostridiose, bem como os altos índices de mortalidade são fatores que limitam o desenvolvimento da atividade no Rio Grande do Norte, e em todo o Nordeste brasileiro (SILVA et al., citado por LIMA et al., 2006). Partindo do preceito do potencial das plantas da Caatinga, nativas ou exóticas, como alternativas aos antimicrobianos convencionais (ALTMANN, 2001), este trabalho tem como objetivo investigar a atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de neem (*Azadiracta indica*), catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*) e faveleira (*Cnidocolus phyllacanthus*) sobre bactérias de glândula mamária de matrizes caprinas de aptidão leiteira no assentamento de Codão de Sombra no Município de Mossoró-RN.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 LOCAL DE ESTUDO

O trabalho foi realizado durante o período de agosto de 2011 a junho de 2012, onde foram colhidas amostras bacterianas de tetos de cabras leiteiras em atividade, no assentamento Cordão de Sombra a 30km do Município de Mossoró-RN. Posteriormente, as amostras foram analisadas no Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Semi-Árido-UFERSA.

### 2.2 MATERIAL VEGETAL E PREPARO DOS EXTRATO

As folhas de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (catingueira), *Cnidocolus phyllacanthus* (faveleira) e *Azadiracta indica* (neem) foram coletadas no Centro Zoobotânico da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), no Município de Mossoró-RN, às 5h da manhã (pico de atividade metabólica), transportadas em sacos plásticos (temperatura ambiente) e, colocadas em estufa de circulação de ar (65°C) durante 72 horas. O preparo dos extratos foi realizado no Laboratório de Cromatografia da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte – UERN. Após o processo de secagem, as folhas foram trituradas em liquidificador industrial obtendo-se 800-1000g de material seco de cada espécie vegetal, as quais ficaram macerando com uma solução hidroalcoólica 70% durante 72 horas. Foram realizadas três extrações para cada material. Após esse período, procedeu-se com uma filtração á vácuo, seguida de uma filtração simples, e por último, o extrato foi levado ao Rotaevaporador (marca Fisatom, Modelo 802, rotação média de 90 rpm, com temperatura do banho-maria de 60 +/- 5°C), para a eliminação do álcool. A parte líquida restante foi evaporada em banho-



maria (45°C). O extrato final foi armazenado em recipientes adequados sob refrigeração (0 a 8°C), até o seu uso. Posteriormente o extrato foi utilizado nas seguintes concentrações: 3%, 5% e 8% de peso/volume.

### 2.3 AMOSTRAS BACTERIANAS

As cepas bacterianas foram isoladas com o auxílio de suabes estéreis, da parte lateral de cada teta (direita e esquerda) das cabras, acondicionadas em ambiente refrigerado e, encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Veterinária da UFERSA em caixa isotérmica sob refrigeração para contagem, isolamento e identificação das bactérias. As amostras dos suabes foram lavadas em 2 ml de água estéril. Foram realizadas sucessivas diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , transferindo-se 1 ml desses tubos, para tubos contendo 9 ml de água estéril. Retirou-se 1 ml de cada diluição, os quais foram distribuídos em placas de ágar Mueller Hilton, colocadas em estufa a 37°C por 24 horas para a contagem de bactérias. As bactérias que crescerem foram semeadas em BHI. Por último, procedeu-se com a citologia, por meio da coloração de Gram, e provas bioquímicas para a identificação bacteriana e acordo com a metodologia de MacFaddin (2000).

### 2.4 PREPARAÇÃO DO INÓCULO PARA TESTE “IN VITRO”

O inóculo das bactérias isoladas das tetas para teste de difusão em Ágar foi obtido cultivando-as em BHI até a fase log (crescimento exponencial), durante 18-24 horas em uma concentração de  $10^8$  ajustada pela escala de Macfarland.

### 2.5 PERFURAÇÃO DAS PLACAS PARA O TESTE “IN VITRO”

As placas foram preparadas com 20 mL de Ágar Muller-Hinton. Após 24 horas, foram preparados, asépticamente, com aparelho perfurante, cinco poços de diâmetro de 2 mm no ágar em cada placa. O ágar retirado dos poços foi descartado e os fundos dos poços foram cobertos com uma camada fina de Ágar Muller-Hinton ainda líquido (56°C) retirado de uma placa de ágar aquecida sobre o bico de Bunsen com a ajuda de uma pipeta Pasteur de vidro estéril acoplada a uma pêra de borracha pequena.

### 2.6 SEMEADURA DO MICROORGANISMOS EM PLACA DE MULLER-HINTON

Posteriormente, um suabe de algodão estéril foi mergulhado na suspensão do inóculo, apertando-o firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, de forma a retirar qualquer excesso de inóculo no suabe. Na placa de ágar Mueller-Hinton foi semeado o microorganismo friccionando o suabe em toda a superfície estéril do ágar de forma a assegurar a distribuição uniforme do inóculo.

### 2.7 APLICAÇÃO DE EXTRATOS NAS PLACAS

Em cada placa foi colocado 50 µL de iodo 2% e gentamicina (controles positivos), água destilada estéril (controle negativo), extrato de neen (*Azadiracta indica*), catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul) e favela (*Cnidocolus phyllacanthus*) distribuídos nos cinco poços. Cada microorganismo foi testado em triplicata para as concentrações de 3%, 5% e 8%. Após 24h, foi medido os halos de inibição produzidos em volta do poço com auxílio de um paquímetro. (NCCLS, 2003) adaptado de Carvalho et al (2010).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos dados baseou-se na comparação da média dos diâmetros dos halos estaticamente através do teste de Qui-quadrado. Foram isolados dezoito diferentes bactérias: *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, *Rhotia* spp., *Cellulomonas* spp., *Chromobacterium* sp., *Actinobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* spp., *Actinobacter* sp., *Moraxella* spp., *Aeromonas* sp., *Actinomyces* sp., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium haemolyticum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Planococcus* sp. Apresentaram-se com maior frequência



*Corynebacterium* spp., *Rhotia* spp, *Cellulomonas* spp. e *Corynebacterium. jeikeium* ( $p \leq 0,05$ ). Langoni et al (2006) observaram infecção em glândula mamária de caprinos causada por *Actinobacter* sp , *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., onde os dados encontrados reafirmam os patógenos encontrados neste trabalho. O gênero *Pseudomonas* sp. também foi citado por Muricy (2003) como um dos agentes de mastite, principalmente em animais que apresentam tetos molhados e propriedades com água contaminada. Buelta et al. (1999) apud Guedes (2003) afirmaram que a espécie *Proteus mirabilis* foi um dos patógenos encontrados causando mastite clínica em bovinos na região de Porciúncula, no estado do Rio de Janeiro. Os gêneros *Rhotia* sp, *Cellulomonas* sp, *Chromobacterium* sp., não foram relacionados como agentes mastíticos e a sua patogenicidade deve ser investigada. Das cepas analisadas observou-se eficácia do extrato de Catingueira 8% para as bactérias *Cellulomonas* spp. e *Micrococcus* sp.; e ao extrato de Favela 8%, *Staphylococcus* sp. coagulase negativa. Os resultados obtidos através da análise estatística não diferiram dos controles positivos ( $p \leq 0,05$ ).

Avaliando a persistência de patógenos responsáveis por infecção intramamária em cabras durante a lactação, Contreras (1997) observou que *Micrococcus* sp. são os patógenos mais frequentes, e que *Staphylococcus* sp. coagulase negativa são os responsáveis pela alta prevalência da infecção. Segundo Lima (2006), o extrato etanólico da espécie de *Caesalpinia pyramidalis* tem sido usado contra linhagens de *Escherichia coli*, (strain ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* resistentes (ATCC 25923), juntamente com o extrato de outras plantas encontradas no Brasil, como *Schinus terebinthifolius* (aroeira-mansa), *Erythrina mulungu* (mulungu), *Lafoensia pacari* (dedaleiro). Pereira et al.(2006) demonstraram que o extrato da catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*) apresentou halo de inibição superior a 14mm, frente as cepas de *E. coli* ( LM11), e de *S. aureus* (LM5), estando de acordo com dados relatados por Lima (2006). O estudo fitoquímico feito nesta espécie revelou compostos fenólicos: ácido 4-*O*- $\beta$ -glucopyranosyloxy- Z.-7-hydroxycinnamic e ácido 4-*O*- $\beta$ -glucopyranosyloxy-Z.-8-hydroxycinnamic, além do lupeol e aghatisflavone (MENDES, 2000). Por outro lado, análises espectroscópicas identificaram compostos derivados do benzociclohepteno como a favelina methyl ether, a favelina, e o deoxofavelina, extraídos da *Cnidioscolus phyllacanthus* (ENDO, 1992). Pode-se sugerir que a atividade antimicrobiana da catingueira e da favela seja devido aos compostos fenólicos e à favelina, respectivamente presentes nestas duas plantas, necessitando assim, de estudos mais aprofundados para a elucidação desta atividade pesquisada.

Tabela 1 – Média dos halos de inibição (mm) dos extratos frente aos microorganismos isolados

Microorganismos	Extratos		Controles positivos	
	Catingueira 8%	Favela 8%	Iodo	Gentamicina
<i>Cellulomonas</i> spp	11,67+0,57a	-	18,33+1,52a	18,00+1,73a
<i>Micrococcus</i> sp	10,00+0,0b	-	19,33+1,52ab	22,33+1,52a
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativa	-	9,33+1,15a	13,67+3,21a	19,67+0,57a

#### 4. CONCLUSÕES

O extrato de Catingueira foi eficiente para *Cellulomonas* spp. e *Micrococcus* sp.; e o extrato da Favela, para *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, concluindo-se que, ambos na concentração 8%, podem ser utilizados como antissépticos naturais em cabras de aptidão leiteira.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. **Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do Agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil)**. Interciência, v.27, n.7, p. 1-20. 2002.



ALTMANN K. H. **Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs.** *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5; p.424-31, 2001.

BUELTA, T.T.M., ALMEIDA, A.C., FONSECA, Y.M., SILVA, D.B., COUTO, R.L, GIESEL, T. **Perfil microbiológico de matites clínicas em bovinos no Município de Alfenas, MG.** In: III ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 1999, Botucatu. Anais... Botucatu : FMVZ/UNESP, 1999,172 p. p. 165.

CARVALHO, C.B ; FEIJÓ, F. M. C. ; TOMAZ, K. L. R. ; ALVES,N.D; AMORA, S.S.A. **Utilização do extrato de nim (azadirachata indica) e própolis em micro-organismos isolados de cães (canis familiares) com otite.** In: XVI seminário de iniciação científica 2009/2010, 2010, Mossoró.

CONTRERAS, A.; CORRALES, J. C.; SANCHEZ, A.; SIERRA, D. **Persistence of Subclinical Intramammary Pathogens in Goats Throughout Lactation.** *Journal of Dairy Science*. v.80; p.2815–2819, 1997

ENDO, Y.; OHTA, T.; NOZOE, S. **Neofavelanone, a novel tetracyclic cyclobutene derivative from the brasilian plant, Cnidocolus phyllacanthus.** *Tetrahedron Letters*, Elmsford, v. 33, n. 3, p.353-356, 1992.

KIRKPATRICK, P. **Antibacterial drugs: stitching together naturally.** *Nature Reviews Drug Discovery*. v.1, p.178. 2002.

Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. Langoni, H.; Domingues, P. F.; Baldini, S. *Revista Brasileira e Ciência Veterinária*. v. 13, n. 1, p. 51-54, jan./abr. 2006

LIMA, G.F.C; JUNIOR, E.V.H; MACIEL, F.C; BARROS, N.N; AMORIM, M.V; JUNIOR, A.A.C. **Criação familiar de caprinos e ovinos no Rio Grande do Norte: orientações para viabilização do negócio rural.** Embrapa Caprinos, 2006, 426 p.

LIMA, M.R.F., LUNA, J.S., SANTOS, A.F. **Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants.** *Journal of Ethnopharmacology*. v. 105, p. 137–147, 2006.

MACFADDIN, J. F. Et al. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** 3 rd ed. Philadelphia: Lawrence McGrew, Lippincot Williams & Wilkins, 2000. 901 p.

MENDES, C. C.; BAHIA, M. V.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*.** *Fitoterapia*. v. 71, p.205-207, 2000.

Muricy, R. F. Ocorrência de mastite subclínica em caprinos e qualidade higiênico-sanitária do leite produzido em propriedades associadas à cooperativas Languiru, Teutônia-RS. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2003.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests;** Approved Standar. Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940. West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

PEREIRA, M. S. V.; RODRIGUES, O. G.; FEIJÓ, F. M. C.; ATHAYDE, A. C.; LIMA, E. Q.; SOUSA, M. R. Q. **Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no Semi-Árido Paraibano.**



**Agropecuária Científica no Semi-árido**, Patos, v.2, n.1, p. 37-43, Set – Dez, 2006.

RATES, S.M.K. **Plants as source of drugs**. *Toxicol.* v. 39, p. 603-613. 2001. Disponível em: <[www.farmacognosia.ufpr.br/pdf/rates\\_plants](http://www.farmacognosia.ufpr.br/pdf/rates_plants)>. Acesso em: 23 nov. 2011.

WILSON R. M; DANISHEFSKY, S. J. **Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: the synthesis connection**. *Journal of Organic Chemistry*. Oct v. 71; n. 22; p.8329-51, 2006.