



Avaliação da atividade antimicrobiana das plantas *Spondias purpurea L.*, *Spondias mombin L.*, e *Azadirachta indica A.* sobre cepas isoladas de caprinos com aptidão leiteira

Anna Jacinta Dantas de Medeiros¹, Francisco Marlon Carneiro Feijó², Caio Sérgio Santos³, Frederico Silva Thé Pontes⁴, Cristiane Ribeiro Lucas⁵, Dayan Deceseri de Moura Bezerra de Melo⁶

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade – UFERSA. Professora do IFRN. email: anna.medeiros@ifrn.edu.br

²Doutor em Ciências Biológicas – UFPE. Professor da UFERSA. email: marlon@ufersa.edu.br

³Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade – UFERSA. email:caiosergio14@hotmail.com

⁴Doutor em Economia Aplicada – UFV. Professor da UFERSA. email: Frederico@ufersa.edu.br

⁵Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade – UFERSA. email:crisribeirilucas@gmail.com

⁶Graduando em Química – IFRN. email: dayan_decieseri@hotmail.com

Resumo: Pretendeu-se com esse trabalho pesquisar a ação antimicrobiana *in vitro* dos extratos das folhas de *Spondias purpurea L.* (cirigueleira), *Spondias mombin L.* (cajá) e *Azadirachta indica A.* (nim) sobre cepas bacterianas isoladas de caprinos. A metodologia consistiu em preparar extratos a 1%, 2% e 3% de p/v das referidas plantas e em seguida, realizar o teste de sensibilidade aos extratos por difusão em ágar baseados na metodologia do Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão, tendo como controle positivo o iodo e o controle negativo a água destilada estéril. De acordo com os resultados obtidos, a microbiota bacteriana encontrada nas coletas foi a seguinte: *Bacillus megaterium*, *Bacillus sp.*, *Corynebactérias*, *Enterobactersp.*, *Cellulomonas sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* e *Staphylococcus coagulase* negativa. A espécie mais comumente identificada foi *S. coagulase* negativa, a qual é um dos principais causadores da mastite. Dentre os extratos estudados, o cajá apresentou atividade, formando halo de inibição sobre todas as amostras bacterianas e apresentando melhor ação sobre a *S. coagulase* negativa (15, 18 e 20 mm), *S. aureus* (14, 15 e 20 mm) e *Streptococcus sp.* (18, 19 e 20 mm) respectivamente a 1%, 2% e 3% ($p < 0.05$). Esses dados reafirmam a ação antimicrobiana do cajá. Quanto a ação dos extratos das folhas Nim e Ciriguela, houve ausência de inibição dos mesmos sobre as cepas bacterianas. Conclui-se que a bactéria encontrada em maior quantidade nas amostras foi o *S. coagulase* negativa e que o extrato de cajá apresentou atividade inibitória, principalmente sobre o *S. coagulase* negativa, *S. aureus* e o *Streptococcus sp.*

Palavras-chave: atividade antibacteriana, *Azadirachta indica A.*, caprinocultura, *Spondias mombin L.*, *Spondias purpurea L.*

1. INTRODUÇÃO

Cada vez mais as plantas estão sendo pesquisadas cada vez mais no intuito de avaliar suas atividades farmacológicas, como por exemplo, para a obtenção de novas substâncias antimicrobianas, devido ao surgimento de cepas resistentes aos diversos tipos de antimicrobianos. Paralelamente ao conhecimento científico, a história nos mostra que ao longo dos anos, as plantas foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados.

Entre as aplicabilidades das plantas, está o seu uso na caprinocultura como antisséptico, uma vez que essa atividade é severamente afetada por inúmeros fatores, entre eles, a alta incidência de problemas de origem sanitários, o que interfere de sobremaneira na produtividade



do rebanho, ocasionando sérios prejuízos aos produtores, chegando a inviabilizar essa atividade pecuária. (ALENCAR et al., 2010).

Como exemplos de plantas encontradas no Semiárido brasileiro, temos o nim, a cajazeira e a ciriguela. De acordo com Neves et al., (2003), o nim é uma árvore indiana muito usada no controle biológico de pragas que apresenta ação anti-séptico, antimicrobiana, sobre os distúrbios urinários, diarreias e doenças do couro cabeludo. Já o extrato das suas folhas e casca da ciriguela é utilizado como antipirético e antidiarréico, além do tratamento de infecções na gengiva, erupções cutâneas e sarampo (BRITO, 2010). Quanto a cajazeira, Jain et al. (2005) insere que o chá de suas folhas vem sendo utilizado há bastante tempo, por suas propriedades anti-virótica. Isolados das folhas e talos desta espécie demonstraram atividade pronunciada contra os vírus Herpes simples tipo 1 e Cocksackie B2, e atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes* e *Mycobacterium fortuitum*.

Diante desse quadro, pretende-se com esse trabalho pesquisar a ação dos extratos das folhas de *Spondias purpurea* L.(ciriguelira), *Spondias mombin* L. (cajá) e *Azadirachta indica* A. (nim) na prevenção e no controle de enfermidades transmissíveis em saúde e produção animal, especificadamente na caprinocultura, e assim contribuir para a otimização das condições higiênica sanitárias das propriedades rurais em estudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do material vegetal e extratos

As folhas das plantas *Spondias purpurea* L., *Spondias mombin* L. e *Azadirachta indica* A. foram coletadas, às 05 horas da manhã, no município de Mossoró, Rio Grande do Norte no Centro Zoobotânico no Campus Central da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA. Em seguida, foram levadas a estufa para secagem a uma temperatura de 60⁰ C por 72 horas. As amostras vegetais secas foram trituradas em liquidificador industrial. Posteriormente, foram pesadas e acondicionadas em garrafas de vidro cor âmbar, misturadas a uma solução hidroetanólica a 70% suficiente para cobrir a amostra vegetal por um período de 72 horas. Para cada planta foram realizadas três extrações. As extrações iniciaram com uma filtração á vácuo, seguida por uma filtração simples e por último o extrato foi colocado no Rotaevaporador de Marca Fisatom, Modelo 802, rotação média de 90 rmp, com o banho-maria a uma temperatura de 60 +/- 5°C, para a eliminação do álcool. A parte líquida restante foi evaporada em banho-maria, em uma temperatura média de 45° C. O extrato resultante foi estocado em recipientes adequados e em ambiente refrigerado com uma temperatura compreendida entre 0 a 8°C, até seu uso.

Posteriormente os extratos foram produzidos nas seguintes concentrações: 1%, 2% e 3% de p/v, utilizando-se como referência MacFaddin (2000) para os cálculos de elaboração dos extratos nas concentrações em porcentagem de peso/volume ou grama/100mL. A fórmula utilizada:

$$\text{Gramas de soluto} = \frac{\%(\text{p/v}) \times \text{volume}}{100\text{mL}}$$



, onde:

Gramas de soluto = peso do extrato seco,

%(p/v) = valor da concentração pré-estabelecida

volume = quantidade em mL do solvente necessária para dissolver o soluto a determinada concentração.

Obtenção das amostras microbianas

As amostras microbianas foram coletadas de tetas e leite caprinos, no assentamento Independência que situa-se a 12 km de Mossoró-RN, na BR 403. As cepas foram semeadas em Ágar Sangue desfibrinado de carneiro a 5%, e em Ágar MacConkey. Após 24 horas foram semeadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), com auxílio de alça de platina, e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante, no mínimo, 24 horas. Em seguida, foram identificadas por meio de citologia e provas bioquímicas.

Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos

Para a determinação da atividade antibacteriana “in vitro” dos extratos vegetais, o inóculo padrão para teste de difusão em Ágar foi obtido cultivando esses microorganismos em BHI até a fase log (crescimento exponencial), durante 18-24 horas.

A metodologia do teste de sensibilidade aos extratos por difusão em ágar foi baseada na metodologia do Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão descrito pelo NCCLS (2003), adaptado de acordo com Carvalho et al. (2010).

Inicialmente, placas com ágar Muller-Hinton foram preparadas com volumes de 20 mL de Ágar por placa. Após 24 horas, foram preparados, assepticamente, 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.

Feito os poços, foi mergulhado um suabe de algodão estéril na suspensão do inóculo o qual foi girado várias vezes, 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 Müller-Hinton foi inoculado o microorganismo esfregando o suabe em toda a superfície estéril do ágar de forma a assegurar a distribuição uniforme do inóculo.

Em seguida, em cada placa, foram colocados 50 µL de Iodo, água destilada estéril, extrato de cajá, extrato de ciriguela e extrato de nim, distribuídos nos cinco poços. O Iodo foi usado como controle positivo e a água destilada estéril como controle negativo. Cada microorganismo foi testado em duplicata para as concentrações de 1%, 2% e 3%. Após 24h, foram medidos os halos de inibição produzidos em volta do poço.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação às bactérias isoladas nos tetos e leite caprino, foram encontrados os seguintes microorganismos: *Staphylococcus* coagulase negativa, *Cellulomonas* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* sp. , bactérias do grupo das corineformes, *Streptococcus* sp, *Enterobacter* sp e o *Bacillus megaterium* (Tabela 01). Sendo o *Staphylococcus* coagulase negativa encontrado em maior quantidade, 39 (47,56%) das cepas.



Tabela 01 – Determinação do número e porcentagem de bactérias isoladas de tetos e leite caprino.

BACTÉRIAS	QUANTIDADE	%
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	39	47,56
<i>Cellulomonas sp.</i>	16	19,51
<i>Bacillus sp.</i>	10	12,20
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	9,76
<i>Streptococcus sp.</i>	2	2,44
<i>Enterobacter sp.</i>	2	2,44
<i>Corynebacterium sp.</i>	2	2,44
Corineformes	2	2,44
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1,22
TOTAL	82	100

Esses dados são justificados pelos resultados de Correa et al. (2010) que isolou 37 (27,2%) amostras de *Staphylococcus coagulase negativa*, o principal agente da mastite subclínica, tanto no Brasil, como em outros países e ainda de acordo com Prestes et al. (2002), os patógenos de maior importância no desenvolvimento da mastite são os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactia* e *Escherichia coli*.

Quanto aos resultados do teste de difusão em ágar para os extratos das folhas de de *Spondias purpurea* L.(cirigueleira), *Spondias mombin* L. (cajá) e *Azadirachta indica* A. (nim) , iodo a 1% - controles positivo -, água destilada estéril - controle negativo, estão apresentados na Tabela 02. Os dados demonstram a ausência de inibição por parte dos extratos de nim e ciriguela nas concentrações usadas (1%, 2% e 3%).

Tabela 02 – Diâmetro dos halos de inibição dos extratos das folhas de Nim, Cajazeira e Ciriguela nas concentrações de 1, 2 e 3% frente às bactérias isoladas em caprinos.

BACTÉRIA	NIM (%)			CAJAZEIRA (%)			CIRIGUELA (%)			IODO A 1%	ÁGUA DESTILADA
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	15 ^b	18 ^b	20 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	45 ^c	0 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	14 ^b	15 ^b	20 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	50 ^c	0 ^a
<i>Bacillus sp</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	6 ^b	8 ^b	12 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	45 ^c	0 ^a
<i>Cellulomonas sp.</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	13 ^b	15 ^b	18 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	50 ^c	0 ^a
<i>Enterobacter sp</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	5 ^b	7 ^b	9 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	50 ^c	0 ^a
<i>Corynebacterium sp</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	8 ^b	9 ^b	11 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	55 ^c	0 ^a
<i>Streptococcus sp</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	18 ^b	19 ^b	20 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	54 ^c	0 ^a

Letras diferentes comparam o efeito dos extratos sobre diferentes tipos de bactérias e representa significância estatística pelo Teste do Qui-quadrado para $p < 0,05$.

Os resultados obtidos quanto ao teste de sensibilidade, utilizando-se dos extratos de nim, discordam daqueles encontrados por Pereira et al. (2009), onde os extratos etanólicos de *Azadirachta indica* A. Juss na concentração de 1/1 foi efetivo contra *Staphylococcus sp.* e também discordando do trabalho realizado por Alves et al. (2009), no qual os extratos hidroalcoólicos de folhas de nim a 70% e 80% (v/v) de etanol 96% apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*.



Quanto a ciriguela, Brito (2010) detectou o a-humuleno, o qual apresenta importante ação antimicrobiana. Os resultados deste trabalho discordam de Brito (2010) quanto à ausência de inibição antimicrobiana dos extratos etanólicos de ciriguela a 1, 2 e 3%.

Os extratos da cajazeira demonstraram inibição nas concentrações utilizadas (1%, 2% e 3%) diante todos os tipos bacterianos testados. Os halos de inibição originados pelo iodo foram significativamente maiores do que os halos originados pelo extrato de cajazeira, independente da concentração utilizada, frente às diferentes bactérias isoladas de propriedade criadoras de caprinos. Não houve diferenças significativas dos tamanhos dos halos de inibição entre as três concentrações (1%, 2% e 3%) de extratos de Cajazeira testadas. Houve uma maior inibição dos cocos, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. Os bacilos restantes apresentaram halos de menor inibição. Nota-se, na maioria dos testes, uma relação crescente e proporcional entre o tamanho do halo e a concentração.

Abo et al. (1999) estudaram a ação dos extratos metanólicos de folhas e da casca do caule da cajazeira nas concentrações de 100mg/mL, 50mg/mL e 25mg/mL contra diversos microorganismos. Estes dados corroboram com os resultados demonstrados neste trabalho, quando identificaram em seus estudos que a atividade antibacteriana dos extratos de folhas de Cajazeira contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella dysenteriae* foi mais ativa que a atividade da gentamicina a 10mg/mL; enquanto a ação dos extratos da casca do caule contra *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram muito semelhante a da gentamicina.

4. CONCLUSÕES

O estudo da atividade antibacteriana dos extratos vegetais demonstra que para os microorganismos testados, o extrato do cajá, em todas as concentrações testadas, apresentou ação inibitória sobre as todas as cepas analisadas, principalmente sobre *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. Entretanto, não foi observada a ação inibitória nos extratos da ciriguela e do nim. Sugerem-se estudos complementares para confirmar a eficácia do extrato de cajá e sua utilização para a prevenção e tratamento das doenças relacionadas à caprinocultura.

5. REFERÊNCIAS

ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S.; Antimicrobial potential of *Spondias mombin* *Croton Zambesicus* and *Zygotritonia Crocea*. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 494–497, 1999.

ALENCAR, S.P.; MOTA, R.A.; COELHO, M.C.O.C; NASCIMENTO, S.A.; ABREU. S.R.O; CASTRO, R.S. Perfil sanitário dos rebanhos de caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, nº. 1, 2010.

ALVES, P.D et al. Chromatographic evaluation and antimicrobial activity of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) leaves hydroalcoholic extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 510-515, 2009.

BRITO, H. R. **CHARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Spondias mombin* L., *Spondias purpurea* L. e *Spondias* sp (cajarana do sertão)**. 2010. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – UFCG, Patos, 2010.



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 microorganismos isolados de cães (*canis familiares*) com otite. In: **XVI seminário de iniciação científica 2009/2010**, 2010, Mossoró. XVI seminário de iniciação científica 2009/2010, 2010.

CORREA, C.M.; MICHAELSON, R.; RIBEIRO, M.E.R.; PINTO, A.T.; ZANELA, M.B.; SCHIMIDT, V. 2010. Composição do leite e diagnóstico de mastite em caprinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.38, n. 3, p. 273-278, 2010.

JAIN, S.C. et al. Synthesis of novel non-isoprenoid phenolic acids and 3-alkylpyridines. **Pure Applied Chemistry**, v. 77, p. 185–193, 2005.

MACFADIN, J.F.. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria** . Baltimore , USA : Willians & Wilkins Company, 2000,480 p.

NCCLS. 2003. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement M100-S11. NCCLS, Wayne, Pa.

NEVES, B. P.; OLIVEIRA, I. P.; NOGUEIRA, J. C. M. **Cultivo e utilização do Nim indiano**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2003. 12 p. (EMBRAPA Arroz e Feijão. Circular Técnica 62)

PEREIRA, M S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 572-577, 2007.

PRESTES, D.S; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que influenciam – uma revisão. **Revista da FZVA Uruguaiana**. v..9, n.1, p. 118 – 132, 2002.