



Resumo Expandido

Título da Pesquisa (Português): Triagem da ação antimicrobiana da associação de extratos de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Barbatimão), <i>Baccharis trimera</i> (Carqueja) e óleo de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina.		
Título da Pesquisa (Inglês): Screening of antimicrobial action of association of extracts <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Barbatimão), <i>Baccharis trimera</i> (gorse) and <i>Azadirachta indica</i> oil (Neem) against <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from bovine mastitis.		
Palavras-chave: Fitoterápico, sinergismo, pré e pós dipping		
Keywords: Synergism, phytotherapeutic, pre and post dipping		
Campus: Bambuí	Tipo de Bolsa: Pesquisa Aplicada	Financiador: IFMG
Bolsista(s): Gian Carlos Nascimento, Laís Cristine Costa, Carlos Otávio Gonçalves de Moraes, André Cardoso Roscoe		
Professor Orientador: Rafael Bastos Teixeira		
Área de Conhecimento: Saúde Animal, Qualidade do leite.		Editais: 051/2014

Resumo: Objetivou-se fazer uma triagem da ação antimicrobiana das associações de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), *Baccharis trimera* (Carqueja) e óleo de *Azadirachta indica* (Neem) frente a *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. O barbatimão e a carqueja foram coletados em Bambuí-MG/Brasil. O óleo de neem foi adquirido comercialmente com 100% de pureza. O extrato de barbatimão foi feito por maceração da casca em etanol P.A. e o extrato de carqueja, da parte aérea da planta por decocção. Estes extratos foram submetidos a total secagem. Oxacilina e DMSO foram os controles positivos e negativos, respectivamente. Foram obtidos 64 produtos de diferentes dosagens provenientes dos extratos secos de Barbatimão e Carqueja, além do óleo de Neem. A amostra de *S. aureus* isolada de animais com mastite bovina faz parte da coleção de microorganismos da Embrapa Gado de Leite onde foram realizados os testes microbiológicos. Foi utilizado o método de difusão em poços em ágar, segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute. Foram aplicadas análises não paramétricas pelo teste de Kruskal-Wallis e o de comparações múltiplas de Dunn. O ponto ótimo referente a interação entre as concentrações dos extratos foi determinado por superfície de resposta com o uso do programa STATISTIC 6.0. Das associações, 16 foram totalmente ineficientes sobre *S. aureus*, e 23 apresentaram halos pouco expressivos na inibição do crescimento bacteriano. Contudo, 25 associações causaram halos de inibição consideráveis. O ponto ótimo da ação inibitória foi alcançado através da associação em que predominou o extrato de barbatimão e traços de extrato de carqueja e óleo de neem.

Abstract: The objective was to make a screening of antimicrobial action of *Stryphnodendron* extracts associations *adstringens* (Barbatimão), *Baccharis trimera* (gorse) and *Azadirachta indica* oil (Neem) against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. The barbatimão and gorse were collected in Bambuí, MG / Brazil. The neem oil was commercially available with 100% purity. The barbatimão extract was made by steeping the bark in PA ethanol and the broom extract, the area of the plant decoction. These extracts were subjected to dry completely. Oxacillin and DMSO were positive and negative controls, respectively. 64 products of different strengths were obtained from the dried extracts Barbatimão and Broom, besides the neem oil. The sample of *S. aureus* isolated from animals with bovine mastitis is part of the collection of microorganisms of Embrapa Dairy Cattle where the microbiological tests were performed. The method of diffusion in agar wells was used, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute. Nonparametric analyzes were applied by the Kruskal-Wallis test and the multiple comparison Dunn. The great point regarding the interaction between the concentrations of the extracts was determined by response surface using the STATISTIC 6.0. Associations, 16 were totally ineffective against *S. aureus*, and 23 showed little significant

halos in inhibiting bacterial growth. However, associations 25 caused significant inhibition halos. The optimum inhibitory action was achieved by association in which the predominant barbatimão extract and broom extract features and neem oil.

INTRODUÇÃO: A inflamação da glândula mamária de vacas, “mastite”, ocasionada principalmente por microorganismos do gênero *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp* e *Corinebacterium sp*. é um dos fatores responsáveis pela perda de qualidade do leite (Schmidt, 2015). Estes agentes colonizam o canal do teto das vacas e propicia o aparecimento da doença. Segundo Zschöck, (2011), a mastite provoca uma série de alterações físico-químicas no leite, dentre as quais destacamos a diminuição no extrato seco total.

Com intuito de minimizar a incidência de mastite nos rebanhos leiteiros e conseqüentemente, reduzir a contagem de células somáticas (CCS), que são células de defesa do organismo (neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos) e também células epiteliais de descamação da glândula mamária, práticas de manejo de ordenha são realizadas diariamente, como por exemplo, a utilização de pré e pós dipping (Fox, 1992; Suranindyah et al, 2015). O pré dipping consiste na desinfecção dos tetos antes da ordenha e visa reduzir o número de bactérias neste local que possam contaminar o leite. O pós-dipping é fundamental para remover a película de leite que permanece no teto após a retirada do conjunto de ordenha e auxilia na prevenção de infecções neste canal. (ZSCHÖCK et al., 2011).

As plantas *Stryphnodendron adstringens*, *Baccharis trimera* e *Azadirachta indica* são plantas com reconhecida ação antimicrobianas (Costa, 2011; Santos, 2012; Sairan, 2000; Elumala, 2015; Avancini, 2000). Visando o desenvolvimento de um produto tecnológico para o controle da mastite bovina a partir da associação de seus extratos, objetivou-se fazer uma triagem da ação antimicrobiana destas associações frente a *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.

METODOLOGIA: A casca do Barbatimão e a parte aérea da Carqueja foram coletadas na cidade de Bambuí-MG com elaboração dos extratos no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O extrato bruto de barbatimão (EBB) foi obtido do processo de maceração estática, utilizando etanol P.A. de acordo com Costa, (2011) e, o extrato bruto de carqueja (EBC) foi obtido da parte aérea da planta pelo processo de decocção por 15mn conforme a metodologia proposta pela Farmacopéia, (1959). O óleo de Neem (OLN) foi adquirido comercialmente, sendo este extraído por maceração a frio com 100% de pureza. A partir destes materiais foram produzidos os extratos secos das plantas de barbatimão (ESB) e de carqueja (ESC) através dos processos de rotoevaporação e liofilização, respectivamente.

Com intuito de avaliar as diferentes combinações entre as plantas, foram obtidos 64 produtos de diferentes dosagens provenientes dos extratos secos, além do óleo de neem. As dosagens utilizadas de ESB (0, 25, 50 e 75mg/mL), de ESC (12,5, 25, 37,5 mg/mL) e de OLN foram definidas de acordo com as concentrações inibitórias mínimas propostas por Costa, (2011); Santos, (2012); Sairan, (2000); Elumala, (2015); Avancini, (2000). A Oxacilina na concentração de 2mg/mL e o Dimetilsulfóxido (DMSO) foram os controles positivos e negativos, respectivamente.

Em uma segunda etapa estes produtos foram avaliados em relação à inibição do crescimento de *S. aureus* isolado de mastite bovina. A amostra de *S. aureus* isolada de mastite bovina faz parte da coleção de microorganismos da Embrapa Gado de Leite onde foram realizados os testes microbiológicos. Foi utilizado o método de difusão em poços em ágar, segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

Os dados não apresentaram distribuição normal conforme verificado por meio do teste Shapiro-Wilk.

Assim, foram aplicadas análises não paramétricas pelo teste de Kruskal-Wallis e o de comparações múltiplas de Dunn. O ponto ótimo da concentração dos extratos foi determinado por superfície de resposta com o uso do programa STATISTIC 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÕES: Entre as 64 associações, 16 foram totalmente ineficientes sobre *S. aureus*, não apresentando halo de inibição e, 23 combinações apresentaram halos pouco expressivos na inibição do crescimento da bactéria em estudo, em torno de 10 mm. Contudo, 25 associações causaram halos de inibição expressivo, em torno de 17 mm. Estes resultados são equivalentes a 81,61% do halo de inibição provocado pelo controle positivo, o antibiótico Oxacilina, que apresentou um halo de inibição de 21 mm. Os resultados encontrados corroboram com os obtidos por Costa, (2011) e Avancini, (2000). Entretanto, Sairan et al, (2000) em um estudo encontrou resultados divergentes dos levantados neste experimento. Os autores observaram uma concentração inibitória mínima de 4,5 mg/mL de óleo de Neem sobre *S. aureus*. O ponto ótimo da ação inibitória do crescimento do isolado de *S. aureus* foi alcançado através da associação em que predominou o extrato de barbatimão e traços de extrato de carqueja e óleo de nem (Figura-1).

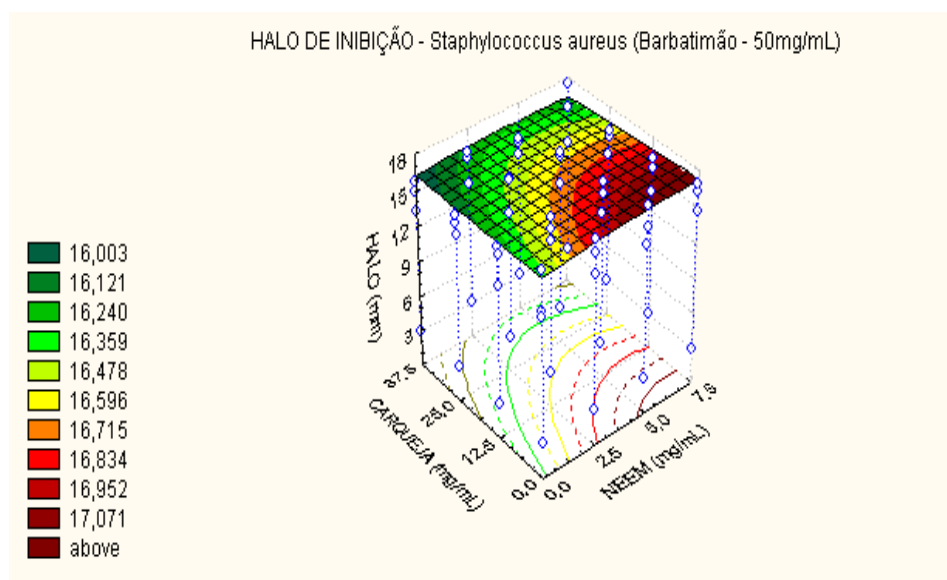


Figura – 1. Superfície de resposta para halo de inibição expressos em (mm) da associação de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), *Baccharis trimera* (Carqueja) e óleo de *Azadirachta indica* (Neem) frente a *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.

Vale ressaltar que todas as associações foram realizadas a partir de extratos sem nenhum tipo de fracionamento, sendo este efeito relevante em se tratando de extratos brutos. O fracionamento do extrato bruto em substâncias com alta atividades biológicas propicia consequentemente uma concentrações inibitória mínima menor, com maior ação bactericida e bacteriostática (KHANAM, 2015).

A planta de Barbatimão encontrada em todo o cerrado brasileiro possui elevados teores de taninos condensados, sendo este, os responsáveis pelas atividades farmacológicas (Lopes et al, 2005). Os compostos do metabolismo secundário vegetal ou metabolismo especial apresentam um amplo valor nas interações entre a planta e seu ecossistema exercendo caráter antimicrobiano (SANT'ANA, 2002). Os taninos propiciam um efeito antimicrobiano por precipitar proteínas. Esta ação destaca-se pela inibição de enzimas,

modificação do metabolismo celular pela atuação nas membranas e por complexar íons metálicos com consequente diminuição da sua disponibilidade para o metabolismo dos microorganismos (MELLO & SANTOS, 2002).

CONCLUSÕES: Estes resultados incentivam nosso grupo de pesquisa a realizar testes de estabilidade que são importantes para o desenvolvimento de um produto tecnicamente viável, bem como testes *in vivo* em vistas de uma aplicabilidade prática para o produtor de leite na forma de pré e pós dipping.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA: AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.52 n.3 Belo Horizonte Junho. 2000.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**, Ed. Acribia, SA: Espanha, 1991.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (Formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 2012. Informational Supplement, 15.

COSTA, J.P.R.; ERNANE, AC. C. A. RODRIGUES, RM M. M. N.; SANTOS, C. A.; MENEZES, I. R. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. **Revista Biotemas**, 24 (4): 1-6, dezembro de 2011 ISSN 2175-7925

ELUMALAI, K.; VELMURUGAN, S. Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of *Azadirachta indica* (L.). **Applied Surface Science** Volume 345, 1 August 2015, Pages 329–336.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

FOX, L. K. Colonization by *Staphylococcus aureus* on Chapped Teat Skin: Effect of Iodine and Chlorhexidine Postmilking Disinfectants. **Journal of Dairy Science**, Volume 75, Issue 1, January 1992, Pages 66–71.

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

KHANAM, Z.; WEN, C. S.; BHAT, I. U. H. Phytochemical screening and antimicrobial activity of root and stem extracts of wild *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali). **Journal of King Saud University**. Science Volume 27, Issue 1, January 2015, Pages 23–30.

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

MELLO, C. P. de.; SANTOS, S. da C. **Taninos**. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões et al. 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universitária / UFRGS / Ed. da UFSC, 2002. 950 p.

SAIRAM, M.; ILAVAZHAGAN, G.; SHARMA, S.K.; DHANRAJ, .; SURESH, B.; PARIDA, M.M.; JANA, A.M. DEVENDRA, K.; SELVAMURTHY, W. Anti-microbial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). **Journal of Ethnopharmacology**, Volume 71, Issue 3, August 2000, Pages 377–382.

SANT'ANA, A. E. G. **Em Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil**; Araújo, E. L.; Moura, A. N.; Sampaio, E. S. B.; Gestinari, L. M. S.; Carneiro, J. M. T., eds.; Imprensa Universitária: UFRPE, Recife, 2002.

SANTOS, S.J.D.; ALVES, F. Análise comparativa da ação de extratos de plantas com atividade antimicrobiana (in vitro) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. **RBAC**, v.02, n.04, Belo Horizonte, MG, Dez de 2012.

SCHMIDT, T.;KOCK, M.M.; EHLERS, M.M. Diversity and antimicrobial susceptibility profiling of staphylococci isolated from bovine mastitis cases and close human contacts. **Journal of Dairy Science** Volume 98, Issue 9, September 2015, Pages 6256–6269.

SURANINDYAH, Y.; WAHYUNI, E.; BINTARA, S.; PURBAYA, G. The Effect of Improving Sanitation Prior to Milking on Milk Quality of Dairy Cow in Farmer Group. **Procedia Food Science** Volume 3, 2015, Pages 150–155

ZSCHÖCK, M.; EL-SAYED, A.; EISSA, M.; LÄMMLER, C., CASTAÑEDAVAZQUEZ, H. Resistencia a penicilina G y oxacilina, de cepas de **Staphylococcus aureus** aisladas de mastitis bovina subclínica. **Veterinária México, Coyoacán**, v. 42, n. 3, p. 207-217, 2011

Participação em Congressos, publicações e/ou pedidos de proteção intelectual:

XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia, Zootec 2015.. 2015. (Congresso).

Simpósio de Genética e Melhoramento.Zootec, 2015.. 2015. (Simpósio).

51º Anual Meeting of the Brazilian Society os Animal Science. 2014. (Congresso).

XXIV Congresso Brasileiro de Zootecnia. 2014. (Congresso).

IX Congresso Nordestino de Produção Animal. 2014. (Congresso).

1º Seminário em Equideocultura. 2014. (Seminário).III Seminário de Iniciação Científica. 2014. (Seminário).

IV SIMLEITES - Simpósio Capixaba sobre Bovinocultura de Leite.Zootec, 2014.. 2014. (Simpósio).

VI Dia do Suíno. 2014. (Encontro).

II Fórum de Estudantes de Zootecnia do Nordeste.A importância do movimento estudantil dentro e fora das universidades.. 2014. (Encontro).

II Fórum de Estudantes de Zootecnia do Nordeste.Pilares que sustentam as universidades: Ensino X Pesquisa X Extensão.. 2014. (Encontro).

XXIII Congresso Brasileiro de Zootecnia. 2013. (Congresso).VIII Congresso Nordestino de Produção Animal. 2013. (Congresso). VI Jornada Científica do IFMG campus Bambuí. 2013. (Seminário). IV Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira e II International Symposium os Dairy Cattle. 2013. (Simpósio).

Simpósio Zootecnia do Futuro - Produção Animal Sustentável.Zootec, Zootec, 2013.. (Simpósio).

V Encontro sobre Nutrição Animal do Centro Oeste Mineiro. 2013. (Encontro).

V Dia do Suíno. 2013. (Encontro). Workshop de Equideocultura, Zootec 2013.. 2013. (Outra).

Pinheiro ; NASCIMENTO, G. C. ; TEIXEIRA, R. B. . **Leite de Qualidade sem Agressão a Saúde Pública**. Revista V e Z em Minas., Revista, p. 51 - 53, 18 fev. 2013.

NASCIMENTO, G. C. ; BOLIBNA, J. A. A. ; CARVALHO, T.C.R. ; CEACERO, T. M. ; NORONHA, C. M. S. ; PACIULLI, S. O. D. . **Correlação entre a avaliação de escore de esfínter de teto e contagem de células somáticas do leite em cavas em lactação**.. In: VII Congresso Nordestino de Produção Animal, 2013, Fortaleza. Anais do VIII Congresso Nordestino de Produção Animal, 2013.

NASCIMENTO, G. C. ; BOLIBNA, J. A. A. ; CUNHA, R. O. ; RODRIGUES, R. F. M. ; COURA, R. A. N. ; OLIVEIRA, M. R. ; CARVALHO, T.C.R. ; TEIXEIRA, R. B. . **Composição do leite utilizando diferentes sanitizantes no manejo pré e pós dipping em vacas leiteira**.. In: VI Jornada Científica do IFMG - campus Bambuí, 2013, Bambuí. Anais da VI Jornada Científica do IFMG - campus Bambuí. Bambuí, 2013.

NASCIMENTO, G. C. ; CORDEIRO NETO, J. A. ; ALVES, J. S. ; COURA, R. A. N. ; Pinheiro ; TEIXEIRA, R. B. . **Efeito de solução fitoterápica à base de olho de Nim (Azadirachta Indica) como sanitizante no pré e.e pós dipping sobre a contagem de célula somática do leite**. In: VIII Congresso Nordestino de Produção Animal, 2013, Fortaleza. Anais do VIII Congresso Nordestino de Produção Animal. Fortaleza, 2013.

NASCIMENTO, G. C. ; BOLIBNA, J. A. A. ; NORONHA, N. C. ; OLIVEIRA, M. R. ; MOTA, B. B. ; TEIXEIRA, R. B.. **Efeito de solução fitoterápica à base de óleo de nim (*Azadirachta Indica*) como sanitizante no pré e pós dipping sobre as características físico-químicas do leite..** In: IX Congresso Nordestino de Produção Animal, CNPA 2013, 2013, Fortaleza. Anais do IX Congresso Nordestino de Produção Animal. Fortaleza, 2013.