



## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DE EXTRATOS VEGETAIS DO CERRADO PARA *STAPHYLOCOCCUS SPP.* PROVENIENTES DE BOVINO

*Emanuelly Gomes Alves Mariano, Adriana Gonçalves Freitas, Iara Maria França Reis, Larissa Bessa Fernandes, Grazielle Layanne Mendes Santos*

### Introdução

Sabe-se que o principal problema que afeta os rebanhos leiteiros, mundialmente, é a inflamação da glândula mamária ou mastite, a qual, frequentemente, tem origem bacteriana. A mastite é considerada como a doença que proporciona as maiores perdas econômicas na produção de leite [1].

O *Staphylococcus aureus* além de ser responsável por grandes prejuízos à pecuária leiteira, apresenta resistência a diversos antibióticos utilizados no tratamento desta doença [2]. Objetivou avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais do cerrado sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e três isolados (S178, S135 e S182) provenientes do úbere de vacas com mastite.

### Material e Métodos

#### A. Preparo dos Extratos vegetais

As folhas das espécies vegetais foram coletadas no período seco no Instituto de Ciências Agrárias da UFMG em Montes Claros. Coletou-se folhas de *Caryocar brasiliense*, *Annona crassiflora* e *Schinopsis brasiliensis*. As folhas foram desidratadas em estufa com circulação forçada de ar a 38°C por aproximadamente 72 horas e moídas em liquidificador industrial. Os extratos aquosos foram produzidos, adicionando-se 100 mL de água destilada a 10 g de cada espécie vegetal e aquecidos em banho-maria a 40°C durante 60 minutos. Os extratos etanólicos foram obtidos submergindo 100 g do material vegetal em 1000 mL de etanol PA. Em recipientes de vidro âmbar, conservados em local escuro em temperatura ambiente durante dez dias.

#### B. Extratos vegetais com inibição sobre as cepas

Os extratos foram filtrados em membrana milipore de celulose com 0,2 µm e posteriormente subamostras das soluções obtidas foram submetidas à determinação de matéria seca, a 105°C, para cálculo das concentrações a serem testadas. Após a determinação da matéria seca os extratos foram ajustados para a menor concentração obtida para os extratos que foi de 84 mg de matéria seca/mL.

A atividade *in vitro* dos extratos vegetais foi determinada de acordo com o NCCLS [3]. Em placas de Ágar Mueller-Hinton foram inoculados 200 µL com a solução do inóculo padronizados e espalhados com o auxílio de *swabs* estéreis. Sobre a superfície desse meio foram adicionados discos de papel filtro. Os discos foram impregnados com a solução dos extratos vegetais. As placas foram incubadas a 35°C e após 24 horas os halos de inibição foram mensurados em mm. Os procedimentos foram realizados em triplicata para cada isolado avaliado.

#### C. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CMI) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Foram avaliados os extratos utilizados na etapa anterior. A determinação da CMI de substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo foi realizada com o método de macrodiluição em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) como descrito em NCCLS [3].

Para a CMI, após padronizar as soluções a concentração de 150 mg/mL, foram produzidas diluições subsequentes, contendo 2,5 mL da concentração anterior e 2,5 mL do caldo BHI, obtendo-se as concentrações finais de 75; 37,5; 18,75 e 9,375 mg/ml. Em seguida foi inoculado 12 µL da suspensão de cada micro-organismos. Os controles dessas concentrações foram incubados sem o acréscimo da suspensão das bactérias. O controle positivo foi realizado com acréscimo de 12 µL da suspensão direta do micro-organismo e o controle negativo foi avaliado em tubos sem o acréscimo de micro-organismo. Todos os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas em incubadora *termoshaker* para melhor homogeneização. Após esse período foi avaliado o crescimento microbiano, com auxílio de 125 µL do Cloreto de Tetrafeniltetrazólio (TTC).

A determinação da concentração mínima de substância necessária para causar a eliminação de 99,9% do micro-organismo (CBM) foi determinada pela imersão de um *swab* em cada tubo da CMI que não apresentou coloração avermelhada ou seja, que não tiveram crescimento microbiano, foi inoculado em placas contendo Ágar para contagem de micro-organismos em placas (PCA). Incubou-se a 35°C por 24 horas para observação do crescimento microbiano [4].

### Resultados e Discussão



Verificou-se que as médias dos halos não diferiram estatisticamente entre os extratos para a cepa ATCC 25923 e para o isolado de vacas com mastite S178. Entretanto, para os isolados S182 e S135 de vacas com mastite essas médias diferiram para os diferentes extratos avaliados. Para o isolado S135, o tratamento mais eficiente foi o extrato etanólico de *A. crassiflora*, sendo que os demais extratos não diferiram estatisticamente entre si. Para o isolado S182, o extrato com maior média de halo de inibição foi o extrato aquoso de *S. brasiliensis*. (TABELA 1).

Os extratos avaliados sob as cepas *S. aureus* ATCC 25923 e os três isolados (S178, S135 e S182) apresentaram CMI de 150 µg/mL. Constatou-se CBM do extrato Panetanólico na concentração 150 µg/mL, os extratos Pau preto etanólico e Pequi etanólico a CBM foi maior que 150 µg/mL, o que indica que a pesquisa não encontrou a concentração que causa a morte destes micro-organismos. (TABELA 2).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram o estudo Lima *et al.* [4], que avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos etanólicos (1:1) da folha, fruto e sementes do *A. crassiflora* contra *Staphylococcus spp.* Os autores verificaram que esses extratos inibiram de forma significativa o crescimento dessa bactéria. Com média de halo de inibição de 10 a 12 mm.

Ao avaliar o efeito antibacteriano de *C. brasiliense* contra *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, Paula-Junior *et al.* [5] concluíram que substâncias antioxidantes presentes no extrato hidro-etanólico das folhas foram responsáveis pela atividade antimicrobiana.

Estudos relatam que *S. brasiliensis* (Pau preto) contem quatro moléculas ativas relacionadas a atividade antimicrobiana. Sendo que apenas o galato de metila e ácido gálico foram isoladas das folhas [6].

Silva *et al.* [7] trabalhando com extrato da folha de *Annona crassiflora* sobre *S. aureus* multirresistente de humanos e ATCC 6538 encontrou CMI de 25 mg/ml e apresentava alcalóides e flavonóides como composto ativos. Os maiores *Minimum Inhibitory Concentration* (MICS) foram em extratos da casca do fruto e semente sobre *S. aureus* multirresistente com valor de 50 mg/ml.

Saraiva *et al.* [8] utilizando extrato de *Schinopsis brasiliensis* para *S. aureus* multirresistentes a CMI foi de 100, 50, 25 e >100 µg/ml também dependente da fração utilizada.

## Conclusão

As médias dos halos não diferiram estatisticamente entre as plantas para a cepa ATCC 25923 e para o isolado de vacas com mastite S178. Entretanto, para os isolados S182 e S135 de vacas com mastite, essas médias diferiram para os diferentes extratos avaliados. Para o isolado S135, verificou-se que o tratamento mais eficiente foi o extrato etanólico de *A. crassiflora* (Panã). Para o isolado S182, o extrato com maior média de halo de inibição foi o extrato aquoso de *S. brasiliensis* (Pau preto).

Verificou-se que a CMI, de todos os extratos avaliados sob as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e os três isolados (S178, S135 e S182) apresentaram resultados significativos.

Panã etanólico apresentou atividade antibacteriana ou bactericida contra todas as cepas de *Staphylococcus spp.* Para os extratos de Pau preto etanólico e Pequi etanólico a CBM não encontrou a concentração que cause a morte deste micro-organismo.

## Referências

- [1] SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 1ªed. Barueri: Manole, 2007. 314p
- [2] BRITO, M.A.V.P., *et al.* Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arq Bras. Med. Vet. Zootec.** v.53, n.5, 2001. 10p
- [3] NCCLS (2003) **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. [Online]. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. Available: <[http://www.anvisa.gov.br/servicos/cls/cls/cls\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/cls/cls/cls_OPASM2-A8.pdf)>. [Accessed 10 may 2015].
- [4] LIMA, M.R.F. *et al.* The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Rev. Bras. Farmacog.** 16, 2006. 300p.
- [5] PAULA-JÚNIOR, W.: *et al.* Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Rev. Bras. Farmacog.** 16, 2006. 625p
- [6] NIJVELDT, R.J. *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr** 74, 418-425p  
74, 2001. 418p
- [7] SILVA, J.J., *et al.* *In vitro* screening antibacterial activity of *Bedens pilosa* Linné and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo 56, 2014. 333-340p
- [8] SARAIVA, A.M., *et al.* Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Rev. Bras. Pl. Med.** 15, 2013. 199 p



A HUMANIZAÇÃO NA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO



**Tabela 1** - Média de halo de inibição em teste de difusão em Ágar para *Staphylococcus* spp. após adição de extratos das folhas na concentração de 84 mg/mL de *Annona crassiflora* (Panã), *Caryocar brasiliense* (Pequi) e *Schinopsis brasiliensis* (Pau preto)

Espécie/Cepa	Etanólico Panã	Etanólico Pequi	Aquoso Pequi	Aquoso Pau preto	Etanólico Pau preto
<i>Staphylococcus</i> spp.					
S135	21,5 Aa	10,16 Bb	14,43 Ab	15,53 Ab	9,93 Ab
S182	12,13 Bab	9,76 Bb	12,06 Aab	14,56 Aa	9,90 Ab
S178	11,2 Ba	8,63 Ba	8,66 Aa	9,53 Aa	8,86 Aa
ATCC 25923	14,13 Ba	11,73 Ba	17,06 Aa	16,76 Aa	13,63 Aa

Notas: Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de SNK (Student-Newman-Keuls) (P<0,01).

**Tabela 2:** Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em µg/mL do extrato das folhas de *Annona crassiflora* (Panã), *Caryocar brasiliense* (Pequi) e *Schinopsis brasiliensis* (Pau preto)

Cepa	Etanólico Panã		Etanólico Pau preto		Aquoso Pau preto		Etanólico Pequi		Aquoso Pequi	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>Staphylococcus</i> spp.										
S135	150	150	150	> 150	150	150	150	> 150	150	150
S182	150	150	150	> 150	150	> 150	150	> 150	150	150
S178	150	150	150	> 150	150	150	150	> 150	150	> 150
ATCC 25923	150	150	150	> 150	150	> 150	150	> 150	150	150