

## ATIVIDADE BACTERICIDA DE *Azadirachta indica* E DE *Calendula officinalis* FRENTE A *Staphylococcus* sp. ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

Kelli Cristina Martini<sup>1</sup>  
Priscila Luiza Mello<sup>2</sup>  
Renata Olivotto Agostinis<sup>3</sup>  
Elaine Gil Moreschi<sup>4</sup>  
Lisiane de Almeida Martins<sup>5</sup>

### RESUMO

A mastite bovina é a doença mais importante da pecuária leiteira sendo responsável por grandes prejuízos econômicos em todo o mundo. Esta enfermidade consiste em um processo inflamatório da glândula mamária. Além dos prejuízos diretamente relacionados com as perdas de produção, o custo dos medicamentos empregados no combate às infecções também contribuem para o impacto econômico da mastite na produção leiteira. O *Staphylococcus* sp. é o principal agente envolvido em infecções intramamárias de fêmeas em lactação, sendo observada grande resistência aos antimicrobianos exigindo repetidos tratamentos, tornando o custo da produção inviável para o produtor. Enterotoxinas estafilocócicas são os principais agentes de intoxicação de origem bacteriana no homem e tem sido relatadas em vários surtos de doenças transmissíveis por alimentos. Considerando a importância da mastite, o difícil tratamento e a presença de componentes com atividade antimicrobiana no neen (*Azadirachta indica*) e na calêndula (*Calendula officinalis*), este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade bactericida *in vitro* da tintura de *Calendula officinalis* e de *Azadirachta indica*, a ação de antibióticos utilizados no tratamento da mastite bovina, bem como avaliar o sinergismo destas plantas com os antibióticos, frente à *Staphylococcus* sp. isolados de mastite bovina. Tanto a tintura de *A. indica* quanto a de *C. officinalis* apresentam atividade bactericida. A ação da *A. indica* foi potencializada pela associação com eritromicina e estreptomicina e da *C. officinalis* pela associação com ampicilina e estreptomicina.

**Palavras-chave:** mastite bovina, *Staphylococcus* sp., *Calendula officinalis*, *Azadirachta indica*, resistência bacteriana.

### BACTERIAL ACTIVITY OF *Azadirachta indica* AND *Calendula officinalis* VERSUS *Staphylococcus* sp. ISOLATED OF CATTLE MASTITIS

### ABSTRACT

Mastitis is the most important disease in dairy cattle, being responsible for big economic damages all over the world. Such disease consists of an inflammatory process in the mammary gland. Besides the damages directly related to production loss, the cost of medicines used to combat infections also contributes for the economical impact of mastitis in dairy cattle production. The *Staphylococcus* sp. is the main agent involved in intramammary infections of lactating females. It was observed hard antimicrobial resistance demanding repeated treatments, making the cost of production inviable to the producer. Staphylococcal

<sup>1</sup> Mestre em Ciência Animal pela Universidade Paranaense – UNIPAR.

<sup>2</sup> Doutoranda em Biologia Geral e Aplicada – Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu- SP.

<sup>3</sup> Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – Bolsista PIBIC – UNIPAR – Umuarama – PR.

<sup>4</sup> Mestre em Ciência Animal pela Universidade Paranaense - UNIPAR

<sup>5</sup> Docente do Mestrado em Ciência Animal e do Curso de Medicina Veterinária da UNIPAR – Umuarama – PR. E-mail: [lisiane.almeida.martins@gmail.com](mailto:lisiane.almeida.martins@gmail.com) – Rua da Amizade, 488 - Recanto Azul. Cep: 18. 603 – 030. – Telefone (14) 3882 – 7955. Botucatu – SP.

enterotoxins are the intoxication main agents of bacterium origin in man and have been reported in various outbreaks of diseases transmitted by food. Considering the importance of mastitis, the difficult treatment and the presence of components with Neen antimicrobial activity (*Azadirachta indica*) and of the calendula (*Calendula officinalis*), this study aimed to evaluate the *in vitro* bactericidal activity of tincture of *Calendula officinalis* and *Azadirachta indica*, the action of antibiotics used in the treatment of bovine mastitis, as well as evaluating the synergism of these plants with antibiotics against *Staphylococcus sp.* isolated from bovine mastitis. Both the dye *A. indica* as *C. officinalis* exhibit bactericidal activity. The action of *A. indica* was enhanced by combination with erythromycin and streptomycin and *C. officinalis* by association with ampicillin and streptomycin.

**Keywords:** cattle mastitis, *Staphylococcus sp.*, *Calendula officinalis*, *Azadirachta indica*, bacterial resistance.

## ACTIVIDAD BACTERICIDA DE *Calendula officinalis* Y *Azadirachta indica* CONTRA *Staphylococcus sp.* AISLADOS EN MASTITIS BOVINA

### RESUMEN

La mastitis bovina es la enfermedad más importante de la ganadería lechera y es responsable por enormes pérdidas económicas mundiales. Esta dolencia consiste en la inflamación de la glándula mamaria. Además de las pérdidas directamente relacionadas con la disminución de la producción, el costo de los medicamentos utilizados para combatir las infecciones también contribuye con el impacto económico desfavorable de la mastitis en la producción de leche. *Staphylococcus sp.* es el principal agente involucrado en casos de infecciones intra-mamarias en las hembras lactantes, siendo observada alta resistencia a los antimicrobianos lo que exige repetición de los tratamientos, por lo que el costo de producción se hace inviable para el productor. Las enterotoxinas de *Staphylococcus* son los principales agentes de la intoxicación bacteriana en los humanos y han sido reportadas en varios brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Teniendo en cuenta la importancia de la mastitis, la dificultad para su tratamiento y la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana en el Neen (*Azadirachta indica*) y la caléndula (*Calendula officinalis*), este estudio tuvo como objetivos evaluar la actividad bactericida *in vitro* de la tintura de *Calendula officinalis* y de *Azadirachta indica*; la acción de los antibióticos utilizados en el tratamiento de la mastitis bovina; y la evaluación del sinergismo de estas plantas con los antibióticos contra *Staphylococcus sp.* aislado en casos de mastitis bovina. Tanto el colorante *A. indica* como *C. officinalis* presentan actividad bactericida. La acción de *A. indica* se potencializó mediante la combinación con eritromicina y estreptomicina y la de *C. officinalis* por asociación con ampicilina y estreptomicina.

**Palabras chave:** mastitis bovina, *Staphylococcus sp.*, *Calendula officinalis*, *Azadirachta indica*, resistencia bacteriana.

### INTRODUÇÃO

Observando-se a produção leiteira dos países do continente sul-americano é notória a superioridade do Brasil, representando 50% de todo o volume produzido (1).

Nos últimos anos, a pecuária bovina apresentou consideráveis alterações no que se refere a ganho de produtividade, melhoria genética dos rebanhos, aspectos nutricionais e a aplicação de biotécnicas da reprodução, as quais promoveram um grande benefício aos

produtores. Entretanto, todos estes fatores desencadearam alguns problemas sanitários, dentre eles, a mastite.

A mastite bovina é a doença mais importante da pecuária leiteira sendo responsável por grandes prejuízos econômicos em todo o mundo (2). Esta enfermidade consiste em um processo inflamatório da glândula mamária, podendo alterar as características físico-químicas do leite, lesar o tecido glandular mamário (3) e permitir a transmissão de micro-organismos patogênicos ao homem e aos animais (4, 5). Estas alterações podem induzir o descarte precoce de animais de alto desempenho produtivo (6).

Além dos prejuízos diretamente relacionados com as perdas de produção, o custo dos medicamentos empregados no combate às infecções também contribuem para o impacto econômico da mastite na produção leiteira. Principalmente naquelas situações em que populações bacterianas resistentes exigem repetidos tratamentos, o custo da produção pode tornar-se inviável para o produtor (7).

O custo com diagnóstico, medicação, descarte de leite e a taxa de cura bacteriológica (não superior a 50% em infecções por *Staphylococcus* spp.), fazem com que o tratamento da mastite subclínica na lactação seja considerado, muitas vezes, anti-econômico (8).

O *Staphylococcus* sp. está envolvido em infecções intramamárias de fêmeas em lactação, sendo o principal agente causador de mastite em bovinos. Esse micro-organismo produz grande variedade de toxinas extracelulares que estão relacionadas à sua patogenicidade, além de oferecer grande resistência aos antimicrobianos (9).

Trabalhos realizados nas regiões nordeste, sudeste, sul e centro-oeste do país mostraram a predominância de *Staphylococcus aureus* sobre os demais agentes da doença (10). A presença de *Staphylococcus aureus* e suas toxinas no leite usado pelas indústrias e pelos laticínios representam sério problema. Segundo Lamaita et al. (11), enterotoxinas estafilocócicas são os principais agentes de intoxicação de origem bacteriana no homem e tem sido relatadas em vários surtos de doenças transmissíveis por alimentos.

De modo geral, observa-se que os *Staphylococcus* spp. apresentaram nível de resistência aos beta-lactâmicos, sendo que os antimicrobianos apontados como mais eficientes variaram bastante nas diferentes investigações, não sendo possível eleger um princípio ativo para todos os casos de mastite bovina (12).

Os antibióticos utilizados para tratamento das mastites causam grande preocupação para a indústria e para a saúde pública, e o seu resíduo no leite interfere com o processo de industrialização de muitos produtos lácteos como queijo e outros produtos fermentáveis (13). Sendo assim, é crescente a preocupação de tentativas de novas opções de tratamentos menos agressivos, principalmente nos animais de interesse zootécnico (14).

A utilização de plantas medicinais na medicina veterinária tem uma história milenar. O desenvolvimento desse conhecimento acompanhou a aprendizagem do homem nos cuidados da sua própria saúde, desta maneira agricultores e veterinários lançam mão de fitoterápicos para o tratamento da mastite bovina (15). A *Azadirachta indica*, originária do sudeste da Ásia, região de clima tropical, pertencente a família *Meliaceae*, introduzida no Brasil em 1993, possui diversas aplicações em especial com antisséptico, curativo e vermífugo (16). Além dessas propriedades o óleo extraído do seu fruto apresenta atividade antibacteriana, inclusive para *Staphylococcus aureus* (17).

A *Calendula officinalis* é uma planta originária do Egito, foi importada para a Europa no séc. XII e trazida para o Brasil no séc. XVIII, sendo cultivada como planta ornamental e medicinal (18), utilizada na medicina tradicional pelos seus efeitos antiinflamatórios, antisséptico e cicatrizante (19). Sua atividade antibacteriana parece depender, não apenas da presença de substâncias antimicrobianas no vegetal, mas também, das diversas fases de desenvolvimento do vegetal e das condições de extração (20), sendo que a resposta final pode ser resultante de efeitos sinérgicos, antagonistas, além de outros fatores interativos entre os diversos componentes (21).

Segundo Amorim (22), na medicina popular as plantas são utilizadas concomitantemente ao uso de medicamentos convencionais. Nesta associação as plantas medicinais e/ou subprodutos podem atuar inibindo ou intensificando o efeito terapêutico dos medicamentos convencionais, bem como não interferir na resposta (23).

Considerando a importância da mastite, o difícil tratamento e a presença de componentes com atividade antimicrobiana no neem e na calêndula, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade bactericida *in vitro* das tinturas de *A. indica* e *C. officinalis*, de antibióticos utilizados no tratamento da mastite bovina, bem como o sinergismo destas plantas com os antibióticos, frente à estirpes de *Staphylococcus* sp. isolados de mastite bovina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção das tinturas

Capítulos florais de *Calendula officinalis* e folhas de *Azadirachata indica* foram secos em estufa a 40°C e pulverizados a uma granulometria de 800 microns. Para obtenção das tinturas utilizou-se o método de extração por maceração, utilizando como líquido extrator o etanol 65° GL (v/v) para a *Calendula officinalis* e o álcool a 70% (p/p) para *Azadirachata indica*. O processo de maceração durou 21 dias sob agitação constante, para ambas as tinturas.

Decorrido o tempo de maceração, foi realizada a filtração e o armazenamento da tintura em frasco âmbar, obtendo-se uma concentração final de 20% para a tintura de neem e 10% para a tintura de calêndula (24).

### Antibióticos

Cada estirpe de *Staphylococcus* sp. foi testada frente a ampicilina (10 µg/mL), amoxicilina (10 µg/mL), eritromicina (15 µg/mL), enrofloxacin (5 µg/mL), estreptomicina (10 µg/mL), gentamicina (10 µg/mL), neomicina (30 µg/mL), tetraciclina (30 µg/mL). Estes princípios ativos foram selecionados para inclusão no estudo baseando-se nos tratamentos convencionais à campo. O estudo de observação de sensibilidade das cepas bacterianas frente aos antibióticos foi realizado pela técnica de difusão em meio sólido utilizando-se discos de papel filtro (25).

#### Ensaio microbiológico

Foram testados isolados de *Staphylococcus* sp. provenientes de mastite bovina clínica e subclínica da bacterioteca do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Paranaense, perfazendo um total de 43 amostras, sendo estas avaliadas em duplicata.

As cepas foram descongeladas, repicadas em agar sangue e incubadas a 37°C por 24 horas. Após verificado o crescimento de colônias de *Staphylococcus* sp., estas foram cultivadas em caldo nutritivo (Brain Heart Infusion) e incubadas por uma hora, verificando-se a turvação do meio de cultura. Estas suspensões foram padronizadas de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland correspondendo à concentração de aproximadamente 10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL). Cada uma das culturas foram submetidas a antibiograma com os princípios ativos selecionados, bem como feita a associação de cada um dos antibióticos com as respectivas tinturas, adicionando a cada disco de papel filtro 10µL. Como controle foi utilizado álcool 70°.

Após a incubação das placas à 37°C por 48 horas, foi observada a presença de halo de inibição bem como seu diâmetro, sendo esta mensurada em milímetros. Desta forma, pode-se verificar a atuação de cada uma das tinturas de forma individual e associadas aos antibióticos, possibilitando observar a presença ou não de sinergismo.

### Estatística

Para a análise de interpretação dos halos de inibição do crescimento de *Staphylococcus* sp. frente à antibióticos e à associação deste com tintura de *Azadirachta indica* e *Calendula officinalis* foi utilizado o teste de Anova e, para verificar a associação de resultados em amostras dependentes, o teste de Necmar, sendo considerado estatisticamente significativo  $P < 0,05$  para os dois testes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados dos antibiogramas observa-se uma grande variação no perfil de sensibilidade em todas as amostras testadas. As médias dos halos de inibição estão descritas na Tabela 1, bem como a interpretação destes resultados de acordo com CLSI (25). Destaca-se uma maior resistência à ampicilina, seguida da eritromicina.

Tabela 1. Média  $\pm$  desvio padrão dos halos de inibição (mm) do crescimento de *Staphylococcus* sp. frente à antibióticos e à associação destes com tintura de *Azadirachta indica* e *Calendula officinalis*. Umuarama, 2009.

	<i>Azadirachta indica</i>		<i>Calendula officinalis</i>	
	Halo	Interpretação	Halos	Interpretação
Álcool	0,21 <sup>a</sup> $\pm$ 1,94		0,21 <sup>a</sup> $\pm$ 1,94	
Planta	7,13 <sup>b</sup> $\pm$ 7,40		14,93 <sup>b</sup> $\pm$ 8,74	
AMP	27,11 <sup>c</sup> $\pm$ 12,26	R	27,11 <sup>c</sup> $\pm$ 12,26	R
Planta + AMP	27,51 <sup>c</sup> $\pm$ 11,14	R	29,48 <sup>c</sup> $\pm$ 8,13	S
AMO	30,15 <sup>c</sup> $\pm$ 12,17	S	30,15 <sup>c</sup> $\pm$ 12,17	S
Planta + AMO	29,96 <sup>c</sup> $\pm$ 11,49	S	32,62 <sup>c</sup> $\pm$ 9,40	S
ERI	25,93 <sup>c</sup> $\pm$ 9,06	S	25,93 <sup>c</sup> $\pm$ 9,05	S
Planta + ERI	29,00 <sup>d</sup> $\pm$ 8,69	S	27,68 <sup>c</sup> $\pm$ 9,12	S
ENO	27,78 <sup>c</sup> $\pm$ 7,20	S	28,01 <sup>c</sup> $\pm$ 7,20	S
Planta + ENO	28,14 <sup>c</sup> $\pm$ 7,63	S	28,30 <sup>c</sup> $\pm$ 7,74	S
EST	18,21 <sup>c</sup> $\pm$ 11,29	I	18,09 <sup>c</sup> $\pm$ 11,30	I
Planta + EST	21,93 <sup>d</sup> $\pm$ 10,81	I	23,61 <sup>d</sup> $\pm$ 10,97	S
GEN	24,99 <sup>c</sup> $\pm$ 8,11	S	24,99 <sup>c</sup> $\pm$ 8,11	S
Planta + GEN	25,27 <sup>c</sup> $\pm$ 7,66	S	26,74 <sup>c</sup> $\pm$ 7,21	S
NEO	24,03 <sup>c</sup> $\pm$ 7,16	S	24,05 <sup>c</sup> $\pm$ 7,15	S
Planta + NEO	25,12 <sup>c</sup> $\pm$ 8,36	S	24,99 <sup>c</sup> $\pm$ 7,16	S
TET	21,36 <sup>c</sup> $\pm$ 12,30	S	21,36 <sup>c</sup> $\pm$ 12,30	S
Planta + TET	24,71 <sup>c</sup> $\pm$ 9,81	S	25,92 <sup>d</sup> $\pm$ 8,65	S

Análise estatística: letras diferentes mostram resultados estatisticamente significantes no teste de Anova ( $p < 0,05$ ).

Interpretação segundo CLSI (2008).

AMP: ampicilina, AMO: amoxicilina, ERI: eritromicina, ENO: enrofloxacin, EST: estreptomicina, GEN: gentamicina, NEO: neomicina, TET: tetraciclina.

Estes dados são semelhante aos descritos por Machado, Correa e Marin (26), os quais analisaram 109 (14,5%) cepas de *Staphylococcus* coagulase negativos provenientes de mastite bovina, verificando que a resistência à penicilina foi a observação mais freqüente (93,5%) seguida de ampicilina (85,3%), tetraciclina (68,8%), estreptomicina (63,3%), eritromicina (61,4%), neomicina (58,7%), sendo que a amoxicilina/ácido clavulânico apresentou (46,7%).

Estes dados são diferentes dos apresentados por Nader Filho et al. (27) que realizaram o teste de sensibilidade in vitro pelo método Kirby-Bauer, utilizando penicilina (10UI), gentamicina (10 $\mu$ g), ampicilina (10  $\mu$ g), vancomicina (30  $\mu$ g), novobiocina (30  $\mu$ g), oxacilina (1  $\mu$ g), estreptomicina (10  $\mu$ g) e eritromicina (15  $\mu$ g), fazendo também associação dos antibióticos com os quimioterápicos em 72 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite de vacas com sinais de mastite 94,4 % foram sensíveis à estreptomicina, e somente 4,2% à

ampicilina. Verificou-se, também que nenhum dos princípios ativos agindo isoladamente, pode ser ativo contra qualquer das cepas experimentadas, notou-se que 72 (100%) das cepas testadas apresentaram resistência simultânea a pelo menos dois antibióticos e quimioterápicos.

Os resultados referentes a sensibilidade dos isolados analisados neste estudo frente à ação de antibióticos e da tintura de *Azadiractha indica* são mostrados na Tabela 1. Observa-se que os *Staphylococcus* sp. apresentaram maior sensibilidade à amoxicilina e maior resistência a estreptomicina.

Quando observada a atividade bactericida da *Azadiractha indica* isoladamente, observou-se um halo de inibição, confirmando uma atividade bactericida, entretanto quando associada a cada um dos antibióticos, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa na associação com eritromicina e estreptomicina.

Observou-se que a tintura de *Calendula officinalis* apresentou atividade antibacteriana, sendo esta atividade potencializada em algumas associações como no caso da ampicilina e da estreptomicina. Mudanças nas faixas de interpretação foram detectadas; quando associado à ampicilina passou de resistente para sensível e intermediário para sensível no caso da estreptomicina.

Os halos observados foram maiores quando comparados aos descritos por Pereira et al. (28) ao avaliar o extrato do neem diluído com água destilada nas proporções de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256 e 1:512 em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite de búfalas, tendo como base o diâmetro dos halos de inibição superiores a 12mm, observando que o extrato mostrou-se eficaz somente na concentração de 1:1.

Esta atividade bactericida foi descrita por Buffon et al. (29), os quais avaliaram in vitro a eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calendula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* no crescimento das bactérias da placa dental de 37 amostras como *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus*. Todas as culturas foram semeadas em placas de TSA e sobre a superfície foram colocados discos de papel filtro estéreis impregnados com 0,05 mL dos extratos das plantas. O extrato de *C. officinalis* apresentou um índice de inibição total e halo de inibição parcial de 16,4% e 45,9% respectivamente, sendo que em 37,8% não houve a presença do halo de inibição. Com isso, evidenciou-se que os extratos de *C. officinalis* apresentaram halos de inibição total com média em torno de 12,33mm, sendo estas, inferiores quando comparadas ao presente estudo que se obteve uma média de 14,93mm.

A atividade da *Calendula officinalis* observada foi descrita por Volpato et al. (30) através de estudos que comprovaram que os extratos hexano, diclorometano e acetato de etila de *Calendula officinalis* apresentam atividade inibitória contra bactérias Gram positivas e foram inativos contra as bactérias Gram negativas.

Burger et al. (31) avaliaram o efeito de uma pomada preparada artesanalmente com gordura animal e plantas medicinais, entre estas a *Calendula officinalis*, sobre feridas cirúrgicas de ratos. Para testar o efeito antibacteriano foi utilizado o método da placa de ágar com orifício. Os produtos foram testados frente a microorganismos isolados da pele dos próprios animais, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Observou-se que a intensidade de contaminação bacteriana nos meios ágar sangue e Mac Conkey não foi diferente entre os grupos e foram considerados semelhantes à microbiota normal dos ratos.

No presente estudo demonstrou-se a interferência da tintura de *Azadiractha indica* e *Calendula officinalis* na interpretação dos perfis de sensibilidade, os quais podem ser avaliados na Tabela 2.

Tabela 2. Frequências absolutas (N) e relativas (%) de amostras de *Staphylococcus* sensíveis a antibióticos isoladamente ou à associação antibiótico-tintura de *Azadiractha indica*. Umuarama, 2009.

Antibiótico	<i>Azadiractha indica</i>			<i>Calendula officinalis</i>		
	ATB	ATB + Tintura	P	ATB	ATB + Tintura	P
<b>Ampicilina</b>	46 (53,5%)	40 (46,5%)	0,1460	44 (51,1%)	42 (48,8%)	0,4545
<b>Amoxicilina</b>	17 (19,8%)	23 (26,7%)	0,1094	17 (19,7%)	69 (80,2%)	0,0386*
<b>Eritromicina</b>	32 (37,2%)	54 (62,7%)	0,0890	33 (38,3%)	53 (61,6%)	0,1508
<b>Enrofloxacina</b>	15 (17,4%)	71 (82,5%)	0,2864	24 (28,0%)	62 (72,0%)	0,07744
<b>Estreptomicina</b>	61 (70,9%)	25 (29,0%)	0,03171*	62 (72,0%)	24 (28,0%)	0,3593
<b>Gentamicina</b>	02 (2,3%)	84 (97,6%)	1,0000	02 (2,3%)	84 (97,6%)	0,5000
<b>Neomicina</b>	07 (8,1%)	79 (91,8%)	0,7266	07 (8,1%)	79 (91,8%)	0,7539
<b>Tetraciclina</b>	23 (26,7%)	63 (73,2%)	1,0000	16 (18,6%)	70 (73,2%)	0,0654

Análise estatística: Teste de Necmar

\*diferença estatisticamente

As associações dos antibióticos com as plantas estudadas mostrou um resultado significativo, como no caso da associação da estreptomicina com a *Azadiractha indica*. Verificou-se que 17 amostras inicialmente resistentes, tornam-se sensíveis quando associados a tintura, desta forma, pode-se ressaltar o sinergismo destes dois princípios ativos.

Quanto à eritromicina, houve uma tendência à significância, o que demonstra a necessidade de mais estudos na tentativa de desenvolver alternativas no difícil tratamento da mastite, principalmente no que se refere a estudos de cada um dos componentes das tintura da *Azadiractha indica*.

Em relação a tintura de *Calendula officinalis*, a ação foi favorável para a amoxicilina, já que das 17 amostras originalmente resistentes, 10 (58,8%) tornaram sensíveis, havendo uma tendência significativa para a tetraciclina.

A interferência de princípios ativos oriundo de plantas foi descrito por Oliveira et al. (32) estudando a interferência de óleos essenciais na concentração de 4% sobre a efetividade dos antibióticos ampicilina (10µg/mL), cefalotina (10µg/mL), cloranfenicol (30µg/mL), gentamicina (10µg/mL) e tetraciclina (30µg/mL), pela técnica de difusão em meio sólido utilizando discos de papel filtro embebidos com 20µL do óleo essencial, frente à cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, sendo que o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* apresentou sinergismo com ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina frente ao *Staphylococcus epidermidis* e, com relação a *Staphylococcus aureus*, houve diminuição da atividade inibitória de ampicilina, cloranfenicol e gentamicina.

Atualmente, uma das maiores dificuldades encontradas na produção leiteira, são os custos no tratamento, bem como estabelecer o princípio ativo mais adequado, considerando a seleção de bactérias resistentes pelo uso indiscriminado dos antibióticos. Sendo assim, este trabalho demonstrou a importância da utilização de métodos alternativos no tratamento da mastite, principalmente quando associados a tratamentos convencionais.

## CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a *Azadirachta indica* e a *Calendula officinalis* apresentam atividade bactericida frente à *Staphylococcus* sp. isolados de mastite bovina, podendo ser potencializada quando associadas aos antibióticos.

## COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANCA

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal da Universidade Paranaense, protocolado sob número 15454/2009.

## REFERENCIAS

- 1 Silva AS, Romero EA. Gerenciamento de custo da pecuária de leite em propriedade rural situada em Roncador – PR. Rev Agroneg Meio Ambient. 2009;2:68-85.
- 2 Blood DC, Radostitis OM. Clínica veterinária. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1989.
- 3 Domingues PF. Novas tendências no tratamento da mastite bovina. In: Anais do 2o Encontro de Pesquisadores em Mastite Bovina do Estado de São Paulo; 1996, Nova Odessa. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia; 1996. p.33-43.
- 4 Silva N. Diagnóstico de mastite em animais de importância econômica. In: Anais do 3o Encontro de Pesquisadores em Mastite; 1999, Botucatu. Botucatu: FMVZ – UNESP; 1999. p.51-5.
- 5 Zafalon LF, Amaral LA, Nader Filho A, Oliveira JVV. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e *stafilococos* coagulase positivos e negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. Napgama. 1999;6:4-6.
- 6 Langóni H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. Rev Educ Contin CRMV-SP. 2000;3:57-64.
- 7 Costa EO, Benites NR, Melville PA, Pardo RB, Ribeiro AR, Watanabe E. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. Rev Bras Med Vet. 1995; 17:156-8.
- 8 Costa EO. Uso de antimicrobianos na mastite. In: Sinosa HS, Gorniak SL, Bernardi MM. Farmacologia aplicada a medicina veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.501-59.
- 9 Matsunaga T, Kamata S, Kakiichi N, Uchida K. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. J Vet Med Sci. 1993;55:297-300.
- 10 Brito MAVP, Brito JRF. Produção científica brasileira sobre mastite bovina. In: Brito JRF, Bressan M. Controle integrado da mastite bovina. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL; 1996. p.68-96.



- 11 Lamaita HC, Cerqueira MMOP, Carmo LS, Santos DA, Penna CFAM, Souza MR. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2005;57:702-9.
- 12 Lange C, Cardoso M, Pianta C. Suscetibilidade a antimicrobianos de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina na grande Porto Alegre, Rio Grande do Sul (Brasil). *Arq Fac Vet UFRGS.* 1998;26:71-9.
- 13 Nóbrega DB, Langoni H, Joaquim JGF, Da Silva AV, Faccioli PY, De Matos AVR, et al. Utilização de composto homeopático no tratamento da mastite bovina. *Arq Inst Biol.* 2009;76:523-37.
- 14 Pontes Neto D, Lopes MO, Oliveira MCS, Nunes MP, Machinsk Jr M, Bosquiroli SL, et al. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do estado do Paraná. *Acta Sci Anim Sci.* 2005;96:145-51.
- 15 Schuch LFD, Wiest JM, Coimbra HS, Prestes LS, Toni L, Lemos JS. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. *Cienc Anim Bras.* 2008;9:161-9.
- 16 Martinez SS. Composição do nim. In: O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná; 2002. p.23-30.
- 17 Mancebo F, Hilje L, Mora GA, Salazar R. Biological activity of two neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) products on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Crop Prot.* 2002;21:107-12.
- 18 Ocioszynska I. Study of the chemistry of marigold (*Calendula officinalis* L.) inflorescence. *Herba Pol.* 1997;23:191-9.
- 19 Vidal-Ollivier E, Elias R, Faure F, Babadjamian A, Crespín F, Balasard G, et al. Flavonol glycosides from *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.* 1989;55:73-4.
- 20 Machado JO, Santos E, Lefèvre AFV. Atividade antibacteriana de extratos de *Bidens pilosa* L. *Rev Cienc Farm.* 1988;10:55-62.
- 21 Ramos A, Edreira A, Vizoso A, Betancourt J, López M, Décalo M. Genotoxicity of na extract of *Calendula officinalis* L. *J Ethnopharmacol.* 1988;61:49-55.
- 22 Amorim JA. Fitoterapia popular e saúde da comunidade: diagnóstico para proposta de integração nos serviços de saúde em Campina Grande, Paraíba [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 1999.
- 23 Nascimento GF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *J Bras Microbiol.* 2000;31:247-56.
- 24 Código Farmacêutico Brasileiro. Farmacopéia brasileira. 2ª ed. São Paulo: Gráfica Siqueira; 1959.

- 25 Clinical and Laboratory Standards Institute. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. Brasília: ANVISA; 2003.
- 26 Machado TRO, Correa MG, Marin JM. Antimicrobial susceptibility of coagulase Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. Arq Bras Med Vet Zootec. 2008;60:278-82.
- 27 Nader Filho A, Ferreira LM, Amaral LA, Rossi Junior OD, Oliveira RP. Sensibilidade antimicrobiana dos Staphylococcus aureus isolados no leite de vacas com mastite. Arq Inst Biol. 2007;74:1-4.
- 28 Pereira AV, Lôbo KMS, Bezerra DAC, Rodrigues OG, Athayde ACR, Mota RA, et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de jurema preta e neem sobre amostras de Staphylococcus sp. isoladas de mastite em búfalas. Arq Inst Biol. 2009;76:341-6.
- 29 Buffon MCM, Lima MLC, Galarda I, Cogo L. Avaliação da eficácia dos extratos de Malva sylvestris, Calendula officinalis, Plantago major e Curcuma zedoarea no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo "in vitro". Visão Acad. 2001;2:31-8.
- 30 Volpato AMM, Rios EM, Miguel MD, Sander PC, Miguel OG. Investigação da atividade antibacteriana de Calendula officinalis L. (Asteracea). Visão Acad. 2001;2:7-10.
- 31 Burguer ME, Ghedini PC, Dorigoni PA, Graça DL, Baldisserotto B, Almeida CE, et al. Cicatrização de feridas cutâneas em ratos tratados com pomada caseira à base de plantas medicinais. Rev Bras Plantas Med. 2003;5:91-7.
- 32 Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. Rev Bras Farmacogn. 2006;16:77-82.

**Recebido em: 17/11/2011**

**Aceito em: 09/04/2013**