

Atividade antibacteriana de extratos vegetais de plantas do Cerrado no controle de bactérias causadoras de mastite em vacas leiteiras

Antibacterial activity of plant extracts from plants of the Cerrado in the control of bacteria that cause mastitis in dairy cows

Frederico Lopes da Silva¹; Bruno Henrique de Oliveira Silva^{2*}; Karolyne Moura Nascimento³; Francislete Rodrigues Melo⁴; Guilherme Soares Filho⁵

¹Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal da Universidade de Brasília (UnB).

²Mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Brasília (UnB).

³Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal da Universidade de Brasília (UnB).

⁴Doutora em Biologia Molecular pela Universidade de Brasília (UnB).

⁵Doutor em Patologia Molecular pela Universidade de Brasília (UnB).

*Autor correspondente. E-mail: bruno.nutri.bem@gmail.com

Recebido: 06/12/2022; Aceito: 03/02/2023

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de extratos vegetais no controle de bactérias causadoras de mastite em vacas leiteiras. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, onde as duas espécies de bactérias (*Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus aureus*) foram submetidas ao controle de inibição com 10 extratos diferentes: extrato de barbatimão, jamelão, mamica-de-porca, mama-cadela, jenipapo, pau-terra, pau-ferro e murici, e para efeito de controle positivo e negativo, utilizou-se a solução salina (EDTA) e disco esteril perfazendo assim, dois ensaios experimentais simultâneos, que possuíam 10 tratamentos com 5 repetições cada. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade. O extrato de pau-terra (*Qualea grandiflora*) teve um efeito significativo perante os microorganismos (*Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus aureus*).

Palavras-chave: Atividade antibacteriana, Extratos vegetais, Mastite bovina.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of plant extracts in the control of bacteria that cause mastitis in dairy cows. The experimental design was entirely randomized, where the two species of bacteria (*Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus*) were submitted to inhibition control with 10 different extracts: barbatimão, jamelão, mamica-de-porca, mama-cadela, jenipapo, pau-terra, pau-ferro and murici extracts, and for positive and negative control effect, saline solution (EDTA) was used and of that steril thus making up two simultaneous experimental trials, which had 10 treatments with 5 repetitions each. The results were submitted to variance analysis and the means to Tukey's test at 5% probability. The extract of pau-terra (*Qualea grandiflora*) had a significant effect against the microorganisms (*Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus*).

Keywords: Antibacterial activity, Plant extracts, Bovine mastitis.

INTRODUÇÃO

A mastite bovina destaca-se como a principal doença que prevalece entre os rebanhos leiteiros, gerando impacto na produtividade desses animais e aumentando os gastos com tratamento, que muitas vezes é realizado de forma incorreta. Por suas características, geram grandes perdas econômicas para os produtores e para a agroindústria (SOUZA et al, 2016).

Ressalta-se que, a pele do animal é a fonte mais comum de infecção, sendo as bactérias do gênero *Staphylococcus* as de maior importância na clínica médica e cirúrgica de animais de companhia (CEMAL et al, 2022). Dentro do seu gênero *Staphylococcus*, é possível verificar uma relevante capacidade de adquirir resistência aos antibióticos entre as diversas espécies deste gênero (WEESE & DUIJKEREN, 2010).

Contudo, a alta demanda, o uso indiscriminado e constante dos fármacos, têm promovido a resistência bacteriana aos antibióticos convencionais, o que dificulta o controle dessa patologia nos rebanhos. Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos pelos microrganismos têm limitado o número disponível de drogas eficazes, reduzindo as intervenções bem-sucedidas nos tratamentos das infecções bacterianas (DOUAFER et al, 2019).

Os antimicrobianos são uma classe de substâncias com ação farmacológica que matam ou inibem o desenvolvimento de microrganismos, como bactérias, fungos, vírus ou protozoários, podendo ser compostos naturais ou sintéticos. Os terpenos, compostos fenólicos e alcalóides têm demonstrado alta capacidade de inibir o crescimento microbiano, o que tem favorecido avanço da indústria farmacêutica para desenvolvimento de novos antimicrobianos (PRAKASH et al, 2020).

Tendo em vista a necessidade de inovação na farmacologia veterinária, as espécies vegetais do Cerrado possuem componentes naturais ricos em propriedades bioativas, sendo uma alternativa para obtenção de fármacos com potencial para controle de microrganismos causadores de doenças animais (PATRIDGE et al, 2016). Esse Bioma possui inúmeras espécies de plantas com propriedades medicinais, por isso a importância da realização de pesquisas para elucidar melhor essa potencialidade (OLIVEIRA, 2012). O extrato vegetal precisa ser avaliado quanto à sua capacidade biológica de possuir uma ação farmacológica relevante e segurança toxicológica (ROYER et al, 2013).

A utilização de plantas na terapêutica veterinária é uma grande alternativa para diversos tratamentos, sendo viável, acessível para tutores, ecologicamente correta, de custo que atraem a população, sem ser prejudicial ao homem nem animal, dependendo da dose e da forma administrada (ROYER et al, 2013). Dentro do mercado farmacêutico fitoterápico, apenas 1% é voltado para a medicina veterinária. Entretanto, notadamente, é o setor que mais cresce, ocupando 6,7% dos medicamentos de rotina prescritos (BRUNO et al, 2016).

Assim, o trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de plantas do Cerrado, como murici (*Byrsonima crassifolia*), mamica-de-porca (*Zanthoxylum rhoifolium*), pau-terra (*Qualea grandiflora*), pau-ferro (*Libidibia ferrea*), jenipapo (*Genipa americana*), mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii*), barbatimão (*Stryphnodendron*) e jamelão (*Syzygium Cumini*) sobre as bactérias *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus aureus*, bactérias estas que manifestam a mastite bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade Integradas UPIS, Fazenda Lagoa Bonita, Campus II, situada na BR-020 km 12, DF 335, km 4.8, no município de Planaltina, Distrito Federal. O solo da região é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo, de latitude sul 15° 56 'S e longitude 47° 56 'W. O clima é tropical de altitude, tendo um verão úmido e chuvoso e um inverno seco e relativamente frio. A temperatura média anual tem variação de 21°C a 30°C.

Foram coletadas na unidade experimental, as seguintes plantas do Cerrado: murici (*Byrsonima crassifolia*), mamica-de-porca (*Zanthoxylum rhoifolium*), pau-terra (*Qualea grandiflora*), pau-ferro (*Libidibia ferrea*), jenipapo (*Genipa americana*), mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii*), barbatimão (*Stryphnodendron*) e jamelão (*Syzygium Cumini*). As folhas das plantas foram coletadas da parte aérea das árvores, evitando coletar caule e optando por folhas com maior quantidade de matéria seca.

Foram coletados 500g de material vegetal de cada espécie, em horários após a exposição das folhas sob a luz do sol. No preparo das amostras coletadas para a extração dos compostos ativos foi necessário realizar uma limpeza prévia, seguido da pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 50°C, por 72 horas. Logo após a pré-secagem, o material foi triturado em moinho de facas tipo Willey e acondicionado em sacos plásticos hermeticamente fechados.

A extração foi realizada utilizando 100 g da folha seca e moída, 500 ml de álcool etílico em um becker, no qual permaneceu em um agitador por uma semana. Após uma semana ocorreu a evaporação que consistiu na filtração do extrato e em um balão volumétrico, ficando por 2 horas em uma manta aquecedora com média de temperatura de 50°C, até que o extrato tenha alcançado uma forma mais viscosa.

Foram realizados dois experimentos de atividade antibacteriana de extratos vegetais para as duas espécies de bactérias (*Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus aureus*), obtidos de amostra de leite de um rebanho com incidência de mastite subclínica. Os dados coletados foram submetidos ao delineamento inteiramente casualizado no qual as bactérias foram submetidas ao controle de inibição com 10 produtos diferentes (extrato de barbatimão, jamelão, mamica-de-porca, mama-cadela, jenipapo, pau-terra, pau-ferro e murici) e para efeito de controle positivo e negativo, utilizou-se a solução salina (EDTA) e disco esteril, perfazendo assim, dois ensaios experimentais simultâneos, que possuíam 10 tratamentos com 5 repetições cada.

A primeira etapa consistiu na multiplicação do microrganismo com uma alça de platina flambada em lamparina. Para a realização deste procedimento foi necessário que a alça platina estivesse próxima de no mínimo duas lamparinas buscando manter o meio estéril na sequência, passando a alça de platina no meio de cultura com cuidado, abrindo o frasco com o caldo de Muller Hintone, acrescentando o microrganismo dentro do caldo, em seguida, levando a estufa em temperatura de 35 °C por 2 horas ou até alcançar a turvação 5 na escala de Mc Farlan.

A segunda etapa, consistiu na semeadura do microrganismo, com movimentos laterais, semeando o microrganismo por toda a placa. Já a terceira etapa, constituiu na introdução dos discos e inclusão dos tratamentos, com uma pinça flambada adicionando o disco na placa. Os dados obtidos das variáveis analisadas foram submetidos à análise de variância ($P < 0,05$), e quando significativos foram comparados pelo teste de Tukey. Em todos os procedimentos estatísticos descritos foi utilizado o software SISVAR 5.6 (FERREIRA et al, 2019).

RESULTADOS

Tabela 1. Resultados médios da análise de variância para o tamanho do halo de inibição dos extratos em cada Microrganismo

Tratamentos	S.I.	S.A.	MÉDIA ± D.V.	C.V.
Barbatimão (<i>Stryphnodendron</i>)	NS	NS	0,72 ± 0,03	5,37
Jamelão (<i>Syzygium Cumini</i>)	NS	NS	0,85 ± 0,08	8,72
Mamica-de-porca (<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>)	NS	NS	0,51 ± 0,01	12,54
Mama-cadela (<i>Brosimum gaudichaudii</i>)	NS	NS	0,52 ± 0,01	13,66
Jenipapo (<i>Genipa americana</i>)	NS	NS	0,55 ± 0,08	13,48
Pau-terra (<i>Qualea grandiflora</i>)	**	**	18,60 ± 0,08	4,80
Pau-ferro (<i>Libidibia ferrea</i>)	NS	NS	0,67 ± 0,07	10,55
Murici (<i>Byrsonima crassifolia</i>)	NS	NS	0,72 ± 0,08	11,62
Solução Salina	NS	NS	0,50 ± 0,01	9,67
Disco Estéril	NS	NS	0,50 ± 0,01	10,54

$P < 0,05^*$; $P < 0,001^{**}$; $P < 0,0001^{***}$; $P > 0,05$; CV (Coeficiente de Variação); DV (Desvio Padrão da Média); NS (Não Significativo); S.I. (*Staphylococcus intermedius*); S.C.P. (*Staphylococcus aureus*)

Os valores médios quando comparado aos alôs formados quando submetidos aos extratos, mostra-se que houveram resultados significativo apenas com o extrato vegetal de Pau-terra (*Qualea parviiflora*) em comparação aos demais que apresentaram valor médio de 18,60 (mm) de halo de inibição bacteriana para ambos os microrganismos avaliados. Abaixo (tabela 2) estão apresentados os valores médios da análise de variância para os diferentes produtos e microrganismos específicos.

Tabela 2. Resultados médios da análise de variância do efeito dos tratamentos para *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus aureus*

Tratamentos	MÉDIA ± DP	CV
Barbatimão (<i>Stryphnodendron</i>)	0,70 ± 0,05 a	8,76
Jamelão (<i>Syzygium Cumini</i>)	0,86 ± 0,05 a	6,36
Mamica-de-porca (<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>)	0,52 ± 0,04 a	8,60
Mama-cadela (<i>Brosimum gaudichaudii</i>)	0,54 ± 0,08 a	16,56
Jenipapo (<i>Genipa americana</i>)	0,54 ± 0,05 a	10,14
Pau-terra (<i>Qualea grandiflora</i>)	18,60 ± 0,54 b	2,94
Pau-ferro (<i>Libidibia ferrea</i>)	0,66 ± 0,05 a	8,29
Murici (<i>Byrsonima crassifolia</i>)	0,72 ± 0,10 a	15,21
Solução Salina	0,50 ± 0,01 a	9,54
Disco Estéril	0,50 ± 0,01 a	11,32

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna, diferem entre si pelo Teste Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro. DV (Desvio Padrão da Média); NS(Não Significativo); CV(Coeficiente de Variação).

Os resultados médios da análise de variância e o nível de significância para a variável halo de inibição em (mm) dos diferentes tratamentos aplicados em cada microrganismo estão apresentados na Tabela 3. De acordo com os dados obtidos, houve efeito significativo somente do extrato vegetal de Pau-terra (*Qualea grandiflora*) para ambos os microrganismos utilizados.

Tabela 3. Frequência dos microrganismos em relação ao tamanho de alôs.

Tamanho de Alôs (mm)	S.I. (%)	S.C.P. (%)
0.5	50,00	50,00
0.6	62,50	37,50
0.7	50,00	50,00
0.8	28,57	71,43
0.9	57,14	42,86
17	0,00	100,00
18	66,67	33,33
19	60,00	40,00
20	0,00	100,00

SI (*Staphylococcus intermedius*); SCP (*Staphylococcus aureus coagulase positivo*)

DISCUSSÃO

O extrato vegetal de Pau-terra (*Qualea grandiflora*), comparado aos demais extratos vegetais sobre os microrganismos *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus aureus*, obteve valores de inibição de 18,60 mm, sendo valores significativos sob análise estatística. Nasser et al (2013) relataram que foram realizados estudos fitoquímicos com o gênero botânico *Qualea*, onde foram identificados ácidos graxos, polissacarídeos, taninos, compostos pirogálicos, catequínicos, flavonóides, terpenóides, e derivados do ácido elágico. De acordo com Almeida et al (1998), a casca, a entrecasca, e as folhas de *Qualea grandiflora* são usadas como adstringente, antidiarreico, antiinflamatório e antimicrobiano. A formação de halos inibitórios de crescimento bacteriano pelos extratos de Pau-terra (*Qualea parviflora*), pode ser atribuída à composição fitoquímica desta espécie vegetal, que apresenta ácidos graxos, glicosídeos e compostos fenólicos dentre seus vários metabólitos secundários. Tais metabólitos possuem atividades antibacteriana e antifúngica, o que pode caracterizar a ação dos extratos obtidos desta espécie frente às cepas das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Conforme Hiruma-Lima et al (2006), extratos crus e frações de *Qualea grandiflora*, possuem atividade antimicrobiana. Os resultados também confirmam os estudos de Ayres et al (2008), no qual extratos metanólicos de cascas de *Qualea grandiflora* tiveram, ação antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como extratos etanólicos de folhas de *Qualea grandiflora* apresentaram ação antibacteriana sobre o *Staphylococcus epidermidis*. Para Nasser et al (2013), os extratos apolares de cascas e princípios ativos isolados de *Qualea grandiflora*, *Qualea multiflora* e *Qualea parviflora*, são mais eficazes e promissores nos ensaios de atividade microbiana, devido a lipofilicidade.

Embora, o extrato de Pau-terra (*Qualea grandiflora*) tenha sido o produto que apresentou eficiência significativa na inibição do crescimento bacteriano em relação aos demais, não se pode desprezar a hipótese de que o extrato de outras plantas obtiveram atividade que variaram de 0,65mm a 0,87mm no halo de inibição, estando de acordo com informações contidas na literatura, frente aos metabólitos vegetais (FERREIRA et al, 2010). A atividade antioxidante resultante dos extratos pode estar relacionada com os grupos fenólicos, como os polifenóis, que geralmente estão presentes nos extratos vegetais, convertendo os radicais livres reativos em produtos mais estáveis (AMAROWICZ et al, 2004).

A dificuldade de inibição da atividade de bactérias Gram negativas, provavelmente, está relacionada à composição de sua parede celular que apresenta uma estrutura complexa, formada por uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos e o espaço periplasmático no qual é encontrada uma camada menos espessa peptidoglicana, sendo estas características estruturais responsáveis por limitar a passagem de vários agentes antimicrobianos (TORTORA et al, 2012).

CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos através do estudo, é recomendável utilizar o extrato de Pau-terra (*Qualea grandiflora*) na dose de 1 mg/ml, como alternativa para o controle de *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus aureus* na mastite bovina. Deste modo, o estudo corrobora com a necessidade de serem desenvolvidas formas alternativas de tratamentos veterinários, que possibilitem amenizar efeitos antagônicos e riscos, devido ao uso inadequado dos medicamentos convencionais.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA, 1998. 464 p.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B., WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chem.**, v.84, p.551-562, 2004.
- AYRES, M.C.C.; ESCÓRIO, S.P.; COSTA, D.A.; CHAVES, M.H.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; CAVALHEIRO, A.J. Constituintes químicos das folhas de *Qualea grandiflora*: atribuição dos dados de RMN de dois flavonóides glicosilados acilados diastereoisoméricos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1481-1484, 2008.
- BRUNO, L.O.; MARQUES, L.C.; CARDOSO, C.M.Z. Análise das normas vigentes para registro de fitoterápicos veterinários no Brasil. **Science And Animal Health**, v. 4, n. 3, p. 209-227, 2016.
- CEMAL, A.M.; KAYLA, S.; TREVOR, R.; JESSICA, O.; ORHAN, S. Prevalence, mechanism, genetic diversity, and cross-resistance patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus* isolated from Companion Animal Clinical Samples submitted to a Veterinary Diagnostic Laboratory in the Midwestern United States. **Antibiotics**, 11(5):609, 2022.
- DOUAFER, H.; ANDRIEU, V.; PHANSTIEL, O.; BRUNEL, J.M. Antibiotic Adjuvants: Make Antibiotics Great Again! **Journal of Medicinal Chemistry**, 62(19): 8665-8681, 2019.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, Lavras, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.
- GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- HIRUMA-LIMA, C.A.; SANTOS, L.C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C.H.; SILVEIRA, G.G.; VASCONCELOS, P.C.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R. *Qualea grandiflora*, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant present an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 104, n. 1/2, p. 207-2014, Mar. 2006.
- NASSER, A.L.; PAVAN, F.R.; BORALLE, N.; ZOCOLO, G.J.; SANTOS, L.C.; MACCHI, M.R.R.; LEITE, C.Q.F.; VILEGAS, W. Esteróides e Triterpenos de espécies de *Qualea*: bioatividade sobre *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 4, p. 513-517, 2013.
- OLIVEIRA, V.B. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, 48 (1), p. 170-179, 2012.
- PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M.S., HOYER, D. (2016). **Uma análise de medicamentos aprovados pela FDA: produtos naturais e seus derivados**. *Drug Discov Today*, 2(1), 204 - 207.
- PRAKASH, B. **Antimicrobial and antioxidant properties of phytochemicals**: Current status and future perspective. Academic Press, 1-45, 2020.
- ROYER, A.F.B; GARCIA, R.G.; BORILLE, R.; SANTANA, M.R.; NUNES, K.C. Fitoterapia aplicada a avicultura industrial. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17, p.1466-1484, 2013.

SOUZA, K.S.S.; OLIVEIRA, Y.C.M; DUARTE, A.F.V; OLIVEIRA, T.C; VELOSO, A.L.C; OLIVEIRA, P.M.C.; FERNANDES, N.S.F. Resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica. **Cadernos de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 2, p. 83- 89, 2016.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

WEEESE, S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinaire medicine. **Vet Microbiol**, n. 140, p. 418-429. 2010.