

Atividade anti-fúngica do neem e jurema-preta sobre cepas de *Candida* spp isolados de vacas com mastite subclínica no Estado de Pernambuco

Andréia V. Pereira,^{*1} Onaldo G. Rodrigues,² Katiuscia M. da S. Lobo,¹ Denise A. C. Bezerra,¹ Rinaldo A. Mota,³ Luciana C. de A. Coutinho,³ Leonildo B. G. da Silva,³ Ana C. R. Athayde²

¹Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, 58708-11 Patos-PB, Brasil

²Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, 58708-11 Patos-PB, Brasil

³Laboratório de Doenças Infecto Contagiosas, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Pernambuco, Bairro Dois Irmãos, Rua Dom Manoel de Medeiros, 52071-030 Recife-PE, Brasil

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-fúngica (*in vitro*) do neem (*Azadiracta indica* A. Juss.) e de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre cepas de *Candida* spp. isoladas de casos de mastite subclínica em vacas no Estado de Pernambuco. As folhas do neem foram coletadas em árvores de fazendas do município de Patos-PB e a casca da jurema-preta foi coletada na UFCG, Campus de Patos e preparados extratos etanólicos. As amostras de *Candida* spp. foram coletadas de leite de vacas com mastite subclínica e semeadas em placas de Petri contendo ágar-base acrescido de 5% de sangue desfibrinado de ovino Sabouraud. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C e a leitura foi realizada com 24 e 48 h. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado final foi determinado pela média aritmética dos halos de inibição. A avaliação microbiológica destes ensaios demonstrou que o extrato da casca da jurema-preta apresentou atividade antifúngica bastante satisfatória sobre a levedura de *C. albicans*, proporcionando resultado superior aos obtidos com o extrato do neem e fluconazol.

Unitermos: *Azadiracta indica*, *Mimosa tenuiflora*, *Candida* spp. Meliaceae, Mimosoidea.

ABSTRACT: “Anti-fungal activity of neem and jurema-preta on samples of isolated *Candida* spp of cows with subclinical mastitis in the State of Pernambuco”. The leaves of neem were collected on farms of the city of Patos-PB, and the bark of jurema-preta was collected in the UFCG - Campus of Patos-PB, and the extracts were prepared from the ethanol. The samples of *Candida* spp. were collected in milk of cows with subclinical mastitis and sown in plates of Petri containing agar-base 5% increased of de-fiber blood of sheep Sabouraud. The plates were incubated in bacteriological greenhouse 37°C and the reading was carried through with 24 and 48 h. The assays were carried through in duplicate and the final result was determined by the arithmetic mean of inhibition halos. The microbiological evaluation of these assays demonstrated that the extract from the bark of jurema-preta showed antifungal activity quite satisfactory on the yeast *C. albicans*, providing superior results to those obtained with the extract of neem and fluconazol.

Keywords: *Azadiracta indica*, *Mimosa tenuiflora*, *Candida* spp. Meliaceae, Mimosoidea.

INTRODUÇÃO

A mastite é uma das doenças de maior importância nos sistemas de exploração pecuária, que afeta acentuadamente a produção leiteira mundial, pela redução na capacidade produtora dos rebanhos infectados (Silva, 1999), acarretando altos prejuízos. Esta enfermidade possui origem pluri-etiológica podendo ser tóxica, traumática, alérgica, metabólica e infecciosa, sendo as causas infecciosas as principais, destacando-se as

bactérias por ocorrerem com maior frequência, além dos fungos, algas e vírus (Fonseca, 2000).

Os fungos são microrganismos que podem estar envolvidos nos processos de mastites, dentre eles a *Candida* spp., que geralmente são refratários à terapia antimicrobiana convencional e tendem a induzir processos crônicos (Andrade, 2002). Contudo, para considerá-la patogênica, há necessidade de encontrá-la em grande quantidade (Cruz, 1985). Essa levedura é comensal, vivendo nas mucosas em equilíbrio com a flora bacteriana

(Feo, 1973).

A utilização prolongada de antibióticos, associado aos fatores como doenças crônicas, imunodebilitantes, metabólicas, presença prévia de infecções por vírus ou bactérias, alimentos ricos em glicose e maltose, deficiências vitamínicas, senilidade e stress, causam o desequilíbrio bactéria/fungo que favorece o desenvolvimento e a multiplicação do microrganismo, tornando-o um agente infeccioso (Jungerman & Schwartzman, 1972; Palermo-Neto 2001).

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, 2001). Este fato tem contribuído no desenvolvimento e na preservação da flora e no tratamento de diversas patologias.

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. Um exemplo é a *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir. (jurema-preta), típica das áreas semi-áridas do Brasil, é uma leguminosa da subfamília Mimosoideae e popularmente utilizada por tribos indígenas e pelas populações dessas regiões para fins terapêuticos no Brasil em países da América Latina. Há estudos que demonstram seu potencial antimicrobiano, analgésico, regenerador de células, antitérmico e adstringente peitoral (Maia, 2004).

Em estudos fitoquímicos realizados com *M. tenuiflora* por Meckes-Lozoya et al. (1990a), foi identificado em abundância taninos e flavonóides que provavelmente são responsáveis pela atividade antimicrobiana, sendo verificada em *Staphylococcus epidermitis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* e *Acinetobacter calcoaceticus*, além de fungos como *Microsporum gypseum*, *M. canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubus* e *Chaetomium indicum* (Lozoya et al, 1989).

Plantas exóticas bem adaptadas ao clima do Brasil também têm apresentado diversas propriedades como medicinais, inseticidas dentre outras como é o caso do neem. Originária do Sudeste da Ásia região de clima tropical, o *Azadiracta indica* (neem) é pertencente à família Meliaceae, como a santa-bárbara, ou cinamomo, o cedro, o mogno. O neem é cultivado em todos os países da África, na Austrália e América Latina, usado há séculos na Ásia, principalmente na Índia, como planta medicinal. Tem diversas aplicações, em especial como anti-séptico, curativo, vermífugo; é colocado em sabões medicinais, cremes e pastas dentais (Schmutterer, 2004).

Os produtos naturais produzidos desta planta são

biodegradáveis, portanto não deixam resíduos tóxicos nem contaminam o ambiente, ou seja, são praticamente inócuos aos vertebrados, por apresentar uma baixa toxicidade e larga distribuição na natureza, podendo ser considerado como uma valiosa fonte para o desenvolvimento de drogas modernas. Os efeitos benéficos de produtos naturais obtidos a partir da *A. indica* podem ser atribuídos a um ou mais compostos fitoquímicos, incluindo antioxidantes, flavonóides e outras substâncias encontrados nesta planta (Mossini, 2005).

O neem também apresenta atividade antibacteriana, pois o seu óleo tem eliminado várias espécies de bactérias patogênicas, incluindo: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhosa*, possuindo também atividades antifúngicas e antissépticas com ação contra microorganismos gram positivos e negativos (Mossini, 2006).

Estudos realizados por Ieven et al. (1979) comprovaram a eficácia da atividade antifúngica de produtos vegetais, os quais testaram extratos contra várias espécies de fungos filamentosos e leveduriformes, obtendo-se bons resultados. Diante do amplo potencial de atividade biológica apresentada pelo neem e pela jurema-preta, esse estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti-fúngica *in vitro* dos extratos etanólicos de ambas as espécies sobre cepas de *Candida* spp. isoladas de casos de mastite subclínica em vacas na região de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos Laboratório de Ciências Químicas e Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande do Centro de Saúde e Tecnologia Rural, e no Laboratório de Doenças Infecto Contagiosas da Universidade Federal Rural do Pernambuco.

Foi realizada a coleta da casca de 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. As folhas de neem foram adquiridas de plantio comercial em fazendas comerciais do município de São José de Espinharas e a identificação botânica e preparação das exsiccatas foi realizada no herbário Dárdano de Andrade Lima na Universidade Regional do Cariri, Crato-CE, pela botânica curadora do Herbário Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva. A exsicata de jurema-preta foi depositada no Herbário sob o número 3275 e a do neem sob número 3276.

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 65 °C por 72 h. em seguida, 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) (Matos, 1997). A concentração final do extrato da jurema preta foi de 0,5 g/mL e de neem 2 g/mL com rendimentos de 57 g e 30 g respectivamente. Para os ensaios, foram utilizadas as concentrações nas seguintes diluições: 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16.

Exame microbiológico

Foram coletadas assepticamente amostras de leite de vacas com mastite subclínica de acordo com metodologia descrita por Bouchot et al. (1985). Aliquotas destas amostras foram semeadas em placas de Petri contendo ágar-base acrescido de 8% de sangue desfibrinado de ovino e ágar Sabouraud. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C e, a leitura foi realizada 24 e 48 h após. Para a identificação do fungo, foram observadas as características macromorfológicas das colônias e microscópicas à técnica do Gram, realizada de acordo com Quinn et al. (1994). Antifúngico padrão: fluconazol (25 mg) como controle positivo e disco embebido com etanol 70% controle negativo (CECON/SP).

Estudo da atividade antimicrobiana da jurema-preta e neem

Em placas de Petri estéreis foi depositado 1 mL da suspensão de cada microrganismo em solução fisiológica a 0,85%, sendo padronizada pelo tubo 1,0 da escala de McFarland e ajustada para 90% de transmitância (530 nm), correspondendo aproximadamente a 300 UFC/mL (Mc Ginnis, 1980). Em seguida, foi adicionado vinte e 1 mL de ágar Sabouraud dextrose fundido a 50 °C. Após solidificação do meio de cultura, foram feitas cavidades, utilizando-se cânulas de vidro (06 mm de diâmetro). Após este procedimento, foram inoculados 50 µL dos extratos etanólicos de neem e jurema-preta nas diluições pré-estabelecidas.

Os ensaios foram incubados a 37 °C em estufa bacteriológica, por um período de 48 h para fungos leveduriformes. Foram realizados procedimentos controles utilizando-se antimicrobianos padrões, metanol (50 µg/mL) para cepas fúngicas (Amato Neto et al., 1994; Hadacek & Greger, 2000). Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado final foi determinado pela média aritmética dos halos de inibição. Seria considerada como possuidora de atividade antimicrobiana, aquela concentração dos extratos etanólicos que quando aplicada sobre o meio de cultura contendo a suspensão do microrganismo apresentasse um halo de inibição, caracterizado por uma zona de clareamento igual ou superior a 10 mm de diâmetro (Silva et al., 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da atividade antifúngica, o extrato etanólico do neem não apresentou atividade significativa em nenhuma das diluições utilizadas para todas as amostras de *Candida* sp. testadas (Figura 1). Em estudos utilizando os extratos alcoólico e aquoso de neem, não apresentaram eficácia na inibição do crescimento *in vitro* de *C. albicans* de cavidade bucal, em comparação com os controles nistatina e etanol (Santos et al, 2005).

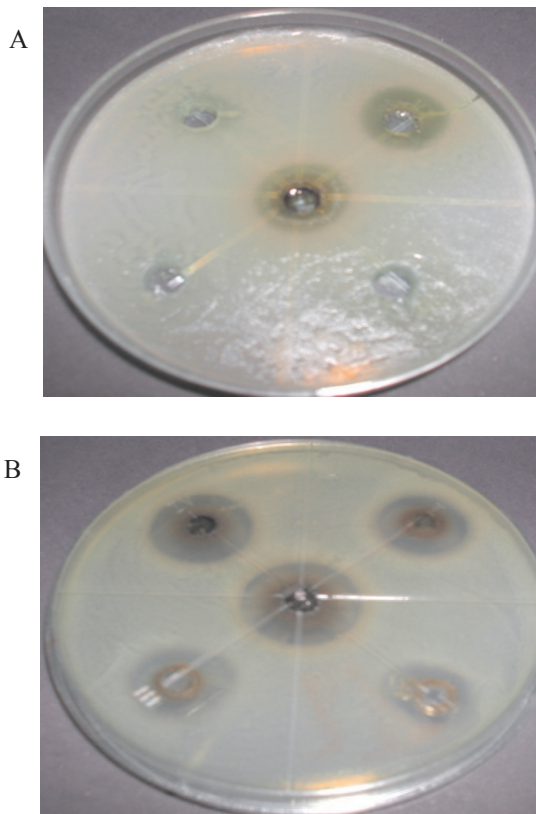


Figura 1. Atividade anti-fúngica do neem (A) e da jurema-preta (B) sobre cepas de *Candida* spp. isolados de leite de vacas com mastite subclínica na região de Pernambuco.

O neem é uma das poucas plantas que possuem extensas propriedades clínicas, medicinais e farmacológicas, em estudos realizados com extratos de folhas, foi observado que o mesmo apresenta atividades anti-sépticas, curativas, antiúlcera, antiinflamatória (Chattopadhyay, 1999). Dentre elas o neem apresenta atividade antidermatofítica *in vitro* contra os dermatófitos *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *Microsporum nanum*, *Epidermophyton floccosum* provando ser eficaz contra estes fungos que infectam o corpo humano (Mossini, 2006).

No experimento utilizando, o extrato da casca de jurema-preta foi observado atividade antifúngica em todas as diluições. Houve formação de variados tamanhos de halo de inibição de crescimento, caracterizado por uma zona de clareamento igual e superior a 10 mm de diâmetro,

sobre as amostras de *Candida* sp testadas (Figura 1). 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, apresentando halos de inibição inferiores a 10 mm de diâmetro.

Em constatações da ação contra leveduras, as substâncias extraídas com etanol 95% mostraram efeito contra *C. albicans* (Lozoya et al., 1989), agente causador da candidíase, além de extrato de acetato de etila, rico em taninos, novamente demonstrou sua eficácia (Meckes-Lozoya et al., 1990b). Tais dados encontram-se inferiores aos obtidos com o controle antifúngico anfotericina B e fluconazol, do mesmo experimento. A atividade antimicrobiana do extrato de *M. tenuiflora* (Wild) Poir, pode esta vinculada a presença de taninos e flavonóides em extrato de acetato de etila como descrito por Meckes-Lozoya et al. (1990b).

Meckes-Lozoya et al. (1990), em estudos semelhantes, utilizou extrato etanólico de casca jurema-preta sobre amostra de *Cândida* sp. sendo possível observar efeito antifúngico sobre as mesmas. Comparando com os resultados obtidos por Gonçalves (2005), foi possível observar a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólico da *M. tenuiflora* sobre *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *S. spp.* coagulase-negativa.

Em estudos realizados com extrato aquoso e etanólico do pó da casca de jurema-preta Lozoya (1989) também observou clara inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e também contra espécies de fungos dermatófitos. Os resultados obtidos pelos referidos autores estão, portanto, inteiramente compatíveis com os dados observados neste experimento.

CONCLUSÃO

A partir da metodologia aplicada, foi possível observar que o extrato da casca da jurema-preta apresentou atividade antifúngica bastante satisfatória sobre a levedura de *C. albicans*, proporcionando resultado superior aos obtidos com o extrato do neem e antifúngico.

REFERÊNCIAS

- Andrade MA 2002. Mastite bovina sub-clínica: prevalência, etiologia e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas. *Rev Vet News* 49: 10-16.
- Albuquerque UP 2001. The use of medicinal plants by the cultural descendants of African people in Brazil. *Acta Farm Bonaerense* 20: 139-44.
- Amato Neto, V, Levi GC, Lopes HV 1994. *Antibióticos na prática médica*. 4 ed. São Paulo: Roco. 358p.
- Bouchot MC, Catel J, Chirol C, Ganiere JP, Menec ML 1985. Diagnostic bactériologique des infections mammaires des bovins. *Rec Med Vet* pg. 567-577.
- Chattopadhyay RR 1999. A comparative evaluation of some blood sugar lowering agents of plants origin. *J Ethnopharmacol* 67: 373-376.
- Cruz LCH 1985. *Micologia veterinária - Estudo e ensino*. Rio de Janeiro: Imprensa universitária. 112p.
- Feo M 1973. Diagnóstico rápido de *C. albicans*. *Rev Lat Amer Microbiol* 15: 217-218.
- Fonseca LFL; Santos MV 2000. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 175p.
- Gonçalves AL, Filho AA, Menezes HS 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol Sao Paulo* 72: 353-358.
- Hadacek F, Greger H 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem* 11: 137-147.
- Ieven, M, Berghe DAV, Mertens F, Vlietinck A, Lammens E 1979. Screening of higher plants for biological activities: I. Antimicrobial activity. *Plant Med* 36: 311-321.
- Jungerman PF, Schwartzman RM 1972. *Veterinary Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger. p. 61-72.
- 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.
- 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*. EUFC, 2ed. Fortaleza. 141p.
- Mc Ginnis, MR 1980. *Laboratory handbook of medical mycology*. New York: Academic Press. 643p.
- Meckes-Lozoya M, Lozoya X, Morales R, Breaux C, Arnason AJ 1990a. N, N-Dimethyltryptamine alkaloid in *Mimosa tenuiflora* Bark (Tepescohuite). *Arch Invest Med* 21: 175-177.
- Meckes-Lozoya M, Lozoya X, Gonzales JL 1990b. *In vitro* pharmacological properties of some extracts of *Mimosa tenuiflora* (Tepescohuite). *Arch Invest Med* 21: 63-169.
- Mossini SG, Kimmelmeier C 2005. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos usos. *Acta Farm Bonaerense* 24: 139-48.
- Mossini SAG 2006. *Efeitos de extratos de Azadirachta indica A. Juss (Meliaceae) na produção de micotoxinas e na morfologia de fungos*. Maringá 49 p. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Maringá.
- Palermo-Neto J 2001. *Resíduos de antimicrobianos em alimentos*. *Rev CFMV* 22: 65-71.
- Quinn PJJ, Carter ME, Markey B, Carter GR 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Philadelphia: Mosby, p.648.
- Santos, VR, Durães GV, França EC, Jham GN, Santos VR 2005. Susceptibilidade de *Candida albicans* a extratos de *Azadirachta indica* (neem). *XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica*. Águas de Lindóia-SP, Brasil.
- Schmutterer, H. 2004. Properties and potential of natural

pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu Rev Entomol* 35: 271-297.

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, Brasil.

Silva, N 1999. Diagnóstico de mastite em animais de importância econômica. *III Encontro de Pesquisadores em Mastites*. Botucatu, SP. Brasil.