

Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Medicina Veterinária

CAROLINE DE LIMA MORAES

**AVALIAÇÃO IN VITRO E TRATAMENTO DE FERIDAS DE PELE
CONTAMINADAS DE CÃES E GATOS COM O USO DE SPRAY À
BASE DE *Croton urucurana* Baill**

Uberlândia-MG

2017

CAROLINE DE LIMA MORAES

**AVALIAÇÃO IN VITRO E TRATAMENTO DE FERIDAS DE PELE
CONTAMINADAS DE CÃES E GATOS COM O USO DE SPRAY À
BASE DE *Croton urucurana* Baill**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Medicina
Veterinária da Universidade Federal
de Uberlândia como requisito parcial
à obtenção do grau de Médico
Veterinário.**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando
Antônio Ferreira**

Uberlândia-MG

2017

**AVALIAÇÃO IN VITRO E TRATAMENTO DE FERIDAS DE PELE
CONTAMINADAS DE CÃES E GATOS COM O USO DE SPRAY À BASE DE *Croton*
*urucurana Baill***

**Trabalho de conclusão de curso aprovado
como requisito parcial à obtenção do grau de
Médico Veterinário no Curso de Medicina
Veterinária da Universidade Federal de
Uberlândia (MG) pela banca examinadora
formada por:**

Uberlândia, 11 de julho de 2017

Prof. Dr. Fernando Antônio Ferreira, UFU/MG

Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima, UFU/MG

Ana Maria Santos Gomes, Médica Veterinária

AGRADECIMENTOS

A Deus por abençoar a minha trajetória na faculdade e por me dar forças nos momentos mais difíceis.

Aos meu pais que sempre estiveram ao meu lado, em especial à minha mãe que me acompanhou de perto durante toda a minha graduação.

Aos meus irmãos que mesmo longe sempre me ajudarem e sempre tinham uma palavra de conforto quando eu precisava.

Ao meu namorado pelo apoio, carinho, compreensão e paciência.

A todos os amigos e familiares que me acompanharam e me apoiaram durante a minha vida acadêmica

Ao meu professor orientador Dr. Fernando A. Ferreira pela paciência, pelo exemplo e por todo o conhecimento ensinado.

A minha co-orientadora professora Dr. Raquel Maria Ferreira de Sousa por todos os conhecimentos passados na área de química e por ceder o espaço do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais-UFU para realização de parte de minha pesquisa.

A mestranda Tiara da Costa Silva pela paciência e ajuda nos experimentos na área de química.

Ao meu co-orientador professor João Batista Ferreira dos Santos por todo o conhecimento transmitido acerca da planta e em sala de aula, e por ceder parte da planta usada neste trabalho.

Aos residentes do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LADOC) da UFU pela paciência e por todo o conhecimento transmitido, em especial à Caroline Lopes Queiroz por me acompanhar de perto durante quase toda a minha pesquisa.

A professora Anna Monteiro Correia Lima por ceder o espaço do LADOC-UFU e por todo aprendizado enquanto tutora do PET Medicina Veterinária.

Ao farmacêutico Rogério de Oliveira Silva, por todo seu conhecimento farmacêutico

Ao PET Medicina Veterinária que proporcionou o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

É comum o aparecimento de feridas dermatológicas em cães e gatos contaminadas por bactérias. Dentre elas, as mais encontradas neste tipo de lesão são as bactérias do gênero *Staphylococcus sp.*, sendo necessário o uso de substâncias antibacterianas para o tratamento dessas lesões. A *Croton urucurana* Baill popularmente conhecida como Sangra D'água é uma planta que vem sendo estudada pelas suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, analgésica e antidiarreica. Assim, este estudo foi realizado com o intuito de comprovar as ações antibacteriana e cicatrizante desta planta em feridas de pele contaminadas de cães e gatos. Na primeira fase do trabalho foi obtido a tintura mãe a partir da mistura da entrecasca da Sangra D'água e propilenoglicol, que foi utilizada na fabricação das pomadas e depois aplicada em dois animais como teste piloto. No primeiro animal, as feridas fecharam em 17 dias; já no segundo animal as feridas demoraram 32 dias para cicatrizar totalmente. Na segunda fase, foram desenvolvidos sprays em diferentes concentrações a partir da rediluição do extrato seco da entrecasca da planta em propilenoglicol e da mistura do látex da planta e propilenoglicol. No teste de sensibilidade in vitro, o extrato da entrecasca e o látex formaram halo de inibição contra diferentes bactérias, sendo que a concentração de 200.000 µg/ml foi a que apresentou o maior halo de inibição. Entretanto, devido à grande quantidade de matéria prima usada para a concentração mencionada, foi escolhido as concentrações de 25.000µg/ml e 50.000 µg/ml para fabricação dos sprays e para os seguintes antibiogramas. Foi coletado amostras de feridas de pele de animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, sob o consentimento dos proprietários, e logo após, foi realizado a cultura e o isolamento das bactérias das amostras, seguido de teste de sensibilidade a antimicrobianos para comprovar a atividade antibacteriana da planta frente as bactérias da amostra. De acordo com os resultados, escolheu-se o spray mais eficaz, o qual foi entregue ao proprietário para aplicação diária. O registro da evolução do tratamento das feridas com o spray foi realizado através de fotografias nas duas fases até o fechamento total das mesmas. Os antibiogramas demonstraram a atividade antibacteriana in vitro da planta e o tratamento das feridas com o spray demonstrou a propriedade cicatrizante da Sangra D'água.

Palavras-chave: Animais. Bactérias. Feridas. Sangra d'água. *Staphylococcus sp.*

ABSTRACT

It's really common the emergence of dermatologic wounds contaminated with bacterias in dogs and cats. Among the bacterias, the most commonly found on this type of wound are the bacterias from the *Staphylococcus sp.* genus. Thus, the treatment of these wounds needs to be with an antibacterial drug. The *Croton urucurana* Baill, popularly known as Sangra d'água is a plant that has been studied for its antiinflammatory, antioxidant, antibacterial, antifungal, analgesic and antidiarrheal properties. Therefore, this study was developed to verify its antibacterial and healing properties in infected wounds of dogs and cats. In the first phase, an ointment was made with the mother tincture, that was obtained from the inner bark and propylene glycol. This ointment was applied in two animals as a pilot project. In the first animal the wounds were healed in 17 days, and in the second animal the wounds healed completely in 32 days. In the second phase sprays were fabricated in different concentration, one with the redilution of the dry extract in propylene glycol, and the other with the plant's sap and propylene glycol. In the antibiogram, the inner bark's extract and the sap's extract formed a inhibition zones against different bacterias, being that the 200.000 µg/ml concentration formed the biggest inhibition zone. Although, due to the big quantity of the plant used to make this concentration, was chosen the 25.000µg/ml and the 50.000 µg/ml concentrations to fabricate the sprays and for the next antibiograms. Skin wounds' sample were collected from animals attended at Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, under the owner's consent, and after this, the sample cultivation and isolation was performed, and the antibiogram was done to verify the antibacterial activity of the plant against the bacterias from the sample. According to the results, the best spray was chosen, and it was given to the owner for daily application. The evolution of the treatment was follow up through photographs in both of the phases until the wounds were completely healed. The antibiotic sensitivity test evidenced the plant's antibacterial property, and the treatment of the wounds with the spray demonstrated the plant's healing property.

Keywords: Animals. Bacterias. Sangra d'água. *Staphylococcus sp.* Wounds.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	Pele.....	12
2.2	Microbiota da pele.....	12
2.3	<i>Staphylococcus sp</i>	13
2.4	Antibiograma.....	13
2.5	Croton urucurana Baill.....	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1	Primeira fase.....	16
3.1.1	Tintura mãe da Sangra d'água.....	16
3.1.2	Confecção das pomadas.....	17
3.1.3	Teste das pomadas.....	18
3.2	Segunda fase.....	18
3.2.1	Extrato seco da entrecasca da planta sangra d'água.....	18
3.2.2	Extrato em etanol 95% e separação das frações.....	18
3.2.3	Extrato aquoso do látex da Sangra d'água.....	19
3.2.4	Coleta das amostras.....	19
3.2.5	Cultura, isolamento e identificação das amostras.....	19
3.2.6	Escolha das concentrações para o antibiograma.....	20
3.2.7	Antibiograma pela técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer.....	23
3.2.8	Fabricação e aplicação dos sprays.....	25
4	RESULTADOS.....	26
4.1	Primeira fase.....	26
4.2	Segunda fase.....	28
4.2.1	Antibiogramas com cepa padrão.....	28
4.2.2	Antibiograma das frações.....	31
4.2.3	Cultura e Antibiogramas das amostras.....	32
4.2.4	Tratamento das feridas com o spray.....	38
5	DISCUSSÃO.....	46
6	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	APÊNDICE A- Termo de Consentimento.....	51

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografia 1- Exemplar da *Croton urucurana* Baill (Sangra d'água)

Fotografia 2- Filtração à vácuo para a obtenção da TM.

Fotografia 3- Amostras de 1 ml com diferentes concentrações do extrato.

Fotografia 4- Discos de 6mm de papel Millipore.

Fotografia 5- Discos impregnados com diferentes concentrações do extrato e impregnados com propilenoglicol.

Fotografia 6- Spray à base do extrato da entrecasca.

Fotografia 7- Ferida do animal 1: Dia 0

Fotografia 8- Ferida do animal 1: Dia 14

Fotografia 9 – Ferida do animal 2: Região cervical dia 0

Fotografia 10 – Ferida do animal 2: Pata dia 0

Fotografia 11 – Ferida do animal 2: Região cervical dia 15

Fotografia 12 – Ferida do animal 2: Pata dia 15

Fotografia 13– Ferida do animal 2: Região cervical dia 30

Fotografia 14 – Ferida do animal 2: Pata dia 30

Fotografia 15- Antibiograma com a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e diferentes concentrações do extrato.

Fotografia 16- Antibiograma com a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e diferentes concentrações do látex.

Fotografia 17- Ferida do animal 5: Dia 0

Fotografia 18- Ferida do animal 5: Dia 7

Fotografia 19- Ferida do animal 5: Dia 14

Fotografia 20- Ferida do animal 5: Dia 20

Fotografia 21- Ferida do animal 6: Dia 0

Fotografia 22- Ferida do animal 6: Dia 7

Fotografia 23- Ferida do animal 6: Dia 14

Fotografia 24- Ferida do animal 6: Dia 21

Fotografia 25- Ferida do animal 7: Dia 0

Fotografia 26- Ferida do animal 7: Dia 7

Fotografia 27- Ferida do animal 7: Dia 11

Fotografia 28- Ferida do animal 8: Dia 0

Fotografia 29- Ferida do animal 8: Dia 7

Fotografia 30- Ferida do animal 8: Dia 14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Cálculo utilizado para a diluição da concentração inicial do extrato e do látex para obtenção das demais concentrações.

Tabela 2- Cálculo utilizado para a diluição da concentração inicial das frações para obtenção das demais concentrações.

Tabela 3- Leitura do antibiograma com a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Tabela 4- Leitura do antibiograma com a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e as diferentes concentrações das frações: Etanol 98%, N-Butanol, Acetato de Etila, Diclorometano, Hexano e Água.

Tabela 5- Leitura dos antibiogramas com a bactéria do gênero *Staphylococcus sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* isolada do animal 3 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Tabela 6- Leitura dos antibiogramas com a bactéria *Proteus mirabilis* isolada do animal 4 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Tabela 7- Leitura do antibiograma com a primeira e segunda colônia do gênero *Staphylococcus sp.* isolada do animal 5 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Tabela 8- Leitura dos antibiogramas com a bactéria do gênero *Streptococcus sp.* e *Proteus penneri* isolada do animal 6 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Tabela 9- Leitura do antibiograma com a primeira e segunda colônia do gênero *Staphylococcus sp.* isolada do animal 6 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Tabela 10- Leitura do antibiograma com a bactéria do gênero *Staphylococcus sp.* isolada do animal 7 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Tabela 11- Leitura do antibiograma com a bactéria do gênero *Staphylococcus sp.* isolada do animal 8 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

1. INTRODUÇÃO

Pequenos animais, como cães e gatos, apresentam com certa frequência ferimentos na pele provenientes de acidentes, traumas, brigas, dentre outros. Essas lesões se contaminam facilmente uma vez que existem vários microorganismos presentes na pele íntegra, no meio ambiente, e até mesmo na boca dos animais e que podem chegar à ferida pela lambedura. O principal microorganismo encontrado é a bactéria do gênero *Staphylococcus sp.*, por ser uma bactéria comensal que pode ser encontrada na pele de animais sadios (QUINN, 2005). Por isso, para o tratamento dessas lesões, faz-se necessário o uso de antissépticos locais ou até de antibióticos sistêmicos dependendo do tipo de lesão. (PENNA et al, 2011)

O uso indiscriminado de antibióticos na prevenção e tratamento de doenças tanto em animais quanto em humanos faz com que as bactérias se tornem cada dia mais resistentes aos antibióticos. Isto é um problema grave não só para medicina veterinária, mas também para a saúde pública (MOTA, et al., 2005). Uma vez que os tratamentos convencionais geralmente não funcionam para bactérias resistentes, sendo necessário o uso de medicamentos mais fortes e por um período de tempo prolongado.

Uma alternativa para a diminuição do uso de antibióticos seria o uso de fitoterápicos, que já são reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) por serem uma alternativa de baixo custo, eficaz e seguro se utilizados de maneira correta, na espécie adequada e na dosagem certa. Uma das plantas que podem ser utilizadas para a fabricação de fitoterápicos é a *Croton Urucurana* Baill, também conhecida como Sangra d'água. Ela é conhecida por suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana e analgésica, por isso ela pode ser utilizada em feridas infectadas para acelerar a cicatrização das mesmas (SALATINO et al, 2007).

Com o presente trabalho, objetivou-se evidenciar as propriedades cicatrizante e antibacteriana in vitro da Sangra d'água, assim como propor a fabricação de um fitoterápico utilizando a planta, podendo assim, oferecer um método alternativo, não doloroso, de baixo custo e eficaz para o tratamento de feridas de pele contaminadas ou não de cães e gatos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Pele

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano e a primeira linha de defesa contra patógenos. Ela serve como uma barreira física, química e microbiológica (TORTORA et al.,2005). Nos animais não é diferente, a pele apresenta essas mesmas funções e arquitetura básica: epiderme, membrana basal, derme, folículos pilosos e glândulas anexas.

Contudo, a pele de cães e gatos se difere da pele de humanos em alguns quesitos. Por exemplo, na pele com pêlos, a epiderme dos mamíferos é muito mais fina do que a de humanos. Entretanto, a epiderme pode apresentar outras diferenças dependendo da espécie animal, raça, idade e do habitat (SOUZA et al.,2009).

A epiderme, pele mais fina e externa, é constituída por um epitélio estratificado, pavimentoso e ceratinizado, e subdividida em estrato basal (estrato germinativo), estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo (estrato disjunto). Além disso, é formada por quatro tipos celulares: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (SOUZA et al.,2009).

Já a derme dos cães e gatos é dividida em superficial e profunda e é formada por tecido conjuntivo, principalmente na forma de fibras entrelaçadas, pelos elementos celulares dérmicos e pelos apêndices epidérmicos (folículos pilosos e glândulas anexas). É na derme que estão localizados vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e músculo eretor do pêlo. (SOUZA et al.,2009).

2.2. Microbiota da pele

A microbiota natural da pele apresenta bactérias residentes e bactérias comensais. As bactérias residentes não causam prejuízo à saúde animal, ao contrário, elas protegem a superfície da pele e pêlos. Algumas bactérias residentes comumente encontradas são: *Micrococcus sp.*, *Streptococcus B-hemolítico* e *Acinetobacter sp.* (GREENE, 2006)

Já as bactérias comensais vivem em equilíbrio com as bactérias residentes, mas são oportunistas diante de alguma situação adversa, ou seja, traumas, imunossupressão, alergias, doenças metabólicas e endócrinas, e até outra infecção bacteriana, fúngica ou parasitária, podem

proliferar mais e adentrar na pele através de alguma solução de continuidade. As principais bactérias reponsáveis por esse quadro em pequenos animais são as bactérias do gênero *Staphylococcus sp.* (QUINN,2005). Entretanto, outras bactérias podem ser isoladas juntamente como *Proteus spp*, *Pseudomonas spp.* e *Escherichia coli.* (GREENE, 2011)

2.3 *Staphylococcus spp.*

Os estafilococcus são cocos gram positivos com aproximadamente 1µm de diâmetro. O próprio nome já diz *staphyle* e *kokkos* que vem do grego e significa cachos de uva, uma vez que bactérias deste gênero formam agrupamentos em forma de cachos de uva. A maioria é anaeróbia facultativa e catalase positiva. São imóveis, não formam esporos e são oxidase negativa. Bactérias deste gênero são comumente encontradas na pele de animais e humanos, membranas mucosas do trato digestivo, respiratório superior e urogenital inferior. Como também são facilmente encontradas no meio ambiente (QUINN,2005).

Nos animais eles são de grande importância clínica uma vez que são patógenos primários ou secundários em várias doenças, por exemplo: *Staphylococcus aureus* é o principal causador de mastite em diversos animais; *S. hyicus* pode causar epidermite exsudativa em suínos; *S. gallinarum* pode causar infecções de pele de aves domésticas e o *S. schleiferi* é apontado como patógeno primário ou secundário em otites externas (QUINN,2005).

Já a bactéria *Staphylococcus intermedius* é apontada como patógeno primário em piodermatites, foliculites e furunculoses bacterianas profundas, e pode ser secundário em otites externas, dermatites piotraumáticas e outras condições supurativas (GROSS, 2009).

2.4 Antibiógramas

Existem alguns métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais, como o método de difusão em disco, método de macrodiluição e microdiluição. Através destes métodos é possível determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI), que consiste na determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste. Contudo a CMI pode variar de acordo com as características próprias da planta, a época e a forma de colheita da amostra, a forma que foi produzido o extrato da planta, os microrganismos, as cepas e o método utilizado. Sendo assim, ainda não existe um método padrão

para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (OSTROSKY et al., 2008).

Segundo a NCCLS (2003), os testes de sensibilidade pelo método de difusão em discos são indicados antes de estabelecer uma terapia antimicrobiana para combater um processo infeccioso, sempre que a sensibilidade do agente não possa ser predita de maneira confiável com base na identificação do organismo. Principalmente quando se acredita que o organismo causador da infecção é um agente capaz de demonstrar resistência aos agentes antimicrobianos usados na rotina da clínica.

Além disso, o antibiograma é útil tanto na clínica de pequenos animais quanto na área de produção animal, visando estabelecer qual é o melhor antimicrobiano e a melhor concentração a ser utilizada contra o agente infeccioso.

2.5 *Croton Urucurana* Baillon

O Brasil é um país com uma vasta diversidade de plantas medicinais, uma delas é a *Croton Urucurana* Baill, da família das Euphorbiaceae. Ela é também conhecida como Sangra d'água, Sangue de dragão ou Sangre de Drago por apresentar um látex avermelhado, que lembra sangue, e que é obtido através do corte da casca da planta. Já o termo água, se dá pelo habitat onde a planta é encontrada, em beira de rios e em matas ciliares. (GUIMARÃES E SECCO, 2010). A Sangra d'água apresenta-se na forma de árvore a arvoreta (4-15m de altura) (Fotografia 1). Sua época de floração é de dezembro a junho e é encontrada nos estados de: Acre, Maranhão, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Além disso, ela pode ser encontrada também no Uruguai, Bolívia, Argentina, Paraguai, Equador e Peru (GUIMARÃES E SECCO, 2010).

A química das espécies de *Croton* abrange: terpenos, principalmente diterpenos e triperpenos; óleos voláteis contendo mono e sesquiterpenos; diferentes classes de alcalóides; substâncias fenólicas como flavonóides, lignóides e proantocianidinas (SILVA, 2016). Cada um desses compostos tem uma ação diferente, por exemplo, os terpenos tem ação antioxidante, anti-inflamatória, antiparasitária, antimicrobiana, antiviral, entre outras (CARVALHO; FONSECA, 2006, PADUCH et al., 2007). Já os compostos fenólicos tem atividade anti-inflamatória, antitumorais, atividade estrogênica, antioxidante e no tratamento de doenças coronárias (PRAIA; SILVA; QUEIROZ, 2014). Por isso a *Croton urucurana* é utilizada no tratamento de reumatismo,

câncer, úlceras, infecções, para acelerar a cicatrização de feridas e em outras doenças (SALATINO et al, 2007).

Fotografia 1- Exemplar da *Croton urucurana* Baill (Sangra d'água)



Fonte: A autora

Cada parte da Sangra d'água é efetiva contra um tipo de bactéria. O extrato feito a partir do látex da planta é efetivo contra a *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*. Já o extrato obtido a partir das folhas e etanol é eficaz contra a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* e *Salmonella typhimurium*. Por último, o extrato feito a partir da entrecasca da planta e etanol mostra-se eficaz contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* (OLIVEIRA et al, 2008). Dessa forma, a parte da planta que deve ser utilizada depende do tipo de bactéria que se pretende combater.

Muniz et al. (2012), realizou um experimento com o látex da *Croton Urucurana* Baill no tratamento de feridas cutâneas, feitas cirurgicamente em ratos, em que se comparou a velocidade de cicatrização das feridas tratadas com látex e das feridas tratadas com solução salina estéril (NaCl

0,9%). Porém não houve diferença significativa entre a cicatrização do grupo controle e a do grupo tratado. Esse resultado pode ter sido ao fato de que a ferida foi realizada cirurgicamente e não estava inicialmente contaminada.

Já Soldera et al. (2010) realizou vários antibiogramas pelo método de difusão em disco com o látex da Sangra d'água diluído em água destilada, álcool de cereais, acetona e o látex puro, com as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Sendo que no primeiro momento o látex utilizado foi retirado fora da época da floração e posteriormente foi feito com o látex retirado na época de floração. Com esse experimento os autores concluíram que o látex retirado fora da época da floração e diluído em qualquer um dos solventes utilizados ou utilizado puro, tem eficiência apenas contra a *S. aureus*, sendo que o látex diluído em água destilada apresentou o maior halo. Porém, o látex não apresentou atividade contra as bactérias *P. aeruginosa* e *E. coli*. Além disso, o látex colhido na época da floração não apresentou atividade contra nenhuma das bactérias.

Gurgel (2000) também realizou vários experimentos in vivo a fim de comprovar a atividade antidiarreica da planta. O autor administrou o látex da sangra d'água diluído em água destilada, via oral para ratos e camundongos após a administração de uma substância diarreica, e ao final do estudo ele comprovou que o látex da sangra d'água, de fato, apresentava uma atividade antidiarreica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Primeira fase

A primeira fase deste trabalho, realizada juntamente com um farmacêutico, constitui-se na fabricação da pomada feita a partir da entrecasca da planta com propilenoglicol obtendo a tintura mãe(TM), sendo aplicada em feridas de pele contaminadas, como teste piloto.

3.1.1 Tintura mãe da Sangra d'água

A tintura mãe(TM), que é obtida utilizando o vegetal fresco ou dessecado e um insumo inerte, foi feita a partir da entrecasca da planta Sangra d'água, que foi limpa (retirada a parte mais externa),

picada, secada à sombra por sete dias e moída. Neste estudo, foi utilizado o propilenoglicol por ser menos agressivo quando em contato com a pele. Além disso, segundo Faleiro et al.(2009), graças a sua atividade emoliente, é bastante utilizado em formulações farmacêuticas, além de não possuir efeito nos processos de cicatrização e epitelização da pele de ratos. A TM foi feita no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Química da Madeira da Universidade Federal de Uberlândia.

A TM foi preparada usando a mesma metodologia do estudo de Gomes (2014) a partir da mistura de 150g da planta moída com 450ml de propilenoglicol, sendo armazenada e foi agitada uma vez ao dia durante sete dias. Após esse período foi realizada a primeira filtração a vácuo da mesma, obtendo assim o extrato da planta com propilenoglicol (Fotografia 2). Em seguida, foi acrescido propilenoglicol à massa da planta que sobrou e a mistura foi armazenada novamente. Este processo foi realizado novamente no décimo quarto e no vigésimo primeiro dia. (FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011)

Fotografia 2- Filtração à vacuo para a obtenção da TM.



Fonte: A autora

3.1.2 Confecção das pomadas

Inicialmente foi feita a pomada usando a TM da sangra d'água em diferentes concentrações (10, 20, 30 e 40%) e o q.s.p. Finalizado esse processo, as pomadas foram armazenadas em embalagens apropriadas.

3.1.3 Teste das pomadas

Foram utilizados dois (2) animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFU) para o teste da pomada, sendo que a aplicação foi feita apenas após a explicação do projeto aos proprietários e com consentimento dos mesmos. A pomada utilizada nos dois casos foi a de concentração 20% e a evolução do tratamento foi feita através de fotografias.

3.2. Segunda fase

A segunda fase desse projeto consistiu na cultura e o isolamento da bactéria, seguido pelo antibiograma e a escolha da melhor concentração do spray, para então realizar o tratamento das feridas. Além disso, visto a dificuldade dos proprietários ao aplicar a pomada nos animais foi feito o produto apenas sob a forma de spray. Para obter um produto mais efetivo, a preparação do extrato foi diferente da primeira fase e ainda foi produzido o spray à base do látex da planta e propilenoglicol.

3.2.1 Extrato seco da entrecasca da planta sangra d'água

Foi utilizado na referida fase a mesma metodologia da primeira fase para a produção da tintura mãe, entretanto, o solvente utilizado foi o álcool etílico absoluto, para melhor extração do princípio ativo da planta. Após a obtenção da tintura mãe, o solvente foi evaporado usando o evaporador rotatório a pressão reduzida, uma vez que o álcool pode ser um solvente tóxico aos animais. Já a água presente foi removida por liofilização, obtendo assim o extrato seco.

3.2.2. Extrato em etanol 95% e separação das frações

Para realização das frações, foi preparado o extrato seco da sangra d'água em etanol 95% usando a mesma metodologia acima descrita. Após a confecção deste extrato foi feita a solubilização do mesmo em 100 mL de metanol:água (9:1) e após foram feitas as partições líquido-líquido em polaridade crescente. Com auxílio de um funil de separação, foram obtidas as frações hexano (H) e diclorometano (D). Após esse procedimento, o solvente remanescente da fração metanol:água foi evaporado por meio de um evaporador rotatório. Em seguida, para obtenção das frações acetato de etila (AE), n-butanol (B) e água (A), essa fração foi ressuspensa em água e colocada novamente no funil de separação. Ao final, todas as partições tiveram os solventes removidos por rotoevaporação, sendo a água removida por liofilização.

3.2.3 Extrato aquoso do látex da Sangra d'água

Para a confecção do extrato aquoso a partir do látex da Sangra d'água, foi coletado o látex da planta o qual foi refrigerado e posteriormente uma fração foi diluída em propilenoglicol e outra fração em água destilada.

3.2.4 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas de seis cães atendidos no HV-UFU sob o consentimento dos proprietários após o esclarecimento sobre o projeto. As feridas dos animais apresentavam um aspecto vivo, e quando apresentavam crostas, estas eram retiradas e era coletado o material abaixo delas. Primeiramente foi realizada a limpeza do ferimento, com gaze estéril umedecida com soro fisiológico e gaze estéril seca, depois com o auxílio de um suabe estéril, foi coletado uma amostra da lesão de pele dos animais, a qual foi colocada imediatamente após a coleta em meio de transporte Stuart.

3.2.5 Cultura, Isolamento e Identificação das amostras

Após a coleta, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC-FAMEV-UFU). Na Capela de Fluxo Laminar do laboratório, as amostras foram esgotadas em meio Ágar Sangue enriquecido com sangue de carneiro a 10% e em meio MacConkey e depois foram incubadas à 37°C por 24-48 horas para posterior análise. Após esse procedimento o suabe foi colocado em meio de enriquecimento de tioglicolato e armazenado em estufa à 37°C por 24 horas, para crescimento bacteriano, caso não ocorresse a formação de colônias nas placas de Ágar Sangue e MacConkey.

Após 24 horas, as colônias formadas foram isoladas em meio Ágar Sangue e MacConkey para identificação e armazenadas novamente na estufa a 37°C por 24 horas. Após o isolamento, foi realizada a fixação da bactéria na lâmina para posterior coloração de gram. As lâminas foram observadas ao microscópio, no aumento de 100x, com óleo de imersão, para a identificação das bactérias. Todos esses procedimentos foram realizados de acordo com o Módulo I do Manual da ANVISA (2000).

Primeiramente foi feita a análise fenotípica da colônia quanto a coloração, odor e morfologia, e posteriormente a análise microscópica. Com a identificação de colônias formadas por coccus

gram + foi realizado o teste de catalase. As amostras catalase + com presença de hemólise no ágar Sangue foram reisoladas em ágar Manitol e feita a prova de coagulase para confirmar se eram *Staphylococcus aureus*. Já as amostras catalase + que não apresentavam hemólise eram classificadas como bactérias do gênero *Staphylococcus spp.* Todos os procedimentos para identificação das bactérias foram realizados de acordo com o Módulo V do Manual da ANVISA (2004).

Caso a bactéria fosse coccus gram +, catalase -, realizava-se as provas bioquímicas para diferenciação entre *Streptococcus spp.* e *Enterococcus spp.* As bioquímicas utilizadas foram teste de tolerância a NaCl a 6,5% e prova de Bile Esculina.

Sendo que a bactéria um bastonete gram -, era classificada em lactose + ou - de acordo com as características da colônia em meio MacConkey e depois era passada na prova OF glicose para confirmar se era fermentadora ou oxidativa. As bactérias fermentadoras foram passadas em bioquímicas para a identificação de enterobactérias como: prova de oxidase, fermentação e produção de gás em vermelho de fenol, meio Citrato de Simmons, meio Uréia de Christensen, Fenilalanina, Lisina, e meio SIM- para verificar motilidade, formação de H₂S e prova do indol. As bactérias oxidativa foram passadas em provas de ágar uréia e arginina para identificação de bactérias do gênero *Pseudomonas spp.*

3.2.6. Escolha das concentrações para o antibiograma

Para a confirmação do efeito antibacteriano da Sangra d'água in vitro foi realizado antibiogramas com cada uma das bactérias que foram isoladas das feridas dos animais. Contudo, antes da realização dos antibiogramas foi determinado diferentes concentrações do extrato seco que seriam testadas através dos cálculos presentes na Tabela 1. Como solvente foi utilizado o propilenoglicol.

Tabela 1- Cálculo utilizado para a diluição da concentração inicial do extrato e do látex para obtenção das demais concentrações.

Concentração(µg/mL)	Volume da fração retirada da concentração de 200.000 µg/mL (µL)	Volume de propilenoglicol (µL)
200.000	1.000	-
100.000	500	500
50.000	250	750
25.000	125	875
10.000	50	950

Fonte: A autora

Para o cálculo da massa necessária do extrato da *Croton Urucurana*, par prepara uma solução de 200.000 µg/mL e volume de 5 mL de propilenoglicol, valeu-se da equação:

$$[] = m/V \text{ ou } m = [] \times V$$

$$m = 200.000 \text{ µg/mL} \times 5\text{mL} = 100.000 \text{ µg} = 1 \text{ g do extrato da } \textit{Croton Urucurana}$$

Cálculo do volume da fração retirada da concentração de 200.000 µg/mL

Para uma concentração de 100.000 µg/mL:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$100.000 \times 1.000 = 200.000 \times V_2$$

$$V_2 = 500\mu\text{L}$$

Para uma concentração de 50.000 µg/mL:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$50.000 \times 1.000 = 200.000 \times V_2$$

$$V_2 = 250\mu\text{L}$$

Para uma concentração de 25.000 µg/mL:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$25.000 \times 1.000 = 200.000 \times V_2$$

$$V_2 = 125\mu\text{L}$$

Para uma concentração de 10.000 µg/mL:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10.00 \times 1.000 = 200.000 \times V_2$$

$$V_2 = 50\mu\text{L}$$

Após os cálculos, foi feita a diluição do extrato seco em um béquer previamente autoclavado e as amostras de 1mL foram colocados, com o auxílio de uma pipeta automática, em um tubo Eppendorf de 2 mL também previamente autoclavado (Fotografia 3). Os mesmos cálculos e procedimento foram realizados para a diluição do látex.

Fotografia 3- Amostras de 1 mL com diferentes concentrações do extrato.



Fonte: A autora

Foi realizado também o antibiograma com cada uma das frações da Sangra d'água para verificar se algum dos compostos teria maior potencial antibacteriano que o outro. Já para a diluição das mesmas foi utilizado como solvente o DMSO (dimetilsulfóxido) já que algumas frações não foram completamente diluídas em propilenoglicol. Os cálculos utilizados foram os mesmos, porém a concentração inicial utilizada foi de 100.000 µg/mL. Assim dilui-se 0,25g de cada partição em 2,5 mL de DMSO (Tabela 2).

Tabela 2- Cálculo utilizado para a diluição da concentração inicial das frações para obtenção das demais concentrações.

Concentração(µg/mL)	Volume da fração retirada da concentração de 100.000 µg/mL (µL)	Volume de DMSO (µL)
100.000	1000	-
50.000	500	500
25.000	250	750
10.000	100	900

Fonte: A autora

3.2.7 Antibiograma pela técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer.

Após a determinação das concentrações, foi realizado o antibiograma com a cepa padrão estabilizada da *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) para verificação da concentração mais efetiva e posteriormente foi realizado o antibiograma com a cepa padrão estabilizada da *Escherichia coli* (ATCC 25922). Após a determinação das melhores concentrações, foi realizado os outros antibiogramas com cada uma das bactérias encontrada nas feridas.

Primeiramente foram cortados discos de papel Millipore de aproximadamente 6mm de diâmetro, colocados em um béquer, lacrados e autoclavados (Fotografia 4). Em seguida, esse béquer foi aberto dentro da Capela de Fluxo Laminar, sendo retirado um disco e colocado dentro

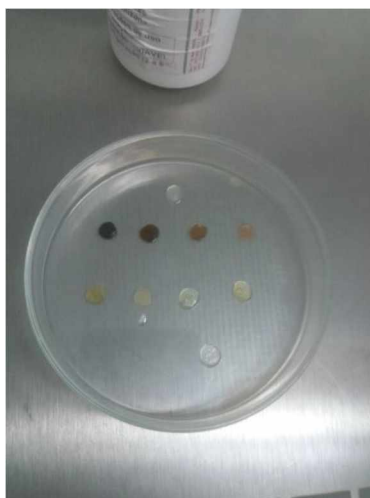
de cada um dos eppendorfes com diferentes diluições. Estes discos permaneceram dentro da solução por três minutos e depois retirados e colocados em uma placa de petri autoclavada, a qual foi levada a estufa a 37°C por cinco a dez minutos a fim de fazer a fixação da solução nos discos (Fotografia 5).

Fotografia 4- Discos de 6mm de papel Millipore



Fonte: A autora

Fotografia 5- Discos impregnados com diferentes concentrações do extrato e impregnados com propilenoglicol.



Fonte: A autora

Enquanto isso, foi retirado uma alçada da cepa padrão da *Staphylococcus aureus* que foi diluída em solução salina estéril até atingir a concentração 0.5 da escala McFarland e depois, com

o auxílio de um swabe estéril, essa suspensão foi semeada no ágar Mueller Hinton. Logo após foram retirados os discos da estufa e esses foram colocados na placa de acordo com as suas concentrações. Foram utilizados como controle positivo Amoxicilina+ Ácido Clavulânico 30mcg e como controle negativo um disco impregnado com propilenoglicol, e nas partições, foi utilizado o disco impregnado com DMSO como controle negativo. A seguir, a placa foi colocada na estufa a 37°C e a leitura realizada após 16 a 18 horas. Todos os procedimentos seguidos na realização do antibiograma foram feitos segundo o Manual da NCCLS (2003).

3.2.8 Fabricação e aplicação dos sprays

De acordo com o resultado dos antibiogramas foi escolhido as diferentes concentrações a serem testadas nos animais na forma de spray. Os sprays com o extrato seco foram fabricados apenas com a diluição do extrato seco em propilenoglicol. Já na confecção do spray com látex, primeiro foi feita a diluição do material, e depois foi feita a filtração do mesmo para remover qualquer partícula sólida presente na solução. Posteriormente, as soluções foram colocadas em embalagens plásticas brancas de 20mL com válvula spray sendo previamente limpas e identificadas de acordo com o material presente (Fotografia 6).

Fotografia 6- Spray à base do extrato da entrecasca.



Fonte: A autora

Após o resultado dos antibiogramas, a ferida foi limpa com gaze estéril e solução fisiológico (0,9%) e em seguida aplicado o spray escolhido na ferida dos animais (dia 0). Esse procedimento foi realizado pela autora para demonstrar ao proprietário como deveria ser feito. Posteriormente, foi solicitado ao proprietário, repetir esse procedimento diariamente até a cicatrização total da

ferida. O registro da evolução do tratamento foi feito através de fotografias tiradas nos dias 0, 7, 15 e 30, ou até a remissão total da ferida. Todos os animais que fizeram uso do spray da *Croton urucurana* Baill utilizaram exclusivamente o spray, ou seja, eles não estavam sob o uso de nenhum outro medicamento.

4. RESULTADOS

4.1 Primeira fase

O animal 1 era um cão macho de 4 anos que apresentava lesões eritematosas em maior parte na região ventral e foi utilizada a pomada de sangra d'água de concentração igual a 20%. A evolução do tratamento pode ser vista nas fotografias 7 e 8, onde se observa o fechamento completo das lesões com 17 dias.

Fotografia 7- Ferida do animal 1: Dia 0



Fonte: Cedida por Ana Maria S. Gomes

Fotografia 8- Ferida do animal 1: Dia 14



Fonte: Cedida por Ana Maria S. Gomes

O animal 2 era um gato macho que apresentava alguns ferimentos na região cervical e na pata posterior esquerda. O tratamento foi feito também com a pomada na concentração de 20%. A evolução do tratamento pode ser vista nas fotografias 9 a 14, observando o fechamento completo das lesões com 32 dias de uso da pomada.

Fotografia 9 – Ferida do animal 2:
Região cervical dia 0



Fonte: Cedida por Ana Maria S. Gomes

Fotografia 10 – Ferida do animal 2:
Pata dia 0



Fonte: Cedida por Ana Maria S. Gomes

Fotografia 11 – Ferida do animal 2:
Região cervical dia 15



Fonte: Cedida por Ana Maria S. Gomes

Fotografia 12 – Ferida do animal 2:
Pata dia 15



Fonte: Cedida por Ana Maria S. Gomes

Fotografia 13 – Ferida do animal 2:
Região cervical dia 30



Fonte: Cedida por Ana Maria S. Gomes

Fotografia 14 – Ferida do animal 2:
Pata dia 30



Fonte: Cedida por Ana Maria S. Gomes

4.2 Segunda fase

4.2.1 Antibiógramas com cepa padrão

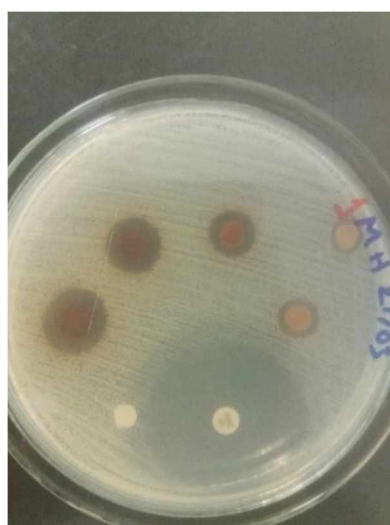
Primeiramente foi feito um antibiograma com a cepa padrão da *S. aureus* ATCC 25923 e o extrato da entrecasca nas concentrações de 10.000, 5.000, 2.500, 1.000 e 500 $\mu\text{g/mL}$, porém houve o crescimento de halo apenas na concentração de 10.000 $\mu\text{g/mL}$, mostrando que neste caso a CMI

foi de 10.000 µg/mL. Depois disso, decidiu-se usar as concentrações de 200.000, 100.000, 50.000, 25.000 e 10.000 µg/mL tanto para o extrato quanto para o látex.

Em seguida, foi feito um antibiograma com o látex diluído em água destilada e *S. aureus* ATCC 25923. Porém, houve a formação de apenas um halo de 8mm na concentração de 200.000 µg/mL, nas outras concentrações não houve formação de halo. Já o látex diluído em propilenoglicol apresentou um halo de 8mm apenas na menor concentração (10.000 µg/mL) e nas outras concentrações apresentou halos maiores (Tabela 3). Portanto, decidiu-se realizar os outros antibiogramas apenas com o látex e o extrato da entrecasca diluídos em propilenoglicol.

A partir do antibiograma com a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, o extrato (Fotografia 15), e o látex da Sangra d'água (Fotografia 16), viu-se que o extrato nas concentrações de 200.000, 100.000 e 50.000µg/mL formaram maiores halos de inibição que o látex. Já nas concentrações 25.000 e 10.000 µg/mL ambos apresentaram halos de inibição do mesmo tamanho contra a bactéria (Tabela 3). Já no antibiograma com a cepa padrão de *Escherichia coli* ATC 25922 não houve a formação de halo em nenhuma das concentrações do extrato e do látex. A leitura dos antibiogramas foram realizadas de acordo com a normas do NCCLS (2003).

Fotografia 15- Antibiograma com a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e diferentes concentrações do extrato.



Fonte: A autora

Fotografia 16- Antibiograma com a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e diferentes concentrações do látex.



Fonte: A autora

Tabela 3- Leitura do antibiograma com a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Concentração(µg/mL)	Tamanho do halo de inibição (mm)	
	Extrato	Látex
200.000	14	10
100.000	12	9
50.000	10	9
25.000	9	9
10.000	8	8
Amoxicilina+ Ácido Clavulânico*	30	36
Propilenoglicol	0	0

*Controle positivo

Fonte: A autora

Após estes resultados e considerando a grande quantidade da planta usada nas concentrações de 200.000 e 100.000 µg/mL preferiu-se fazer os outros antibiogramas e fabricar os sprays apenas com as concentrações 50.000 e 25.000 µg/mL do extrato e do látex.

4.2.2 Antibiograma das frações

Tabela 4- Leitura do antibiograma com a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e as diferentes concentrações das frações: Etanol 98%, N-Butanol, Acetato de Etila, Diclorometano, Hexano e Água

Concentração(µg/mL)	Tamanho do halo de inibição (mm)					
	Etanol 98%	N-Butanol	Acetato de Etila	Diclorometano	Hexano	Água
100.000	10	9	9	17	0	12
50.000	9	7	0	15	0	11
25.000	7	0	0	10	0	10
10.000	0	0	0	9	0	10
Amoxicilina+ Ácido Clavulânico*	30	30	50	50	30	30
DMSO	0	0	0	0		

Fonte: A autora

A partir do antibiograma com as frações da planta foi possível observar que a fração Diclorometano foi a que apresentou os maiores halos de inibição (Tabela 4), ou seja, esta fração apresentou a maior atividade antibacteriana in vitro. Em contrapartida, a fração Hexano não apresentou nenhuma atividade antibacteriana in vitro contra a cepa padrão de *Staphylococcus aureus*.

4.2.3 Cultura e Antibiógramas das amostras

Na amostra do animal 3 houve o crescimento de duas colônias que após análise foram identificadas como *Staphylococcus sp.* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foi então realizado o antibiógrama que apresentou os resultados na Tabela 5. Nos dois antibiógramas o látex se mostrou mais eficiente que o extrato da entrecasca, sendo que este não mostrou qualquer atividade contra a *Pseudomonas aeruginosa*.

O spray mais adequado para este animal, portanto, seria o spray com látex na concentração de 50.000 µg/mL. Entretanto, não foi possível aplicar o spray no animal, pois o mesmo teve que ser submetido a uma cirurgia, e foi necessária a administração de antibiótico no pós cirúrgico.

Tabela 5- Leitura dos antibiógramas com a bactéria do gênero *Staphylococcus sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* isolada do animal 3 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Concentração(µg/mL)	Tamanho do halo de inibição(mm)			
	Bactéria do gênero <i>Staphylococcus sp.</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Extrato	Látex	Extrato	Látex
50.000	9	10	0	10
25.000	8	9	0	9
Amoxicilina+ Ácido Clavulânico*	40	-	23	-
Propilenoglicol	0	0	0	0

Fonte: A autora

Já na amostra do animal 4 foram isolados *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp.* e *Pseudomonas sp.* Não houve nenhuma formação de halo no antibiograma para a *Klebsiella sp.* e *Pseudomonas sp.*, contudo houve formação de halo do extrato da entrecasca contra o *Proteus mirabilis* (Tabela 6).

O melhor spray para este animal portanto seria o spray com o extrato da entrecasca na concentração de 50.000 µg/mL. Entretanto não foi possível aplicar o spray no animal, pois o mesmo foi diagnosticado com infecção de urina e teve que ser submetido à antibioticoterapia.

Tabela 6- Leitura dos antibiogramas com a bactéria *Proteus mirabilis* isolada do animal 4 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Concentração(µg/mL)	Tamanho do halo de inibição (mm)	
	Extrato	Látex
50.000	9	0
25.000	8	0
Amoxicilina+ Ácido Clavulânico*	23	-
Propilenoglicol	0	0

Fonte: A autora

Na amostra colhida do animal 5 foram isoladas duas colônias diferentes do gênero *Staphylococcus spp.* No antibiograma, o látex da planta na concentração de 50.000 µg/mL mostrou-se mais eficiente que o extrato contra ambas as bactérias (Tabela 7). Por isso, foi utilizado o spray nessa concentração para o tratamento das feridas.

Tabela 7- Leitura do antibiograma com a primeira e segunda colônia do gênero *Staphylococcus sp.* isolada do animal 5 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Concentração(µg/mL)	Tamanho do halo de inibição(mm)			
	Primeira colônia do gênero <i>Staphylococcus sp.</i>		Segunda colônia do gênero <i>Staphylococcus sp.</i>	
	Extrato	Látex	Extrato	Látex
50.000	10	11	12	16
25.000	10	9	12	9
Amoxicilina+ Ácido Clavulânico*	28	-	37	-
	0	0	0	0
Propilenoglicol				

Fonte: A autora

Na amostra do animal 6 foram identificadas após as análises as bactérias: *Streptococcus sp.*, *Proteus penneri* e duas colônias diferentes de *Staphylococcus sp.* No primeiro antibiograma o látex teve um maior halo de inibição comparado ao extrato, em ambas as concentrações contra a *Streptococcus sp.* Já no segundo antibiograma apenas o extrato produziu halo contra o *Proteus penneri* (Tabela 8). No terceiro antibiograma, o extrato na concentração de 50.000 µg/mL foi o que apresentou maior halo contra a *Staphylococcus spp*, comparado o extrato do látex. Já no último antibiograma o látex na concentração de 50.000 µg/ml apresentou um maior halo comparado ao extrato. (Tabela 9). Com esses resultados optou-se por tratar a ferida com o extrato na concentração de 50.000 µg/mL.

Tabela 8- Leitura dos antibiogramas com a bactéria do gênero *Streptococcus sp.* e *Proteus penneri* isolada do animal 6 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Concentração(µg/mL)	Tamanho do halo de inibição(mm)			
	Bactéria do gênero <i>Streptococcus sp.</i>		<i>Proteus penneri</i>	
	Extrato	Látex	Extrato	Látex
50.000	9	13	11	0
25.000	9	11	10	0
Amoxicilina+ Ácido Clavulânico*	50	-	24	-
	0	0	0	0
Propilenoglicol				

Fonte: A autora

Tabela 9- Leitura do antibiograma com a primeira e segunda colônia do gênero *Staphylococcus sp.* isolada do animal 6 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Concentração(µg/mL)	Tamanho do halo de inibição(mm)			
	Primeira colônia do gênero <i>Staphylococcus sp.</i>		Segunda colônia do gênero <i>Staphylococcus sp.</i>	
	Extrato	Látex	Extrato	Látex
50.000	11	10	16	17
25.000	9	9	13	11
Amoxicilina+ Ácido Clavulânico*	40	-	24	-
Propilenoglicol	0	0	0	0

Fonte: A autora

Na amostra analisada do animal 7 houve o crescimento de apenas uma bactéria do gênero *Staphylococcus sp.* No antibiograma houve formação de halo de inibição apenas do extrato da entrecasca, sendo que o tamanho do halo foi o mesmo nas duas concentrações (Tabela 10). Portanto foi utilizado o extrato de 50.000 µg/mL para o tratamento da ferida.

Tabela 10- Leitura do antibiograma com a bactéria do gênero *Staphylococcus sp.* isolada do animal 7 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Concentração(µg/mL)	Tamanho do halo de inibição (mm)	
	Extrato	Látex
50.000	9	0
25.000	9	0
Amoxicilina+ Ácido Clavulânico*	60	-
Propilenoglicol	0	0

Fonte: A autora

Na última amostra, do animal 8, houve o crescimento de apenas uma bactéria do gênero *Staphylococcus sp.* No antibiograma, o maior halo de inibição formado foi o do extrato na concentração de 50.000 µg/mL (Tabela 11), por isso foi utilizado o spray à base do extrato nesta concentração para o tratamento das lesões.

Tabela 11- Leitura do antibiograma com a bactéria do gênero *Staphylococcus sp.* isolada do animal 8 e as diferentes concentrações do extrato e do látex da Sangra d'água.

Concentração(µg/mL)	Tamanho do halo de inibição (mm)	
	Extrato	Látex
50.000	9	8
25.000	8	0
Amoxicilina+ Ácido Clavulânico*	40	-
Propilenoglicol	0	0

Fonte: A autora

4.2.4 Tratamento das feridas com o spray

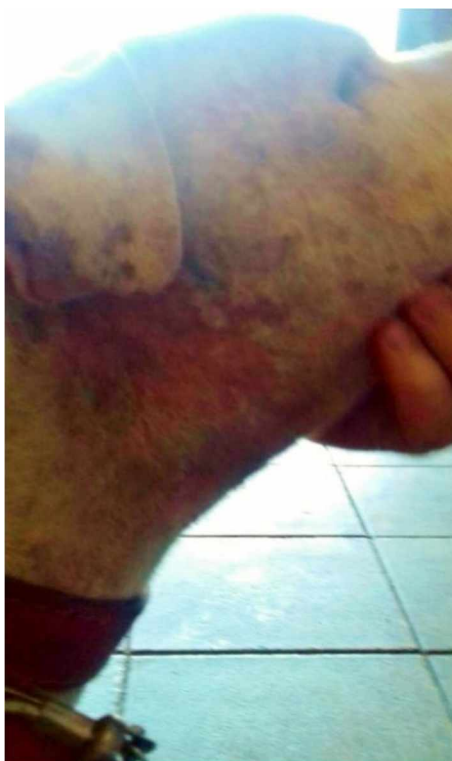
O animal 5 era fêmea de aproximadamente 5 anos e apresentava uma lesão na face do lado direito. Foi usado no tratamento da ferida o spray à base do látex da planta na concentração de 50.000 µg/mL. A evolução do tratamento pode ser vista nas fotografias 17 a 20, notando o fechamento da ferida após 20 dias de aplicação do produto.

Fotografia 17- Ferida do animal 5: Dia 0



Fonte: A autora

Fotografia 18- Ferida do animal 5: Dia 7



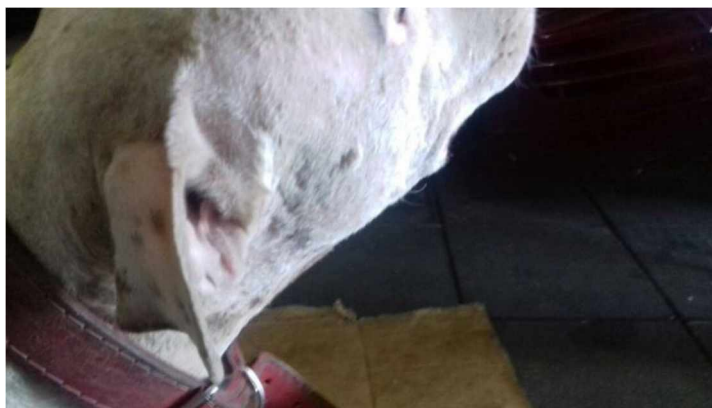
Fonte: A autora

Fotografia 19- Ferida do animal 5: Dia 14



Fonte: A autora

Fotografia 20- Ferida do animal 5: Dia 20



Fonte: A autora

Já o animal 6 era um cão macho de aproximadamente 5 anos e apresentava uma ferida no dorso próximo à cauda. Foi utilizado no tratamento o spray à base do extrato da entrecasca da planta na concentração de 50.000 $\mu\text{g/ml}$. Porém, até a conclusão deste trabalho, ou seja, 30 dias após o início do tratamento, a ferida não havia se fechado completamente.

Fotografia 21- Ferida do animal 6 no dia 0



Fonte: A autora

Fotografia 22- Ferida do animal 6: Dia 7



Fonte: A autora

Fotografia 23- Ferida do animal 6: Dia 14



Fonte: A autora

Fotografia 24- Ferida do animal 6: Dia 21



Fonte: A autora

O animal 7 era um cadela fêmea de 10 anos que apresentava uma ferida na perna esquerda próximo ao jarrete. Foi aplicado o spray à base do extrato da entrecasca da planta na concentração de 50.000 $\mu\text{g/mL}$. Com 11 dias de tratamento, houve o fechamento total da ferida.

Fotografia 25- Ferida do animal 7: Dia 0



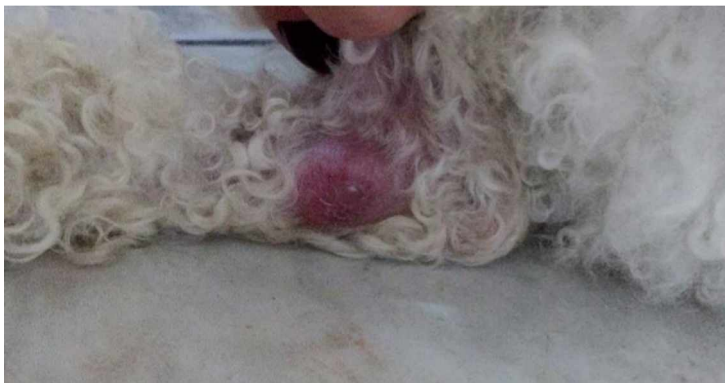
Fonte: A autora

Fotografia 26- Ferida do animal 7: Dia 7



Fonte: A autora

Fotografia 27- Ferida do animal 7: Dia 11



Fonte: A autora

O animal 8 era uma cadela fêmea de aproximadamente 4 anos que apresentava uma ferida ao redor do pescoço. Foi aplicado o spray à base do extrato da entrecasca da planta na concentração de 50.000 $\mu\text{g/mL}$. Até a conclusão deste trabalho a ferida não havia cicatrizado totalmente.

Fotografia 28- Ferida do animal 8: Dia 0



Fonte: A autora

Fotografia 29- Ferida do animal 8: Dia 7



Fonte: A autora

Fotografia 30- Ferida do animal 8: Dia 14



Fonte: A autora

Nenhum dos proprietários dos animais que foram submetidos aos testes com a pomada ou o spray relataram qualquer tipo de queixa sobre alguma reação adversa desenvolvida por seu animal durante o uso dos produtos.

5. DISCUSSÃO

Através do presente estudo evidenciou-se o que já havia sido descrito por Quinn et al. (2005), que os principais causadores de lesões de pele supurativas são agentes do gênero *Staphylococcus sp.*, visto que, das seis culturas realizadas, cinco apresentaram o crescimento de bactérias deste gênero.

Além disso, em dois animais houve o isolamento de bactérias do gênero *Proteus spp.* e *Pseudomonas sp.*, que segundo Greene (2011), são bactérias que podem também ser isoladas de feridas de pele.

O método de difusão em disco utilizado para verificar a sensibilidade das bactérias testadas frente a planta Sangra d'água, se mostrou uma ferramenta eficaz, conforme Ostrosky et al. (2008). Ainda por meio desse método evidenciou-se que a Concentração Mínima Inibitória(CMI) da entrecasca foi de 10.000 µg/mL uma vez que as concentrações abaixo desse valor não formaram halo de inibição contra as bactérias.

No trabalho de Gurgel (2000) e Soldera et al. (2010) foi utilizado o látex da sangra d'água diluído em água destilada, já nesse trabalho foi feito um antibiograma com o látex diluído em água destilada, porém, ele não se apresentou tão efetivo quanto o látex diluído em propilenoglicol.

Ainda no trabalho de Soldera et al. (2011) quando feito o antibiograma do látex coletado na época da floração, ou seja, de dezembro a junho, não houve formação do halo de inibição. Os autores explicaram esses resultados pelo fato de que talvez a composição química do látex seja alterada durante a época de floração. Já no presente estudo o látex foi coletado em abril e mesmo assim houve a formação do halo de inibição. Além do mais, em alguns antibiogramas o halo do látex foi até maior que o halo do extrato da entrecasca.

Oliveira et al. (2008) demonstrou no seu trabalho que o látex da sangra d'água é efetivo com várias bactérias como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus*

pyogenes, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras, já neste o látex mostrou-se efetivo contra bactérias do gênero *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, e bactérias do gênero *Streptococcus sp.* Ao contrário do que foi visto por Oliveira et al. (2008), o látex mostrou-se inefetivo contra as bactérias do gênero *Klebsiella sp.* e contra a bactéria *Escherichia coli*.

Além disso, Oliveira et al. (2008) demonstraram que o extrato da sangra d'água é eficaz contra: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já no presente trabalho o extrato da sangra d'água mostrou-se eficaz contra bactérias do gênero *Staphylococcus sp.*, bactérias do gênero *Streptococcus sp.*, *Proteus penneri* e *Proteus mirabilis*., e ineficaz contra a *Escherichia coli*. e *Pseudomonas aeruginosa*.

Já pesquisa de Soldera et al. (2011) o látex mostrou-se eficaz contra *Staphylococcus aureus* e ineficiente contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*., o que difere do presente estudo, no qual o látex mostrou-se ineficaz apenas contra a *E. coli*.

6. CONCLUSÃO

Com este estudo pode-se evidenciar a atividade antibacteriana in vitro da Croton urucurana Baill contra diferentes espécies de bactérias, já a atividade cicatrizante foi vista através do tratamento das feridas com o spray.

Demostrou-se que o spray fabricado a partir da sangra d'água é um método alternativo eficaz no tratamento de feridas de pele contaminadas e cães e gatos. Entretanto, faz-se necessário mais pesquisas utilizando um número maior de animais e com grupos testemunhas.

REFERÊNCIAS

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de Procedimentos Básicos em MICROBIOLOGIA CLÍNICA para o Controle de Infecção Hospitalar- Módulo I. Brasília: ANVISA / Ministério da Saúde, 2000.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica- Módulo V. Brasília: ANVISA / Ministério da Saúde, 2004.

CARVALHO, C. C. C. R.; Fonseca, M. M. R. Biotransformation of terpenes. *Biotechnology Advances*, Oxford, v.24, p. 134-142, mar./apr. 2006.

FALEIRO, C.C. et al.. O extrato das folhas de babosa, Aloe vera na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo. *Natureza on line*. 2009. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/01_Faleiroetal_5660.pdf>. Acesso em: 3 maio 2017.

FARMACOPÉIA homeopática brasileira. 3 ed. 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf>. 2 de jan. 2017.

GOMES, A. N. S. Avaliação in vitro do extrato da planta Croton urucurana Baill (Sangra d'água) como alternativa para combater infecções de pele provocadas por *Staphylococcus* sp. 2014. 43f. Trabalho de conclusão de curso(Bacharelado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014

GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and the cat. 3 ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2006. 1387 p. ISBN 1-4160-3600-8.

GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V.K. Doenças de pele do cão e do gato: diagnóstico clínico e histopatológico. Tradução de Alexandre Pinto Ribeiro e Tathiana Ferguson Motheo. 2 ed. São Paulo: Roca, 2009. 889p. Inclui bibliografia e índice. Tradução de: Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis, 2nd ed.

GUIMARAES, L. A. C.; SECCO, R. S. As espécies de *Croton* L. sect. *Cyclostigma* Griseb. e *Croton* L. sect. *Luntia* (Raf.) G. L. Webster subsect. *Matourenses* G. L. Webster (Euphorbiaceae s.s.) ocorrentes na Amazônia brasileira. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 40, n. 3, p. 471-487, set. 2010.

GURGEL, L. A. Avaliação experimental da atividade antidiarreica do látex do *Croton* *Urucurana* Baill. 2000. 125 f. Dissertação (Mestrado)- Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, dec. 2005.

MUNIZ, C. F.; ROCHA, A. V. E.; BATISTA, M. G.; TAVARES, J. P.; SILVA, C. S. Avaliação macroscópica do efeito do látex de *Croton urucurana* Baillon no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Revista Amazônia*, v.1, n. 1 p.5-12, 2013

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition. Wayne: NCCLS, 2003.

OLIVEIRA I. S.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n.4, p.587-593, Out./Dez. 2008

PENNA, B.; VARGES, R.G.; MEDEIROS, L. S.; MARTINS, G.M. S.; MARTINS, R.R.; LILENBAUN,W. Prevalência clínica de *Staphylococcus* sp de origem canina e sua resistência in vitro aos antimicrobianos. *Clínica Veterinária*, n.90, p82-88, 2011

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEN, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: subctances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, Basel, v. 55, p.315-327, mai./oct. 2007.

PRAIA, A. S.; SILVA, E. F. QUEIROZ, S. A.; VOLOIS, A. C.C Compostos fenólicos. 2014. Disponível em: <http://www.procitropicos.org.br/portal/conteudo/print.php?itemid=2911> Acesso: 31de maio de 2017.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). J. Braz. Chem. Soc., São Paulo, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007 .

SOLDERA, C. C.; ZANELLA G.N.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antibacteriana de Croton Urucurana Baill. Revista Contexto e Saúde. Unijuí, Ijuí, v.10, n.9, p. 11-33, 2010.

SOUZA, T.M. et al.. Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. Pesquisa Veterinária Brasileira. 177-190, fev, 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v29n2/a17v29n2.pdf> > Acesso em: 02 de jan 2017.

SILVA, T.C. Composição química e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana do extrato das cascas de Croton urucurana. 2016. 80f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em química)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016

QUINN, P.J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Tradução de Lúcia Helena Niederauer Weiss e Rita Denise Niederauer Weiss. 1 ed. São Paulo: Artmed, 2007. 512p. Tradução de: Veterinary Microbiology. 1st Edition

TORTORA, G.J; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. Tradução de Danielle Soares de Oliveira Daian. 12ed. São Paulo: Artmed, 2005. Tradução de: Microbiology: an introduction, 12th edition.

APÊNDICE A- Termo de Consentimento

Termo de Consentimento

Você está sendo convidado(a) para participar da pesquisa sobre o “**AVALIAÇÃO IN VITRO E TRATAMENTO DE FERIDAS DE PELE CONTAMINADAS DE CÃES E GATOS COM O USO DE SPRAY À BASE DE *Croton urucurana Baill* ”**, sob responsabilidade dos seguintes pesquisadores: Caroline de Lima Moraes e Fernando Antônio Ferreira.

Nesta pesquisa, nós estamos buscando oferecer um método alternativo para o tratamento de feridas contaminadas de cães e gatos, a fim de avaliar a eficácia de sprays feitos a partir da planta *Croton urucurana Baill* (Sangra d'água).

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa poderão ser publicados e ainda assim sua identidade será preservada.

Você não terá gasto ou ganho financeiro por participar da pesquisa, podendo também parar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo para o senhor (a).

Uma cópia deste Termo de Consentimento ficará com o senhor (a), e qualquer dúvida a respeito da pesquisa, favor enviar um contato através do número: 99183-0378(Caroline) ou entrar em contato com o professor Dr. Fernando Ferreira diretamente no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Eu aceito participar da pesquisa citada voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Assinatura do participante

Uberlândia, de

de 2017