

EULINA TEREZA NERY FARIAS

Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de *Caesalpinia ferrea* Mart.
(Leguminosae)

Recife
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

EULINA TEREZA NERY FARIAS

Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de *Caesalpinia ferrea* Mart.
(Leguminosae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá
Coorientador: Prof. Dr. Rinaldo A. Mota

Recife
2013

EULINA TEREZA NERY FARIAS

Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de *Caesalpinia ferrea* Mart.
(*Leguminosae*)

Dissertação de Mestrado

Aprovada em:.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. FABRÍCIO BEZERRA DE SÁ
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. JOAQUIM EVÊNCIO NETO
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. GEORGE CHAVES JIMENEZ
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. DANIELA MARIA BASTOS DE SOUZA
Universidade Federal Rural de Pernambuco

“Os verdadeiros sábios se dão pelos bons princípios de seus atos, pela intocável moral de suas atitudes e pelo fato de servirem de exemplo dos ensinamentos que transmitem”.

Eduardo Lambert

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo conforto nas horas difíceis e pela força que me concedeu para concluir este trabalho.

Os meus mais sinceros agradecimentos ao meu orientador Professor Dr. Fabrício Bezerra de Sá e ao meu coorientador Professor Dr. Rinaldo Aparecido Mota pela confiança e conhecimentos a mim transmitidos.

A Professora Dra. Maria do Carmo Alves de Lima (Nena), do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco pela amizade, incentivo e colaboração na elaboração do extrato bruto da planta.

A Professora Dra. Márcia Silva Nascimento, do Laboratório de Química dos Produtos Naturais do Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco, pelo incentivo e colaboração na elaboração dos testes fitoquímicos.

A bióloga Marlene Alencar Barbosa curadora do Herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco, pela amizade, e colaboração na confecção das exsiccatas e envio de duplicatas para especialista.

Ao médico veterinário André de Souza Santos do Laboratório de Bacteriose dos Animais Domésticos pela colaboração na elaboração dos testes microbiológicos e ensinamentos a mim repassados.

Ao proprietário e a supervisora da RPPN Pedra do Cachorro, Raimundo Guaraci Cardoso e Alba Maria Rodrigues pela amizade e por disponibilizar a reserva para nossas pesquisas.

Ao professor Vitor Caiaffo Brito e Taciana Spineli pela amizade, e registros fotográficos.

A todos os novos colegas de trabalho dos Laboratórios de Planejamento e Síntese de Fármaco da UFPE e do Laboratório de Oftalmologia da UFRPE (as curicas) pelos bons momentos de amizade, lazer e incentivo a nossa pesquisa.

A CAPES pelo apoio concedido a este trabalho através da concessão da bolsa de pesquisa.

E finalmente deixo aqui um agradecimento sincero a toda minha família pela confiança e carinho dedicados a mim.

Resumo

A conjuntivite pode ameaçar a integridade do olho e produzir destruição tecidual significativa. O conhecimento do agente causador do processo e progressão da doença, bem como estabelecimento de tratamento coerente eficaz, influencia na evolução e prognóstico da doença. O tratamento usual é a antibioticoterapia, porém o uso prolongado de antimicrobianos de uso tópico pode resultar em multirresistência de bactérias patogênicas e/ou fungos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana “*in vitro*” do extrato bruto etanólico de *Caesalpinia ferrea* (pau-ferro), frente a isolados clínicos de bactérias causadoras de conjuntivite em cães e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) avaliando-se o perfil de sensibilidade dessas cepas frente à ciprofloxacina, antimicrobiano usado rotineiramente na clínica médica veterinária e o extrato da planta. Testes fitoquímicos comprovaram a presença de flavonoides e taninos hidrolisáveis, que apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp.. O antibiograma foi avaliado pelo método de poço e disco-difusão, e todas as cepas mostraram-se sensíveis ao extrato de *C. ferrea*, com halos de inibição de 8 a 24 mm, quando comparados ao antibiótico padrão, o qual apresentou halos inibitórios de 0 a 35 mm, demonstrando a viabilidade do uso do extrato etanólico de *C. ferrea* como antimicrobiano natural, sendo uma possível opção terapêutica para ensaios biológicos *in vivo*, no tratamento complementar da conjuntivite em cães.

Palavras chave: *Caesalpinia ferrea*, Atividade antimicrobiana, Conjuntivite, Cão.

Abstract

Conjunctivitis can compromise the integrity of the eye and produce significant tissue destruction. Knowledge of the causative agent and progression of the disease, including the establishment of an effective and consistent treatment will influence the prognosis and evolution of this disease. The usual treatment is antibiotic therapy, but long term use of topic antimicrobials can result in multidrug resistance of pathogenic bacteria and/or fungi. The aim of this study was to evaluate the "*in vitro*" antimicrobial activity of the raw ethanolic extract of *Caesalpinia ferrea*, and determine the minimum inhibitory concentration (MIC) against bacterial agents collected from dogs with conjunctivitis from our routine ophthalmology ambulatory services, and evaluate the sensitivity profile of these strains to ciprofloxacin, a commonly used antimicrobial in veterinary medical clinic, and the plant extract. Phytochemical tests confirmed the presence of bioactive compounds (flavonoids and hydrolysable tannins), that demonstrated significant antimicrobial activity against Gram-positive *Staphylococcus* sp. and *Streptococcus* sp. Antibiogram evaluation by disc diffusion method confirmed that all strains were sensitive to the *C. ferrea* extract, with inhibition zones ranging 8 to 24 mm when compared to standard antibiotic with zones with 0 to 35 mm. This demonstrated the viability of ethanol extract the *C. ferrea* as a natural antimicrobial agent and the possibility of its use as a therapeutic option for biological tests *in vivo* and as a complementary treatment for conjunctivitis in dogs.

Key words: *Caesalpinia ferrea*, Antimicrobial activity, Conjunctivitis, Dog.

LISTAS DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Exsicatas de <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart. depositadas no Herbário UFP- Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE.....	20
Figura 2 Árvore (A),Fruto (B), Flor (C) de <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart...	21
Figura 3 1-área da conjuntiva, 2-palpebra, 3-fornix, 4-terceira pálpebra anterior, 5-terceira pálpebra posterior.....	23
Figura 4 Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de <i>Caesalpinia ferrea</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus</i> sp. em ágar Müeller Hinton (1,2,3) e cepa de <i>Streptococcus</i> sp. em ágar sangue (4). (a) ciprofloxacina, (b) disco seco, (c) disco úmido (d) poço, (e) etanol.....	29

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURA.....	viii
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS: ASPECTOS HISTÓRICOS.....	11
2.2 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	13
2.3 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA MEDICINA VETERINÁRIA.....	16
3 OBJETIVOS	19
3.1 GERAL	19
3.2 ESPECÍFICOS	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO	19
4.1.1 Descrição botânica da espécie	20
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO	21
4.3 ABORDAGEM FITOQUÍMICA	21
4.4 OBTENÇÕES DAS AMOSTRAS MICROBIANAS	23
4.5 TESTE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

As propriedades curativas dos princípios e medicamentos fitoterápicos na medicina veterinária são cada vez mais estudadas por profissionais adeptos da fitoterapia, que externam com alta frequência, bons resultados em tratamento de parasitose e doenças infecciosas (PEREIRA et al., 2009). Há vários estudos que investigam o uso de plantas como atividade nematocida e antimicrobiana, sendo assim uma área promissora para pesquisas (ROCHFORT et al., 2008) contudo, Silva (2008) alerta que o uso pouco cuidadoso de plantas medicinais fora de seu contexto original, e sem respaldo acadêmico, tem dado origem a intoxicação, atribuíveis aos efeitos já conhecidos de plantas ou ainda ao uso incorreto destas, principalmente pela dificuldade na identificação das espécies.

A conjuntiva possui grande importância na dinâmica lacrimal, na proteção imunológica do olho, nos movimentos oculares e na cicatrização corneana, agindo como barreira à entrada de microrganismos patogênicos ou não. A superfície ocular é colonizada por microbiota bacteriana que ajuda na sua defesa e, juntamente com fatores humorais, inibe o estabelecimento de microrganismos patógenos. Entretanto, podem ocorrer mudanças, principalmente pela diminuição da imunidade local e sistêmica do animal (GELATT, 2003) podendo causar afecções oculares como a conjuntivite. A conjuntivite é a inflamação da conjuntiva, o tratamento usual em cães é realizado com administração de antimicrobianos (PEREIRA, 2007; SLATTER, 2005).

Caesalpinia ferrea Mart. vulgarmente conhecida como jucá ou pau-ferro, é uma espécie da família *Leguminosae*, uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas com cerca de 650 gêneros, que reúnem mais de dezoito mil espécies. A subfamília *Caesalpinioideae* consiste, de aproximadamente 150 gêneros e 2.200 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (CRONQUIST, 1981). *C. ferrea* é uma árvore nativa do Brasil, amplamente distribuída principalmente nas regiões Norte e Nordeste (PETER et al., 2008). Na medicina popular é usada para tratamento de afecções bronco-pulmonar, diabete, reumatismo, câncer, inflamação, distúrbios gastrointestinais, diarreia, inflamação e dor (OLIVEIRA et al., 2010). Devido a sua importância na

etnomedicina, à espécie integra a lista das 71 plantas medicinais tradicionalmente usadas no Brasil, que poderão resultar em fitoterápico para ser distribuído pelo Programa Governamental de Saúde/SUS- RENISUS/ 2009 (Pharmacia Brasileira, 2009). Diversos estudos confirmaram que a planta possui compostos com ação farmacológica com atividade antimicrobiana (PEREIRA et al.; 2009 ; SAMPAIO et al., 2009 ; TOMAZ, 2010) , cicatrizante (OLIVEIRA et al., 2010) hipoglicemiante (VASCONCELOS et al., 2011), anticoagulante (CAVALHEIRO et al., 2009) e antiinflamatória (CARVALHO et al.,1996 ; FREITAS et al., 2012 ; PEREIRA et al., 2012). De acordo com Sampaio (2009) essas propriedades podem estar relacionadas à presença de compostos como flavonoides, antraquinonas, lactonas, alcaloides, saponinas, taninos, sesquiterpenos e triterpenos na planta, sendo assim uma possível opção terapêutica para ensaios biológicos *in vivo*. O conhecimento do agente causador do processo e progressão da conjuntivite, bem como, estabelecimento de tratamento coerente e eficaz, influencia na evolução e prognóstico da doença (UESUGUI et al. , 2002). Considerando que o uso indiscriminado de antimicrobianos promove na maioria das vezes, o desenvolvimento de cepas multirresistentes, as plantas medicinais se apresentam como nova alternativa ao tratamento convencional. Sendo assim, e visando contribuir com o conhecimento da *Caesalpinia ferrea*, idealizou-se esse trabalho que tem o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico da planta frente a bactérias causadoras da conjuntivite em cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS: ASPECTOS HISTÓRICOS

O uso popular de plantas medicinais é uma arte que acompanha o ser humano desde os primórdios da civilização, sendo fundamentada no acúmulo de informações repassadas oralmente (FRANCO, 2005).

Registros arqueológicos provam que, há milênios, diversos povos, principalmente os orientais, conheciam o poder das plantas medicinais, sejam como substância aromática, remédios, venenos, expansoras da consciência ou para apurar os sentidos (FERNANDES e ROCHA, 1997). É o acúmulo de

conhecimento secular e empírico sobre a ação dos vegetais, por diversos grupos étnicos. Observações realizadas até agora permite supor que todas as formações culturais fazem uso de plantas como recurso medicinal (SIMÕES, 2001).

Na América do sul, durante muitos séculos, os índios da Bolívia e do Peru obtinham de uma árvore chamada quino, que crescia de forma silvestre, uma substância vegetal denominada quinina, que era utilizada para curar a febre malárica, eles ensinaram seus conhecimentos herbalísticos aos conquistadores espanhóis, porém se negaram a ensinar os lugares onde crescia a planta. No principio do século XIX, era muito difícil obter-se a quinina, e a exploração das colônias asiáticas pelos europeus era dificultada pelas epidemias de malária; contudo, os índios sul-americanos resistiam em divulgar os seus segredos. Por fim, Charles Ledger conseguiu algumas sementes de quino que foram doadas pelo seu criado. Ledger dedicou-se, então, a cultivá-las em Java e no Ceilão. O seu criado índio Aymara, foi assassinado pelos membros da sua tribo por doar as sementes ao seu amo (HARVEY, 1978). Os Incas também desenvolveram sua terapia natural, baseados nos conhecimentos das tribos que dominavam, com o emprego de plantas psicoativas, buscando estados alterados de consciência que lhes possibilitavam “ver”, com a percepção, a causa das doenças e o remédio na natureza para se realizar a cura (FERNANDES e ROCHA, 1997).

No Brasil, o uso das plantas medicinais também tem origem na cultura de diversos grupos indígenas que habitavam o país e que sempre reconheceu sua eficácia e legitimidade. Usavam as plantas no tratamento das doenças e em rituais religiosos, faziam uma bebida com uma planta chamada jurema, que era ingerida no meio de cerimônias que os levava a sublimação (CAMARGO, 1998). Faziam também uso da ipecacuanha, jaborandi, guaraná e o taiuiá (SIMÕES et al., 1998) por intermédio dos pajés, os conhecimentos das ervas locais e seu uso era transmitidos e aprimorados de geração a geração. Tais conhecimentos foram prontamente absorvidos pelos europeus que passaram a viver no país, principalmente aqueles que passaram a fazer incursões mais prolongadas no interior (nos “sertões”), geralmente com o intuito de apresar índios ou buscar pedras e metais preciosos. A necessidade de viver do que a natureza tinha a oferecer localmente, assim como o contato com os índios normalmente usados

como “guias” terminaram por ampliar estes conhecimentos da flora local brasileira. Os novos conhecimentos do uso das ervas acabaram-se fundidos àqueles trazidos da Europa, além disso, muitas plantas conhecidas no velho mundo por suas propriedades medicinais induziram os europeus a testarem uso similar para as espécies nativas proximamente relacionadas. Muitas vezes os mesmos princípios podiam ser encontrados nas espécies nativas, ocasionalmente em maior quantidade ou qualidade (LORENZI, 2002).

O Padre José de Anchieta nos anos de 1560 a 1580 fez um relato detalhado sobre as plantas comestíveis e medicinais do Brasil, em suas cartas ao superior geral da Companhia de Jesus. Dentre estas especificamente, Anchieta falou muito em uma “erva-boa”, a hortelã pimenta, que era utilizada pelos índios contra indigestão, para aliviar nevralgias, reumatismo e doenças nervosas. Exaltou também as qualidades do capim-rei, do ruibarbo do brejo, da ipecacuanha-preta, da cabriúva-vermelha e do balsamo-da-copaíba, usado para curar feridas (CAMARGO, 1998). Uma das primeiras publicações na área foi a do frei José Mariano da Conceição Velloso (1742-1811), autor da “Flora Fluminense” considerado um dos primeiros relatos de informações sobre nossas plantas medicinais, porém o trabalho mais significativo dessa época é atribuído a Karl Friedrich Philipp von Matius (1794-1868), editor da “Flora Brasiliensis”, a mais completa obra botânica publicada no país em 1843 relatando as virtudes medicinais das plantas. Esta pode ser considerada a primeira publicação sobre esse assunto no Brasil (LORENZI e MATOS, 2002).

2.2 PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

Muitos medicamentos disponíveis hoje no mercado tiveram a sua origem em protótipos de substâncias químicas, na maioria dos casos de origem vegetal. De inúmeras espécies vegetais de valor medicinal, os pesquisadores das áreas da Farmacologia e Medicina, isolaram compostos identificados como substâncias básicas, para a síntese de centenas de substâncias ativas. Assim foi descoberta a morfina, a reserpina, a digoxina, o taxol, a emetina, atropina e inúmeros outros compostos que modificaram a história médica e tornou o tratamento das doenças uma realidade, e não apenas uma promessa de cura (DI STASI, 2007), mas o progresso da indústria farmacêutica, o acesso a medicamentos sintéticos e o pouco cuidado com a comprovação das

propriedades farmacológicas, tornou o conhecimento da flora medicinal sinônimo de atraso tecnológico (LORENZI e MATOS, 2002), fazendo com que sucumbissem as iniciativas nas práticas e pesquisas.

A nível nacional, inúmeras pesquisas com o objetivo de embasar, cientificamente, a utilização de plantas com recursos terapêutico foram retomados. Muitos grupos, na sua totalidade concentrados nas Instituições de Ensino Superior (IES), realizavam projetos de pesquisas na área de botânica, agronomia, química, farmacologia e tecnologia farmacêutica, e seus esforços eram direcionados para avaliação das potencialidades da nossa flora, com o apoio do Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais, iniciado em 1983, e vinculado à antiga Central de Medicamentos (CEME). A interrupção desse programa, em 1995 exerceu um impacto negativo profundo no desenvolvimento dessas áreas. Destacamos a deficiência em recursos humanos qualificados para áreas especializadas, como a de desenvolvimento tecnológico e a de ensaios clínicos, que vinham sendo apoiadas pelo referido programa (SIMÕES e SCHENKEL, 2002), porém as novas tendências globais e preocupação com a biodiversidade e as ideias de desenvolvimento sustentável, trouxeram novos ares ao estudo das plantas medicinais brasileiras, que acabaram despertando novamente um interesse geral nesta área. Novas linhas de pesquisas foram estabelecidas nas universidades, algumas delas buscando bases mais sólidas para a validação científica da indicação e uso das plantas medicinais (LORENZI e MATOS, 2002). Considerando o decreto federal 5.813 de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, associado à portaria de 03 de maio do mesmo ano no Ministério da Saúde, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e a relevância de pesquisas de drogas naturais, já que o uso de plantas medicinais e de fitoterápicos no país será no futuro, uma realidade nos serviços públicos de saúde e também uma alternativa terapêutica completamente legalizada (DI STASI, 2007).

Um dos maiores problemas de saúde pública, enfrentado em todo o mundo nas últimas décadas foi o agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas (OLIVEIRA et al., 2010). Atualmente, registra-se um aumento significativo na frequência de isolamento de bactérias que eram conhecidamente sensíveis às drogas de rotinas utilizadas na clínica, que agora

se apresentam resistentes a todos ou quase todos os antibióticos disponíveis no mercado como ocorrem com muitas bactérias multirresistentes. Este problema da resistência tornou-se mais grave devido às dificuldades para a descoberta e o lançamento de novos antimicrobianos no mercado, o que vem tornando esse produto cada vez mais escasso e mais caro. Estima-se que são necessários mais de 10 anos, a custo de 200 milhões de dólares, para que um antimicrobiano esteja à disposição da medicina (FERRONATTO et al., 2007). Além do Linezolid (Zyvox[®]) a última classe de antibiótico que chegou ao mercado farmacêutico do EUA foi há 30 anos (ESTEVAM et al., 2009).

Estudos buscam por um antimicrobiano ideal, ou seja, aquele que apresente maior espectro de ação, menor toxicidade, menor custo e menor índice de resistência bacteriana. A atividade antimicrobiana desejada pode ser encontrada em espécies vegetais. Pesquisas de tal natureza no Brasil são de grande valia, pelo fato do país ser considerado um dos maiores reservatório de biodiversidade do mundo e, além disso, a grande extensão territorial abriga diversos ecossistemas, cada um com suas particularidades, o que torna uma verdadeira fonte quase que inesgotável, de moléculas a serem descobertas (FERREIRA et al., 2011) que na maioria, ainda não foram pesquisadas cientificamente para este fim (FERRONATTO et al., 2007).

Tresvenzol et al. (2009) comprovaram que o extrato etanólico das raízes de *Memora nodosa*, conhecida vulgarmente como carobinha, espécie muito comum no cerrado, apresentou atividade inibitória para *Bacillus subtilis*, *Micrococcus roseo*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, pertencentes à coleção padrão da American Type Culture Collection, e a isolados da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Soares (2008) verificou que o extrato etanólico das folhas da mesma espécie apresentou eficácia razoável na proteção contra ninfas do carrapato *Amblyomma cajannense*, responsável pelo parasitismo de várias espécies de mamífero, inclusive o homem.

Lôbo et al. (2010) confirmaram que o extrato bruto etanólico das raízes da espécie *Solanum paniculata* (jurubeba ou juribeba) e *Operculina hAMILTONII* (batata de purga) plantas muito comuns no sertão, apresentou atividade antimicrobiana contra linhagem padrões de *Staphylococcus aureus*, *Echerichia*

coli e *Pseudomona aeruginosa*. A planta também é utilizada na medicina popular da região, contra verminose gastrointestinal em ovino (SANTOS, 2007).

Os extratos aquoso e alcoólico da entrecasca de *Maytenus rigida* (bom-nome, bom-homem), árvore medicinal da caatinga, apresentou atividade antibacteriana frente à *Echerichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (ESTEVAM et al., 2009).

Souza e Wiest (2007) confirmaram que o extrato etanólico das folhas e talos frescos de *Aloysia gratíssima* (garupa, erva-santa) apresentou atividade antibacteriana frente à *Rhodococcus equi* e *Pausteurella muttocida*, ambas as bactérias relacionadas a casos de pneumonia e outros quadros respiratórios em humanos e animais.

Ferreira et al. (2011) determinaram que o extrato hidroalcoólico da casca, raiz e folhas de *Rhizophora mangle* (mangue-vermelho) espécie endêmica da vegetação de manguezal, teve atividade antimicrobiana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella cholerea-suis* e *Klebsiella pneumoniae*.

Um estudo da avaliação da atividade antimicrobiana de cinco espécies, *Achyroline satureiodes* (macela do campo), *Ageratum cunyzoides* (mentrasto), *Baccharis trimera* (carqueja), *Bidens pilosa* (picão-preto) e *Porophyllum ruderale* (cravo-urubu) da família botânica *Asteraceae*, frente a oito microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Echerichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, comprovando o potencial medicinal desta família, que é a mais numerosa dentro das angiospermas, possuindo cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies (FERREIRA et al., 2009) dos quais 300 gêneros e 2.000 espécies estão representadas no Brasil (SOUZA e LORENZI, 2005).

2.3 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS EM MEDICINA VETERINÁRIA.

O uso de plantas medicinais na saúde animal também direciona estudos, principalmente no que se refere, à resistência dos microrganismos aos antibióticos comumente usados na terapêutica, sendo assim uma área promissora para pesquisas (ROCHFORT et al., 2008). As propriedades curativas dos medicamentos fitoterápicos são cada vez mais estudadas na veterinária, profissionais adeptos da terapia natural externam alta frequência de

bons resultados em tratamentos de parasitose e doenças infecciosas incluindo a mastite (PEREIRA et al., 2009).

Silva et al. (2008) testaram a atividade antibiótica do extrato do pericarpo do fruto da *Punica granatum* (romã) frente a *Staphylococcus aureus*, sensíveis e resistentes a penicilina, e atestaram a possibilidade do uso terapêutico dessa planta na medicina veterinária.

Pereira et al. (2009) constataram a atividade antibiótica dos extratos de *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta) e *Azadiracta indica* (neen) frente a *Staphylococcus* coagulasse negativa, isolados de casos de mastite subclínica de búfala, e ação antifúngica sobre cepas de *Candida* spp. Isoladas de vacas com mastite subclínica. Já Pereira (2010) obteve resultado positivo da ação de *M. tenuiflora* e *Piptadenia stipulalacea* (jurema branca), ambas as espécies comuns no semiárido nordestino, sobre amostras de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* ssp. coletados em amostras de leite de búfalas e vacas com mastite clínica e subclínica. Bezerra et al. (2009) também avaliaram a sensibilidade de 25 cepas de *S. aureus*, ao extrato etanólico de *M. tenuiflora* obtidos de amostras de leite de vacas com histórico de mastite clínica e subclínica, obtendo excelentes resultados.

Dal Pozzo et al. (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OEs) de *Origanum vulgare* (orégano) *Thymus vulgaris* (tomilho) *Lippia graviolens* (lipia) *Zengiber officinale* (gengibre) *Salvia officinalis* (salvia), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina demonstrando o potencial medicinal das espécies condimentares.

Avancini e Wiest (2008) obtiveram um bom resultado da atividade desinfetante de *Hypericum caprifoliatum* (escadinha, sinapismo), espécie comum do sul do Brasil nos ambientes de saúde e produção animal quando comparado com estudos realizados, com produtos químicos antimicrobiano-desinfetantes convencionais. Testaram *in vitro* a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da parte aérea (caule, folhas e flores), frente a diferentes doses infectantes de cepas padrão de *Staphylococcus aureus*, por ser esta referencia para avaliação de desinfetantes.

Leite et al. (2006) confirmaram a eficiência do shampoo à base do extrato de *Plectranthus ornatos*, comparado com o shampoo comercial (cipermetrina)

e sabão de coco no controle de pulgas (*Ctenocephalis canis*) em cães domésticos, onde o shampoo à base de *P. ornatos*, apresentou ótimo efeito pulicida (80,83 % de mortalidade), enquanto o shampoo comercial que utiliza cipermetrina (76,59 % de mortalidade), demonstrando a viabilidade desta planta no controle alternativo deste parasita.

Assim como outras espécies os cães estão vulneráveis injúrias externas e dependendo do grau de intensidade do trauma, podem ocorrer processos inflamatórios superficiais corneanos e conjuntivais, bem como, lesões graves na estrutura da túnica vascular e nervosa do globo ocular (WHITLEY e MOORE, 1984). Quando ocorre a perda de continuidade do epitélio, bactérias e fungos podem se instalar de forma oportunista, colonizando e infectando o estroma corneano (MOORE et al., 1988). A conjuntivite bacteriana primária é mais frequente em cães, bovino e ovino. Em cães normalmente, é uma condição associada a um espectro de alterações patológicas que podem incluir otite externa, hipotireoidismo, seborreia generalizada e pioderma. A conduta terapêutica inclui corticoterapia local e sistêmica, uso local de sulfato de atropina, antiinflamatórios e antibioticoterapia (PEREIRA, 2007). Os microrganismos mais frequentes isolados são *Staphylococcus* e *Streptococcus* apesar desses organismos serem comumente encontrados em olhos normais (SLATTER, 2005).

O globo ocular dos animais domésticos está naturalmente protegido contra patógenos devido ao fluxo contínuo da lagrima, ação fagocitária, barreira mecânica a ação bacteriostática da lisozima. Qualquer desequilíbrio de um destes fatores pode precipitar o olho a infecções com agentes patógenos endógenos e exógenos (SOUSA, 2001). Dentre os desequilíbrios que podem predispor o olho as infecções estão: estresse, estado imunológico debilitado, deficiência da película lacrimal, doenças sistêmica, traumatismos e conformações anormais das pálpebras (PENTLARGE, 1996). A conjuntiva desempenha um papel importante na dinâmica da lagrima, movimento ocular, cicatrização da córnea e proteção imunológica do olho. Está exposta continuamente a agentes infecciosos tais como vírus, bactérias e fungos (GALERA, 2000) predispondo a infecções oculares.

A conjuntivite bacteriana aguda é usualmente unilateral e responde bem ao tratamento em 3 a 4 dias, conquanto que fatores predisponentes sejam

removidos. A conjuntivite bacteriana crônica é comumente secundária, em geral são bilaterais e estão quase sempre associadas a anormalidades palpebrais ou a infecções dos ouvidos e da pele. Os antibióticos mais usados são a ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina, e para cocos Gram-positivo são prescritos a neomicina, penicilina eritromicina, gentamicina, enrofloxacina e cefalosporina (SLATTER, 2005; PEREIRA, 2007). No entanto quando não tratadas em tempo breve e dependendo do grau de intensidade, essas infecções podem evoluir para casos graves, podendo ameaçar a integridade do olho e produzir destruição tecidual significativa (UESUGUI et al., 2002) e o uso prolongado de antibióticos tópicos também pode levar a resistência desses microrganismos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral: Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de *Caesalpinia ferrea* Mart.

3.2 Específicos:

- Preparar o extrato bruto etanólico dos frutos da espécie em estudo;
- Realizar testes fitoquímicos para a determinação de compostos secundários;
- Testar *in vitro* a eficácia antimicrobiana do extrato bruto da planta frente a cepas ambulatoriais de cães com conjuntivite.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

Os frutos da planta foram coletados em área de caatinga (Agreste), na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), Pedra do Cachorro, no município de São Caetano, PE, nos meses de março e abril de 2012. Ramos fértil, com flores e frutos, foi coletado para identificação botânica, realizada pelo taxonomista, Marcelo Ataíde, tendo as amostras sido depositadas no Herbário UFP-Geraldo Mariz, da Universidade Federal de Pernambuco, sob o número de registro# 69.656 (figura 1).

Figura 1 - Exsicatas de *Caesalpinia ferrea* Mart. registradas no herbário UFP- Geraldo Mariz / UFPE



Fonte: Farias 2012.



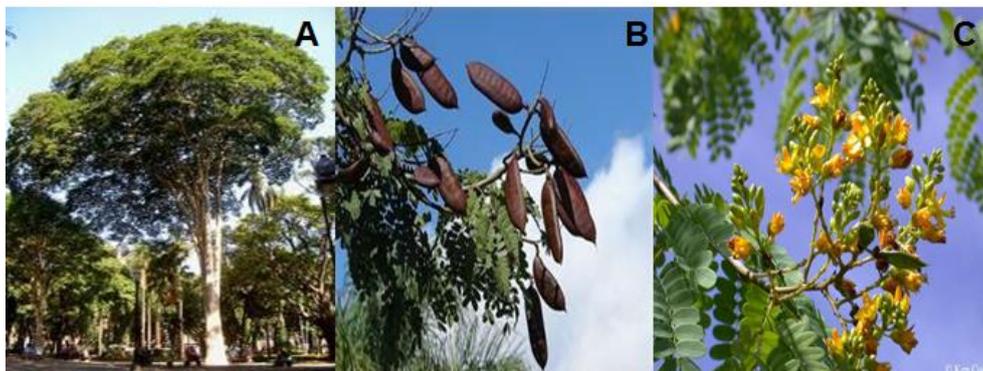
Fonte: Farias 2012.

4.1.1 Descrição botânica da espécie

Árvore de 20-30m de altura, caule liso; manchas brancas; cerne duríssimo; ramos peciolo e inflorescências puberulas; folhas bifornadas; até 17 cm de comprimento; pimelas 5 -11; opostas em 2-5 pares; atingindo 3,5-7,0 cm de comprimento; folíolos 8-24, oblongos ou ovalados até abovais; obtusos ou retusos; nítidos ou pubérculos na página anterior; inflorescência panícula compactada na extremidade dos ramos; tormentosa; botão floral obtusíssimo; globicisculo; segmentado do cálice levemente obliquos; flor, corola com 4 pétalas subiguais a 5º ou superior sésseis, ultrapassando muito o cálice, maior e mais longa que as outras; ovário sésseis coberto de pelos minúsculos, com 10 óvulos, frutos levemente estipitado quase reto ou levemente falcado; 5-7 cm de comprimento; 1,5 - 2,5 cm de largura (figura 2).

Distribuição geográfica: Matas do Piauí até São Paulo.

Figura 2 – Árvore (A), Fruto (B), Flor (C) de *Caesalpinia ferrea* Mart.
Fonte: <http://w.w.w.arvore.brasil.nom.br/pferro/index.htm>



4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO.

Os frutos foram desidratados em estufa a 40 °C, e posteriormente triturados em multiprocessador. O extrato etanólico foi obtido por percolação a frio por 72 horas, a proporção extrato/planta empregado foi de 2 ml de solvente (etanol P.A Merck®) para 1g do material vegetal (2:1), (MATOS,1997) em seguida a solução foi filtrada em papel de filtro e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, a temperatura de 45 °C, a 120 rotações por minuto (RPM). O resultado foi um extrato de cor âmbar, viscoso e bastante aromático, que foi armazenado em freezer a – 20 °C.

4.3 ABORDAGEM FITOQUÍMICA.

A pesquisa fitoquímica tem por finalidade conhecer os constituintes químicos da espécie, podendo indicar os grupos de metabólicos secundários relevantes da espécie em estudo. Os testes foram realizados segundo método orientado por Costa (1982).

Determinação de saponina

As saponinas foram avaliadas pelo teste da espuma, que consiste em adicionar de 0,5 g do fruto triturado a 5 ml de água destilada em um tubo de ensaio, agitar vigorosamente a mistura por cerca de 5 minutos, e deixar em repouso por 30 minutos. A presença de saponinas é confirmada pela persistência da espuma por mais de 30 minutos.

Determinação de taninos

Os taninos foram identificados através da técnica do cloreto férrico, que consiste em adicionar 0,5 g do fruto triturado a 10 ml de água destilada e agitar. Em seguida a mistura é filtrada e o licor coletado para o teste, adicionando-se algumas gotas de cloreto férrico a 1%, para verificar o eventual surgimento de coloração ou precipitado azul, indicativo da presença de taninos hidrolisáveis, e coloração ou precipitado verde para taninos condensáveis.

Determinação de alcalóides

A presença de alcalóides nos vegetais foi investigada por ensaios confirmativos específicos, que consistiram em colocar cerca de 0,5 g do fruto triturado em tubo de ensaio, que foi adicionado 10 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1% e aquecer a mistura em banho-maria à temperatura de 100 °C, por 2 minutos. A solução foi filtrada e o filtrado foi dividido e colocado em dois tubos de ensaios distintos. A um dos tubos de ensaio adicionou-se gotas do reagente de Dragendorff, e ao tubo seguinte, gotas do reagente de Mayer. A presença de alcalóides é confirmada através da formação de um precipitado laranja avermelhado com o reagente Dragendorff com o agente de Mayer o precipitado é esbranquiçado.

Determinação de flavonoides

Os flavonoides foram determinados pelo teste de Shinoda, que consiste em transferir 0,5 g do fruto triturado para um tubo de ensaio, adicionar 5 ml de metanol e agitar. A mistura é então filtrada, e ao filtrado adicionou-se 1 ml de ácido clorídrico (HCL) concentrado. Com o auxílio de uma pinça acrescentou-se a solução uma fita de magnésio de 1 cm. A confirmação da presença de flavonóides ocorre com o aparecimento de coloração rósea.

Determinação de terpenos e esteroides

A avaliação de terpenos e esteróides foi verificada através do teste de Liebermann-Buchard, que consiste em adicionar a um tubo de ensaio 0,5 g do fruto e 3 ml de clorofórmio, agitar e filtrar em papel de filtro. Ao filtrado adicionou-se algumas gotas de ácido sulfúrico concentrado pela parede do

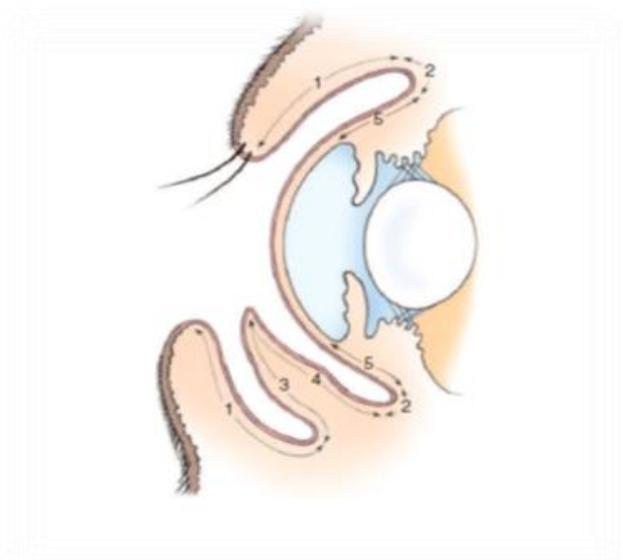
tubo. A confirmação da presença de terpenos e esteróides se dá com o aparecimento sucessivo de coloração rósea, azul e verde.

4.4 OBTENÇÕES DAS AMOSTRAS MICROBIANAS

Foram selecionados onze cães, com afecção ocular, oriundos do atendimento clínico-médico do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HOVET-UFRPE). Estiveram aptos a fazer parte da amostra, animais que após serem submetidos ao exame físico geral e oftalmológico, apresentavam alterações patológicas da mucosa tais como: secreções purulentas, hiperemia e sem uso prévio de qualquer antimicrobiano de uso tópico. Durante a coleta foram preenchidas fichas clínicas e oftálmicas, nas quais foram anotados dados da identificação do animal e tutor.

Concluídos os exames, foram coletadas amostras da parte inferior do saco conjuntival dos cães (Figura 3), utilizando-se swabs secos e estéreis, pressionando-os levemente através de movimentos rotatórios, tendo o cuidado de não contaminá-los com pelos e pálpebras. Os swabs foram remetidos ao Laboratório de Bacteriose dos Animais Domésticos/ Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE, para isolamento de bactérias aeróbias, e teste da atividade antimicrobiana do extrato bruto da planta.

Figura 3- 1-área da conjuntiva, 2-pálpebra, 3-fornix, 4-terceira pálpebra anterior, 5-terceira pálpebra posterior.



Fonte: Slattter, 2005

4.5 TESTE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Inicialmente no Laboratório, foi feita a avaliação do extrato bruto quanto à ausência de microrganismos contaminantes. Para isto foi coletada com alça de platina estéril uma alíquota do extrato, que foi semeada em ágar sangue de carneiro a 8%, e incubada em aerobiose a 37 °C por 24 horas em estufa bacteriológica. Após este período observou-se que não houve crescimento de nenhum microrganismo contaminante, confirmando que o mesmo estava estéril.

As amostras foram semeadas diretamente em placa de Petri contendo ágar sangue de carneiro a 8%, incubadas em aerobiose em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 a 48 horas. Após crescimento bacteriano, as colônias foram descritas quanto ao brilho, cor, tamanho, posteriormente com o auxílio de alça de platina estéril, as bactérias foram semeadas em tubos de ensaio de 5 mL contendo caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion), e incubados em estufa a 37 °C por 24 a 48 horas. Em seguida, quando já se observava turvamento dos tubos, realizaram-se as culturas. Para a avaliação do potencial da atividade antimicrobiana do extrato, foi utilizado o método de difusão em meio sólido, utilizando-se a técnica de poço (GROOVE e RANDALL, 1955) e a técnica de disco (BAUER et al., 1966). Foram pesadas 750 mg do extrato bruto que foi ressuspendido em 5 mL de etanol (P.A. 97,7%), resultando em uma solução a 15%. Para cada cepa foi preparada uma suspensão de bactérias com turvação de 0,5 na escala Mac Farland e distribuída uniformemente sobre a superfície do ágar Müller Hinton, com o auxílio de swab estéril. Um poço de 6 mm de diâmetro foi feito no ágar, o qual foi preenchido com 30 µL do extrato da planta. Também foi distribuído sobre o ágar um disco com o antibiótico padrão (ciprofloxacina), um disco (6 mm) impregnado com etanol (P.A.) a 70% (controle negativo) e dois discos (6 mm) impregnados com o extrato, sendo um deles seco e outro umedecido com 15 µL do extrato no momento da aplicação. O resultado foi avaliado pela formação de um halo de inibição em torno dos discos e dos poços, medido em milímetros. A sensibilidade das amostras foi considerada para medidas de halos inibitórios superiores a 12 mm (BEZERRA et al., 2009).

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato, utilizou-se a técnica de diluição em tubos. Uma colônia de cada cepa foi

inoculada em caldo BHI (Brain Heart Infusion), e incubada a 37 °C durante 24 horas. A partir deste inoculo, foi ajustada a turvação até 0,5 da escala Mc Farland em solução salina (0,85%) estéril. Em um tubo de ensaio contendo 1,7 mL de caldo Müeller Hinton, adicionou-se 150 µL do extrato e 150 µL do inoculo. Em seguida, foi transferido 1 mL para o tubo seguinte, e assim sucessivamente, até que se obtivesse quatro diluições do extrato: 7,5; 3,75; 1,87; e 0,93. Como controle negativo, pipetou-se 150 µL do inoculo e 150 µL de álcool a 70% em um tubo de ensaio com 1 mL do caldo Müeller Hinton. Após incubação por 24 horas a 37 °C, para posterior verificação da presença ou ausência de crescimento bacteriano. O experimento foi realizado em triplicata para cada cepa, sendo considerada como CIM, a menor concentração do extrato capaz de ocasionar inibição completa, do crescimento bacteriano.

A análise estatística dos resultados comparados com o antibiótico padrão foi realizada pelo teste t de Student para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A triagem fitoquímica para a determinação de classe de compostos metabólicos secundários indicou a presença de taninos hidrolisáveis e flavonoides (Tabela 1).

Tabela 1. Classe de metabólicos secundários identificados nos frutos de *Caesalpinia ferrea*.

<i>Compostos Metabólicos</i>	<i>Resultado</i>
Taninos hidrolisáveis	+
Saponinas	-
Flavonoides	+
Terpenos e esteroides	-
Alcaloides	-
Positivo (+)	Negativo (-)

Alguns trabalhos realizados com a planta também relatam a presença de compostos bioativos, corroborando os nossos achados. Vasconcelos et al., (2011), utilizando o Método de Cromatografia em Camada Delgada em placa de sílica gel, do extrato aquoso da entrecasca da espécie, obtiveram positividade para taninos hidrolisáveis (ácido gálico e elágico), flavonoides, saponinas, cumarina, fenilpropanoides, derivados de ácido cinâmico, alcaloides, triterpenoides, mono e sesquiterpenos. Frasson et al., (2003), pelo mesmo método, determinaram a ausência de saponinas e taninos totais no extrato bruto de caule. Já Sampaio et al. (2009) confirmaram pelo Método Azul da Prússia a presença de polifenóis no extrato bruto metanólico dos frutos.

Tradicionalmente os taninos são classificados segundo sua estrutura química em dois grupos, taninos condensados e taninos hidrolisáveis. Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substância, dentre essas se podem citar ação bactericida, fungicida, moluscicida, inibidora enzimática, inibidora da peroxidase de lipídios, sequestradora de radicais livres e ação antitumoral (SIMÕES et al., 2004). De acordo com Loguercio et al. (2005), o mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos explica-se por três hipóteses; a primeira pressupõe que os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexam com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo; e a terceira fundamenta-se na complexão dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano.

Os taninos hidrolisáveis são compostos que após hidrólise produzem carboidratos e ácidos fenólicos. São unidos por ligações éster-carboxila, sendo prontamente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas. São divididos de acordo com o produto de hidrólise, em galotaninos, que produzem ácido gálico, e em elagitaninos, que produzem ácido elágico. Estes taninos não são muito comuns em madeiras, quando comparados aos taninos condensados, mas são encontrados em abundância em folhas, frutos e vagens de dicotiledôneas, mas não têm sido detectados em monocotiledôneas (COSTA et al., 2008). Segundo CHANWITHEESUK et al. (2007) o ácido gálico é o princípio ativo da espécie

Caesalpinia mimosoides, responsável pela ação antimicrobiana desta planta. Estes compostos ou outros correlatos, provavelmente, podem estar presentes na *C. ferrea* apresentando esta ação.

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (GALLEGOS- OLEAS et al., 2008). Compreende uma série de compostos secundários que ocorrem exclusivamente em plantas superiores, sendo responsáveis na planta, pela coloração das flores (SIMÕES et al., 2004). É uma classe de substâncias que têm mostrado possuir uma ampla variedade de atividades farmacológicas. Diversos flavonoides têm propriedades antimicrobianas, e são conhecidos por ser sintetizados pelas plantas em resposta a infecção microbiana sendo que, em testes *in vitro*, apresentam ação antimicrobiana eficaz frente a muitos microrganismos. Provavelmente sua atividade é devido a sua habilidade em complexar com as paredes celulares bacterianas. Os flavonoides mais lipofílicos podem também romper as membranas microbianas (COWAN, 1999). Podem apresentar em vertebrados ainda ação antiinflamatória, analgésica, hipotensora, antitumoral, antioxidante, antiviral (SIMÕES et al., 2004), indutora da formação de hemoglobina, antiespasmódica e anti-hepatotóxica (DI STASI et al., 1996).

No que se refere ao isolamento bacteriano das amostras, observou-se a presença das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp.. Este resultado está em consonância com Santos et al. (2009) que ao avaliar no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT), 50 cães com afecções oculares dos quais, 28 com conjuntivite, observou que a bactéria de maior frequência nesta afecção foi *Staphylococcus intermedius* (24,07%) seguida de *Staphylococcus aureus* (15,74%). Segundo Slatter (2005) as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Streptococcus* spp. estão comumente associadas, a conjuntivite bacteriana primária. Tanto em machos como em fêmeas houve prevalência de bactérias do gênero *Staphylococcus*.

Para os testes *in vitro* da atividade antimicrobiana, os resultados demonstraram a eficácia do extrato bruto de *C. ferrea* frente à maioria dos microrganismos testado, com halos de inibição de 8 a 24 mm para o método de difusão em poço, 10 a 17 mm para o método de difusão em disco seco e 14 a

24 mm para disco úmido. Os melhores resultados foram obtidos pelo método de difusão em poço e disco úmido. O resultado mais significativo foi obtido na amostra 5 frente a cepa de *Staphylococcus* sp. que apresentou sensibilidade ao extrato e resistência ao antibiótico. Já na amostra 6, a ação inibitória do extrato foi superior a do antibiótico padrão para o mesmo microrganismo, como evidenciado na Tabela 3 e nas Figuras 3.3 e 3.2 respectivamente.

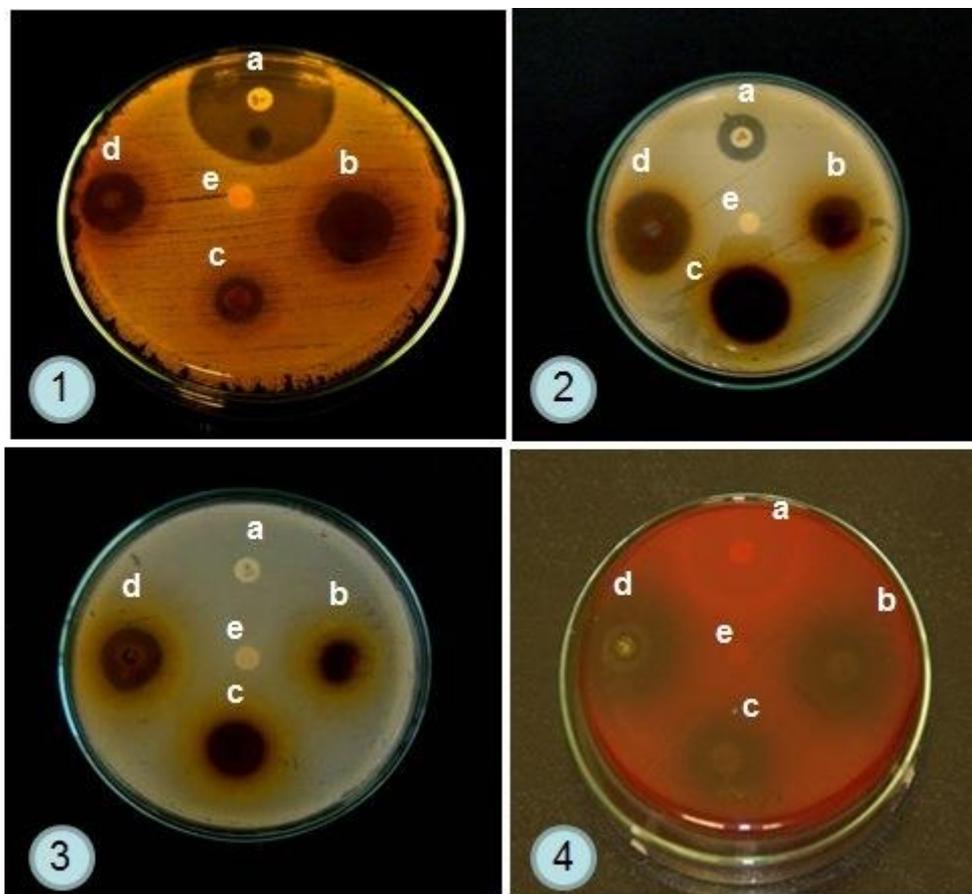
Tabela 2- Atividade antimicrobiana do extrato de *Caesalpinia ferrea* frente a 16 cepas bacterianas isoladas de casos de conjuntivite em cães.

Amostra	Microorganismo	Zona de inibição (mm)				
		Antibiótico / disco	Poço / extrato	Disco úmido / extrato	Disco seco / extrato	Controle / etanol
01	<i>Staphylococcus</i> sp.	25	14	15	10	0
	<i>Streptococcus</i> sp.	20	8	8	0 ^a	0
02	<i>Staphylococcus</i> sp.	34	17	17	11	0
	<i>Streptococcus</i> sp.	33	14	14	10	0
03	<i>Staphylococcus</i> sp.	33	23	24	17	0
04	<i>Staphylococcus</i> sp.	35	16	19	11	0
05	<i>Staphylococcus</i> sp.	0 ^a	15	14	10	0
	<i>Streptococcus</i> sp.	28	13	11	10	0
06	<i>Staphylococcus</i> sp.	15	24	24	15	0
07	<i>Streptococcus</i> sp.	30	23	17	16	0
08	<i>Staphylococcus</i> sp.	17	18	15	10	0
09	<i>Staphylococcus</i> sp.	30	24	20	16	0
10	<i>Staphylococcus</i> sp.	28	24	17	13	0
	<i>Streptococcus</i> sp.	21	10	10	0 ^a	0
11	<i>Staphylococcus</i> sp.	27	23	18	8	0
	<i>Streptococcus</i> sp.	20	10	10	7	0

^a Ausência de inibição

Figura 4- Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Caesalpinia ferrea* frente a cepas de *Staphylococcus* sp. em ágar Müller Hinton (1,2,3) e cepa de *Streptococcus* sp. em ágar sangue (4).

(a) ciprofloxacina, (b) disco seco, (c) disco úmido (d) poço, (e) etanol.



O resultado da análise estatística das bactérias tratadas com o extrato foi significativo. Para *Staphylococcus* sp. foi $p < 0,001454$ para disco seco, e para *Streptococcus* sp. foi $p < 0,001597$ para poço, $p < 0,000237$ para disco úmido e $p < 0,000189$ para disco seco. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato etanólico foi obtida na concentração 3,75 a qual, foi capaz de inibir as cepas analisadas.

Outros estudos não direcionados para a conjuntivite confirmaram a atividade antibacteriana de *C. ferrea*. Tomaz (2010) constatou pelo método de difusão em poço com modificações, que o extrato alcoólico do fruto apresentou atividade antibacteriana frente às cepas padrão e de campo de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp. *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp,

Bacillus sp e *Corinebacterium* sp obtidas de vacas com mastite, tendo como controle positivo a estreptomicina e a gentamicina. Pereira et al. (2009) também obtiveram positividade, ao avaliar a ação antimicrobiana do extrato etanólico da casca, pelo método de difusão em poço frente a *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina, utilizando como antibiótico padrão a penicilina e azitromicina. Sampaio et al. (2009) confirmaram a ação antimicrobiana do extrato hidrometanólico, dos frutos sobre cepas padrão de *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. oralis*, *Candidas albicans* e *Lactobacillus casei* pelo método de microdiluição em placas tendo como padrão inibitório a clorexidina.

Mimosa tenuiflora outra espécie medicinal da caatinga, também apresentou potencial atividade antimicrobiana. Pereira (2010) avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos etanólico da casca de *Mimosa tenuiflora* (jurema preta) e *Piptadenia stipulacea* (jurema branca), duas leguminosas comumente encontradas na caatinga, pelo método de difusão em disco frente às amostras bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. coletadas de leite de búfalas e vacas com mastite clínica e subclínica. O resultado demonstrou que o extrato de *M. tenuiflora* apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* sobre linhagens de *S. aureus*. Já o extrato etanólico de *P. stipulacea* no mesmo modelo utilizado, apresentou fraca atividade antimicrobiana. Segundo sugere a autora, isto ocorreu devido à pequena quantidade de tanino encontrada na casca da referida espécie. Bezerra (2008) que avaliou a fitoquímica e a atividade antimicrobiana dos extratos de *M. tenuiflora* e *P. stipulacea*, confirmou que ambas as espécies vegetais apresentaram em comum compostos como tanino, flavonas, catequinas leucoantocianinas, e saponinas, diferindo apenas na presença de triterpenóides e alcaloides em *M. tenuiflora*. E o mesmo confirmou que atividade antimicrobiana da jurema preta frente a cepas padrão de *Echerichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomona aeruginosa*, *Aeromonas caviae* e *Staphylococcus aureus* foi superior à observada com o extrato de jurema branca.

6 CONCLUSÕES

- O presente trabalho demonstrou que o extrato etanólico bruto dos frutos de *Caesalpinia ferrea* (pau-ferro) apresentou significativa ação antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp., obtidas de amostras ambulatoriais de cães com conjuntivite, quando comparado ao antibiótico comercial (ciprofloxacina), comprovando assim um de seus usos populares.
- Os estudos de triagem fitoquímica confirmaram a presença de flavonoides e taninos hidrolisáveis, compostos químicos com comprovada atividade antimicrobiana.
- Diversos estudos ainda necessitam ser realizados com o intuito de aprofundar o conhecimento acerca das diversas ações de *Caesalpinia ferrea*, e seu uso como forma de tratamento alternativo aos antibióticos tradicionais e, quem sabe no futuro o desenvolvimento de um fitofármaco.

REFERÊNCIAS

- AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade desinfetante de *Hipepericum caprifoliatum* Cham. e Shclecht-Gutiferae(escadinha, sinampismo), frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n.1, p. 64-69, 2008.
- BAUER, A. W.; PERRY, M. B. & KIRBY, W. M. M. 1996. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, American Journal of Clinical Pathology. p. 493-496.
- BEZERRA, D. A. C. et al. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* Wild.) Poir. sobre *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 814-817, 2009.
- BEZERRA, D. A. C. Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *peptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agrosilvopastoris no Semi-Árido) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.
- CAMARGO, M. T. L. A. **Plantas medicinais usadas em rituais afro-brasileiros**: estudos etnofarmacobotânico. São Paulo: Icone, 1998. 232p.
- CARVALHO, J. C. T. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 175 - 178, 1996.
- CAVALHEIRO, M. G. et al. Atividade biológica e enzimática do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 2B, p. 586-591, 2009.
- CHANWITHEESUK, A. et al. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1044-1049, 2007.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 1982, 1031p.
- COSTA, C. T. C. et al. Tanino e sua utilização em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n. 4, p. 108-116, 2008.
- COWAN, M. M. Plant Products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Ed. Columbia University, 1981.

DAL POZZO, et al. Atividade antimicrobiana de óleo essencial de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, Santa Maria, 2011.

DI STASI, L. C. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996. 230 p.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber**. São Paulo: UNESP, 2007. 131 p.

ESTEVAM, C. S. et al. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 299-303, 2009.

FERNANDES, V. F.; ROCHA, A.C. F. **Alquimia vegetal: como fazer sua farmácia caseira**. Rio de Janeiro: Nova Era, 1997. 2001 p.

FERREIRA, F. S. et al. Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos de *Rhizophora mangle* L.. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, Botucatu, v.13, n. 3, 2011.

FERREIRA, S. C.; CARVALHO, O. R.; NAKAJIMA, J. N. A. A família Asteraceae em um fragmento florestal. **Rodriguésia**, Viçosa, v. 60, n. 4, p. 903-943, 2009.

FERRONATO, R. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D. C. e *Baccharis uncinella* D.C.(Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 2, 2007.

FRANCO, E. A. P. A diversidade etnobotânica no quilombo olho d' água dos Pires, Esperantina, Piauí, Brasil. 2005, 104 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal do Piauí, Teresina.

FRASSON, A. P. Z.; BITTENCOURT, C. F.; HEINZMANN, B. M. Caracterização física- química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 35-39, 2003.

FREITAS, A. C. C. et al. Biological activities of LIBIDIBIA (*Caesalpinia ferrea* var.parvifolia (Mart.ex.Tul) L.P. Queiroz pod preparations, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2012, p. 1-7, 2012.

FREITAS, C. I. A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. Var ferrea) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.12, n. 3. p. 302 - 310, 2010

GALLEGOS-OLEAS, R. S. et al. Flavonoides de *Calotropes procera* R. Br. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu v.10, n.1, p. 29 - 33, 2008.

GELATT, K. N. **Manual de oftalmologia Veterinária**. São Paulo, 2003, 594 p.

GROOVE, D. C.; RANDAL, W. A. **Assay methods of antibiotic a laboratory manual medical encyclopedie**, Nova York, 1955. 238 p.

HARVEY, J. **Hierbas**. Barcelona: Ediciones Instituto Parramõn, 1978.

LEITE, G. L. D. et al. Efeito de boldo chinês do sabão de coco e da cipermetrina na mortalidade de pulgas em cachorro doméstico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 96-98, 2006.

LIMA, E.Q.; PEREIRA, M. S. V. Perfil de extrato de plantas sobre *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 3, n.1, p. 198-209, 2009.

LÔBO, K. M. S. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G.Don) D. F. Austin & Staples do semi-árido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n. 2, p. 227- 233, 2010.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana do extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzyum cumini* (L.) Skell). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002. 528 p.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1997.

MOORE, R. D. et al. Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stableid horses. **American Journal and Veterinary Researche**, v. 49, p. 773-7771988.

OLIVEIRA, A. F. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart.ex Tul.var. ferrea) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 302-310, 2010.

PENTLARGE, V. W. Doenças Oftálmicas externas e glaucoma. In: LORENZ, M. D.; CORNELIUS, L. M. ; FERGUNSON, D. C. **Terapêutica clinica em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. cap. 14.

PEREIRA, A. V. Estudo da ação dos extratos de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir. e *Peptadenia stipulaceae* (Benth) Ducke sobre cepas microbianas de mastite em búfalas. 2010.100 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

PEREIRA, A. V. et al. Perfil de extrato de plantas sobre *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 3, n.1, p.198-209, 2009.

PEREIRA, A.V. et al. Atividade anti-fúngica do neen e jurema – preta sobre cepas de *Candida* spp isolados de vacas com mastite subclínica no estado de Pernambuco, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 4, 2009.

PEREIRA, I. A. Avaliação do perfil de atividade de azitromicina frente a isolados bacterianos provenientes de processos infecciosos em animais de companhia. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

PEREIRA, L. P. et al. Polysaccharide fraction of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p.642-648, 2012.

PETER, V. M. et al. Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats. **Botânica Latinoamericana e Caribe, Plantas Mediciniais Aromáticas**, v. 7, n. 5, p. 268-272, 2008.

PHARMACIA BRASILEIRA. **Saúde elabora Relação de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**. Ano XII, n. 70, p. 77 – 78, 2009.

ROCHFORT, S.; PARKER, A. J.; DUNSHEA, F. R. Plant bioactives for ruminant health and productivity. **Phytochemistry**, v.6, p.299-322, 2008.

SAMPAIO, F. C. et al. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Matius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethofarmacology**, v. 124, p. 289-294, 2009.

SANTOS, A. P. L. Estudo fitoterápico da planta *Solanum paniculatum* L. (jurubeba) em ovinos naturalmente infectados por nematoides gastrintestinal no sertão paraibano. 2007. 59 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos.

SANTOS, L. G. F. et al. Microbiota conjuntival de cães hígdos e com afecções oftálmicas. **Acta Scientiae Veterinary**, Cuiabá, v. 37, n. 2, p. 165-169, 2009.

SILVA, M. A. R. et al. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 209-212, 2008.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. 173 p.

SIMÕES, C. Indicativo do potencial antioxidante de *Cleome rosea*. In: Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 5., 2001, Botucatu. **Anais...** Botucatu, SP: Ed. UNESP, 2001, p. 179.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre, editora da UFRGS/ UFSC, cap. XXIV, p. 615, 2004, 1102 p.

SLATTER, D. Lacrimal System . In:_____. **Fundamental of veterinary ophthalmolog** . W. B. Saunders Company, 2005, cap. VIII, p. 221 – 231, 686 p.

SOARES, S. F. **Estudo da repelência do extrato de plantas e do DEET (N, N-diethyl-M-toluamida) em *Amblyomma cajannense* (Acari: Ixodidae)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SOUSA, M. E. Flora bacteriana aeróbia conjuntival de cães clinicamente normais. 2001, 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SOUZA, A. A .; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana de *Aloysia gratíssima* (Gil et Hook) Tronc. (garupa erva-santa), usada na medicina tradicional do Rio Grande do Sul- Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 3, p. 23-29, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. São Paulo: Nova Odessa, 640 p. 2005.

TOMAZ, K. L. R. Atividade antimicrobiana do extrato alcoólico do fruto da *Caesalpinia ferrea* Mart. frente a bactérias causadoras de mastite bovina. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró.

TRESVENZOL, L. M. F. et al. Composição química do óleo essencial e atividade antimicrobiana da *Memora nodosa* (Bignoniaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, n.4, p. 513-519, 2009.

UESUGUI, E. et al. Identificação laboratorial dos patógenos oculares mais frequentes e sua suscetibilidade *in vitro* aos agentes microbianos. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 65, p. 339-342, 2002.

VASCONCELOS, C. F. B. A. G. Hipoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, n .9, p. 1-9, 2011.

WHITLEY, R. D.; MOORE, C. P. Microbiology of the equine eye in health and disease. **Veterinary Clinical of North American in Large Animal Practice**, v. 6, p. 451- 466, 1984.