

Izabella Carolina de Oliveira Ribeiro

**Extratos de plantas do Cerrado com eficácia *in vitro*
contra *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* de
bovinos**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Eduardo Robson Duarte

Co-orientadores:

Roberta Torres Careli

Franciellen Moraes Costa

Marcelo Resende de Souza

MONTES CLAROS

2015

Ribeiro, Izabella Carolina de Oliveira Ribeiro.

R484e 2015 Extratos de plantas do cerrado com eficácia *in vitro* contra *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* de bovinos / Izabella Carolina de Oliveira Ribeiro. Montes Claros, MG: Instituto de Ciências Agrárias/UFMG, 2015.

53 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

Orientador: Prof. Eduardo Robson Duarte.

Banca examinadora: Henrique Maia Valério, Ernane Ronie Martins, Roberta Torres Careli.

Inclui bibliografia: f. 48-52.

1. Antibacterianos. 2. Bovinocultura - microbiologia. 3. Fitofármacos.
I. Ribeiro, Eduardo Robson Duarte. II. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. III. Título.

CDU: 579

Elaborada pela Biblioteca Comunitária em Ciências Agrárias do ICA/UFMG

Izabella Carolina de Oliveira Ribeiro

**Extratos de plantas do Cerrado com eficácia *in vitro* contra *Staphylococcus* spp. e
Escherichia coli de bovinos**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Produção Animal da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em
Produção Animal

Área de Concentração: Produção Animal

Linha de Pesquisa: Nutrição e alimentação
animal

Orientador: Eduardo Robson Duarte

Instituto de Ciências Agrárias da UFMG

Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Henrique Maia Valério
UNIMONTES

Prof. Ernane Ronie Martins
ICA/UFMG

Prof^a. Roberta Torres Careli
Co-orientadora ICA/UFMG

Prof. Eduardo Robson Duarte
Orientador ICA/UFMG

Montes Claros, 21 de agosto de 2015

Dedico essa conquista a todos que de alguma forma ajudaram na elaboração e execução deste. Em especial dedico aos meus pais, Regina (*in memória*) e José Roberto, as minhas irmãs, Carla e Michelle, e a minha sobrinha Alice com todo meu carinho e toda minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guiou e me permitiu realizar este trabalho, suprimindo minhas necessidades e fazendo a Sua vontade.

Ao meu orientador Eduardo Robson, que além de orientador é um grande amigo, pai e excelente pessoa, sempre com sua humildade e gentileza com o próximo. Obrigada por ter ajudado tanto desde o início da graduação para a minha formação profissional e pessoal, com paciência e compreensão. Obrigado por seu zelo, sua dedicação, seu esforço e por todos esses anos de orientação e amizade. Vou ser eternamente grata por tudo o que você me ensinou e me permitiu alcançar.

A minha co-orientadora Roberta Careli, por toda orientação e amizade. Auxiliando sempre que necessário com ensinamentos e colaborando para o desenvolvimento de todo o projeto. Agradeço também as várias oportunidades de aprendizados em aulas que me ofereceu.

Agradeço a todos que, com ações ou palavras, contribuíram na execução de todas as etapas deste trabalho.

Em especial agradeço imensamente aos meus pais. A minha mãe Regina, que como estrelinha no céu esta brilhando e com certeza muito feliz por essa conquista que é pra você. A meu pai José Roberto, que sempre me incentivou e me apoiou. As minhas irmãs Carla e Michelle, e a minha sobrinha Alice por todo carinho e amor.

A todos do grupo de microbiologia ou os outros ajudantes, que contribuíram para a realização desde experimento. A nossa "mãe" Flavia, Ed, Ana, Emanuely, Brenda, Kariny, Iara, Sabrina, Rayane, Adriana. Obrigada pela ajuda na rotina laboratorial e ao apoio de cada um, vocês contribuíram muito para essa pesquisa.

Aos colegas de mestrado e amigos, Carol, Ed, Bella, Tânia, Juh, Sâmara, Malu, Pedro, Rapha, Natty, Rody, Gabi, e Douglas pelo apoio e amizade de cada um.

A Franciellen por ceder os extratos, e auxiliar durante toda a pesquisa, sempre muito prestativa e atenciosa.

Agradeço aos Prof. Henrique Maia Valério, Prof. Ernane Ronie Martins e Prof^a. Roberta Torres Careli, por gentilmente terem aceito o convite para participar da banca de avaliação e por contribuírem para a melhoria deste trabalho.

A Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a coordenação da Pós-graduação em Produção Animal. A todos os funcionários do Instituto de Ciências Agrárias (ICA). A Capes, pela bolsa concedida durante os anos de pesquisa.

Enfim a todos que contribuíram de alguma forma para a minha formação colaborando para que eu chegasse aonde cheguei.

Muito Obrigada!

“Em toda dificuldade há uma oportunidade”

Autor desconhecido

RESUMO

As diarreias em bezerros e as mastites em bovinos representam impactos negativos na pecuária. Nesta pesquisa foram selecionados extratos de plantas do Cerrado com efeito inibitório para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus* provenientes de bovinos. Foram selecionados os extratos etanólico de *Annona crassiflora* Mart. e os extratos etanólicos e aquosos de *Schinopsis brasiliensis* Engl. e *Caryocar brasiliense* Cambess. Os perfils cromatográficos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os teores de taninos condensados foram analisados para esses extratos. Extratos com e sem taninos foram padronizados a 84 mg/mL e foram avaliados em teste de difusão em Ágar para comparar o antagonismo para dois isolados de *Escherichia* spp. provenientes de bezerros com diarreia e ATCC 25922 (*Escherichia coli*) e três isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de vacas com mastite e ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus*). Os halos de inibição foram comparados em delineamento inteiramente casualizado e avaliou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Para *Escherichia* spp. todos os extratos selecionados foram eficientes e para *Staphylococcus* spp., os extratos etanólico de *A. crassiflora* e aquoso de *S. brasiliensis* foram mais efetivos. A CIM do extrato aquoso de *S. brasiliensis* foi de 37,5 mg/mL para o isolado E2 de *Escherichia* e para os demais extratos foi 150 mg/mL. A CBM do extrato etanólico de *A. crassiflora* foi 150 mg/mL para todas as cepas. Após a remoção dos taninos não se verificou efeito inibitório, indicando esse metabólito secundário como agente do efeito antibacteriano dos extratos avaliados. Nesta pesquisa, os isolados *S. aureus* apresentaram resistência aos antibacterianos vancomicina, oxacilina, clindamicina e penicilina e os de *E. coli* eram resistentes à tetraciclina. Os extratos selecionados, após estudos de toxicidade e testes *in vivo*, poderiam contribuir para o controle alternativo dessas bactérias.

Palavras-chave: Antibacterianos. Atividade biológica. Bovinocultura. Colibacilose. Fitofármacos. Mastite bovina. Extratos vegetais. Savana. *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus haemolyticus*.

ABSTRACT

Diarrhea in calves and mastitis in cattle pose negative impacts on livestock. In this survey were selected Cerrado plant extracts with inhibitory effect on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* from cattle. The ethanol extracts of *Annona crassiflora* Mart were selected. and ethanol and aqueous extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. and *Caryocar Brasilia* Cambess. The chromatographic perfils obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC) and the levels of condensed tannins were analyzed for these extracts. With extracts with or without tannins were standardized at 84 mg/mL, and were evaluated in agar diffusion test to compare the antagonism two isolates of *Escherichia* spp. from calves with diarrhea and ATCC 25922 (*Escherichia coli*) and three isolates of *Staphylococcus* spp. from cows with mastitis and ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus*). The halos of inhibition were compared in a randomized design and evaluated the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). For *Escherichia* spp. all selected extracts were efficient, *Staphylococcus* spp., the ethanol extracts of *A. crassiflora* and aqueous *S. brasiliensis* were more effective. The MIC of the aqueous extract of *S. brasiliensis* was 37.5 mg/mL for the isolated *Escherichia* E2 and other extracts was 150 mg/mL. CBM The ethanol extract of *A. crassiflora* was 150 mg/mL for all strains. After removal of tannins there was no inhibitory effect, indicating that secondary metabolite as an agent of the antibacterial effect of the extracts evaluated. In this research, the isolated *S. aureus* showed resistance to antibacterial vancomycin, oxacillin, penicillin and clindamycin and *E. coli* were resistant to tetracycline. Selected extracts after toxicity studies and *in vivo* tests, could contribute to alternative control these bacteria.

Keywords: Antibacterials. Biological Actividad. Cattle. Colibacillosis. Pesticides. Bovine mastitis. Plant extracts. Savannah. *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus haemolyticus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01 – Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, valor do tempo de retenção (TR), e características do espectro de UV de flavonoides nos extratos A: *Annona crassiflora* etanólico (TR=6.484), B: *Caryocar brasiliense* etanólico (TR=1.284), C: *Caryocar brasiliense* aquoso (TR=1.378)..... 39
- Figura 02 – Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, valor do tempo de retenção (TR), e características do espectro de UV de taninos, nos extratos A: *Schinopsis brasiliensis* etanólico (TR=1.053), B: *Schinopsis brasiliensis* aquoso (TR=1.054)..... 39

LISTA DE TABELAS

3 REVISÃO DE LITERATURA - Atividade antimicrobiana de extratos vegetais em *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*: uma revisão

- Tabela 1 – Extratos de plantas com eficácia contra bactérias isoladas de bovinos com mastite. 20
- Tabela 2 – Extratos de plantas com eficácia antimicrobiana para bactérias patogênicas de humanos..... 22

4 ARTIGO - Extratos de plantas do Cerrado com eficácia antibacteriana *in vitro* para *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* de bovinos

- Tabela 1 – Identificação das bactérias por Sequenciamento do rRNA 16S e classificação de acordo com o BLAST (Banco de Dados do NCBI)..... 35
- Tabela 2 – Perfil de sensibilidade a antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Escherichia coli* isoladas de bovinos e cepas padrão..... 36
- Tabela 3 – Seleção dos extratos de acordo com o halo de inibição (mm) do crescimento bacteriano após a adição de extratos de folhas de espécies vegetais do Cerrado em teste de difusão em Ágar para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Escherichia coli*..... 37
- Tabela 4 – Média de halo de inibição (mm) para *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* em teste de difusão em Ágar tratados com extratos das folhas de *Annona crassiflora*, *Caryocar brasiliense* e *Schinopsis brasiliensis* na concentração de 84 mg/mL..... 40
- Tabela 5 – Valores médios de halo de inibição(mm) em teste de difusão em Ágar para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Escherichia coli* após adição de extratos das folhas de *Annona crassiflora*, *Caryocar brasiliense* e *Schinopsis brasiliensis* na concentração de 84 mg/mL..... 41
- Tabela 6 – Valores médios de halo de inibição(mm) em teste de difusão em Ágar para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Escherichia coli* após adição de extratos com e sem taninos das folhas de *Caryocar brasiliense* e *Schinopsis brasiliensis* a 150 mg/mL..... 42
- Tabela 7 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em mg/mL dos extratos das folhas de *Annona crassiflora*, *Caryocar brasiliense* e *Schinopsis brasiliensis*..... 43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3 REVISÃO DE LITERATURA - Atividade antimicrobiana de extratos vegetais em <i>Staphylococcus spp.</i> e <i>Escherichia coli</i>: uma revisão	14
Introdução.....	16
Importância da utilização de extratos vegetais.....	17
Mecanismo de ação antibacteriana de extratos vegetais.....	17
Extratos vegetais com ação antibacteriana para bactérias de origem bovina ou humana.....	18
Considerações finais.....	24
Agradecimentos.....	24
Referências.....	24
4 ARTIGO - Extratos de plantas do Cerrado com eficácia antibacteriana <i>in vitro</i> para <i>Staphylococcus spp.</i> e <i>Escherichia coli</i> de bovinos	28
Introdução.....	29
Materiais e Métodos.....	30
Resultados.....	35
Discussão.....	43
Agradecimentos.....	48
Conflito de Interesse.....	48
Referências.....	48
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53

1 INTRODUÇÃO

Na criação de ruminantes, doenças devem ser prevenidas ou controladas visando à melhor produtividade dos animais. Nos bezerros, a diarreia em recém-nascidos é a patologia mais frequente nos criatórios e é frequentemente ocasionada por *Escherichia coli*. Já em animais adultos, a mastite reduz a produção de leite e eleva o custo de produção, sendo que *Staphylococcus* spp. representam os principais agentes envolvidos (Salvadori et al., 2003; Santos et al., 2003).

Staphylococcus aureus e *Escherichia coli* são micro-organismos que atualmente apresentam alta frequência de cepas com multirresistência, e por isso as pesquisas têm buscado novas alternativas para o controle alternativo das doenças sem o uso de fármacos comerciais (Oliveira et al., 2007). Desde 1977, a Organização Mundial de Saúde (OMS) vêm incentivando estudos de plantas medicinais, em diferentes países (OMS, 2002). A pesquisa com plantas é crescente em função dos benefícios potenciais, como a menor probabilidade de selecionar micro-organismos resistentes e de acumular resíduos nos alimentos (Toyang et al., 2007).

O Cerrado é a segunda maior formação vegetal brasileira e um dos mais importantes domínios do país, ocupando 22% do território nacional e abriga mais de 10 mil espécies vegetais. Esse domínio é considerado um celeiro de produtos naturais para a fitoterapia (Chagas et al., 2004).

As plantas selecionadas nesta pesquisa encontram-se em abundância no Cerrado brasileiro e são de fácil identificação. A eficácia de extratos de plantas desse domínio tem sido pouco respaldada na literatura científica para bactérias de origem animal. Desta forma, os extratos vegetais de plantas do Cerrado foram selecionados com o intuito de descobrir novas substâncias com efeito antibacteriano, que poderiam futuramente contribuir para reduzir a ocorrência de resistência a antibacterianos e assim diminuir os prejuízos causados por essas bactérias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a ação antibacteriana de extratos aquoso e etanólico de espécies vegetais coletadas no Cerrado do Norte de Minas Gerais sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Escherichia coli* provenientes de bovinos.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os isolados bacterianos provenientes de bovinos com mastite e diarreia.
- Verificar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos convencionais das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp, provenientes de bovinos.
- Verificar e selecionar os extratos com melhor efeito antibacteriano para diferentes isolados de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus* provenientes de bovinos.
- Determinar os principais compostos ativos dos extratos vegetais com ação antibacteriana selecionados.
- Determinar o teor de tanino condensado nas amostras dos extratos vegetais.
- Realizar a extração de tanino condensado para verificar ação antibacteriana sem esse composto.
- Determinar a ação antibacteriana dos extratos selecionados na mesma concentração de matéria seca/mL.
- Determinar as concentrações inibitórias mínimas dos extratos selecionados.
- Determinar as concentrações bactericidas mínimas dos extratos selecionados.
- Selecionar extratos com antagonismo específico para cada espécie bacteriana.
- Selecionar extratos com amplo espectro de inibição para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Atividade antimicrobiana de extratos vegetais em *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*: uma revisão

(Elaborado conforme normas da Revista Eletrônica de Veterinária)

Atividade antimicrobiana de extratos vegetais em *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*: uma revisão

RIBEIRO, Izabella Carolina de Oliveira : Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Universitária, 1000-Universitário, Minas Gerais, Brasil ; DUARTE, Eduardo Robson : Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Universitária, 1000-Universitário, Minas Gerais, Brasil.

Autor correspondente: Izabella Ribeiro – e-mail: izabellacarolina@hotmail.com

Resumo:

A utilização indiscriminada de antibióticos convencionais favorece a seleção de bactérias resistentes o que dificulta o tratamento de doenças, com prejuízos a toda a cadeia produtiva e na saúde pública. Por isso, a pesquisa de novas alternativas com a utilização de extratos vegetais tem sido promissora, uma vez que reduz a seleção de micro-organismos multirresistentes e não acumulam resíduos nos alimentos. Nesta revisão, objetivou-se descrever e relacionar extratos vegetais com ação inibitória para as principais bactérias de bovinos causadoras de mastite e colibacilose. Os extratos apresentam diferentes formas de ação para inibição bacteriana que estão relacionadas com os compostos secundários produzidos pelas plantas e apresentam diferenças para cada espécie vegetal. Os extratos vegetais são promissores como alternativos aos antimicrobianos convencionais, e poderiam ser utilizados em diferentes espécies vegetais com ação comprovada. Entretanto, estudos de toxicidade *in vivo* ainda devem ser realizados para comprovar a eficácia desses extratos em animais.

Palavras-chave: Antibacterianos Antibacterial, Bovinocultura Cattle, Colibacilose Colibacillosis, Fitofármacos Pesticides, Mastite Mastitis

Abstract:

The indiscriminate use of conventional antibiotics favors the selection of resistant bacteria which hinders the treatment of diseases with damage to the entire production chain and public health. Therefore, the search for new alternatives to the use of plant extracts have been promising, since it reduces the selection of multiresistant microorganisms and does not accumulate in the food waste. In this review, we aimed to describe and relate plant extracts with inhibitory action for major cattle mastitis-causing bacteria and colibacillosis. The extracts have different modes of action for bacterial inhibition that are related secondary metabolites produced by plants and differ for each plant species. The plant extracts are promising as alternative to conventional antimicrobials, and could be used in different plant species with proven action. However, *in vivo* toxicity studies are still necessary to prove the efficacy of these extracts on animals.

Introdução

Atualmente, o crescimento da população humana mundial, demanda maior produção de alimentos e por isso, a produção mundial de bovinos vem crescendo. Entretanto, a produção animal pode ainda apresentar baixo desempenho devido a diversos fatores que promovem menor eficiência de produção e, conseqüentemente, elevação dos custos de produção.

As doenças bacterianas, por exemplo, causam redução da produção e elevam os custos nos tratamentos com antimicrobianos convencionais, que favorecem a seleção de bactérias resistentes (Toyang et al., 2007).

Com isso, a pesquisa de plantas com efeito antibacteriano é crescente em função da menor probabilidade de selecionar micro-organismos resistentes e de acumular resíduos nos alimentos. Fitoterápicas são formas farmacêuticas mais acessíveis aos consumidores e podem proporcionar a inclusão do saber regional na terapêutica (Waller et al., 2001).

Em animais não ruminantes, diversos estudos têm indicado resultados positivos, utilizando os extratos vegetais como promotor de crescimento, principalmente em aves e suínos (Costa et al., 2007). Para ruminantes

encontram-se vários trabalhos utilizando extratos vegetais como antiparasitários principalmente para carrapatos, helmintos (Nogueira et al., 2012; Morais-Costa et al., 2015) e anticoccidianos, entretanto poucos trabalhos com plantas com efeitos antibacterianos têm sido relatados (Borges et al., 2011; Gopinath et al., 2012). Dessa forma, objetivou-se revisar a utilização dos extratos vegetais com efeitos antibacterianos para bovinos, com intuito de elucidar e fomentar essa alternativa.

Importância da utilização de extratos vegetais

Desde os tempos mais remotos o homem busca a cura ou o alívio das doenças com a utilização das plantas. Nos últimos anos ocorreu aumento da resistência de micro-organismos patogênicos aos diferentes antimicrobianos devido ao uso indiscriminado, o que fomenta a procura de novas alternativas com fitofármacos para controle das doenças (BRASIL, 2006; OMS, 2002).

Assim, desde 1977 a Organização Mundial de Saúde (OMS) vêm incentivando estudos com plantas medicinais. De acordo com a resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o medicamento fitoterápico é aquele obtido com o emprego exclusivo de matérias-primas vegetais e caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do uso por levantamentos etnofarmacológico em pesquisas científicas ou ensaios clínicos. Devem ser avaliados a reprodutibilidade e a constância da qualidade da matéria-prima vegetal para o uso como fitoterápico (BRASIL, 2004).

Sabe-se que a utilização de extratos vegetais na dieta dos animais traz diversos benefícios melhorando o metabolismo animal. Entretanto, o exato modo de ação ainda não está completamente elucidado. Na literatura é descrito o controle de patógenos pela atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, melhora na digestão com estímulo da atividade enzimática (Brenes e Roura, 2010).

Mecanismo de ação antibacteriana de extratos vegetais

A atividade antimicrobiana é um dos efeitos intrínsecos dos extratos de plantas. Extratos vegetais e seus metabólitos secundários possuem efeito

bactericida e bacteriostático dose-dependente sobre o organismo (Smith-palmer, 1998). O mecanismo pelo qual a maioria dos extratos vegetais exerce efeito antimicrobiano está relacionado à atividade na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando as proteínas. Alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática por íons de hidrogênio (H⁺) e potássio (K⁺). A alteração dos gradientes de íons conduz à deterioração dos processos essenciais de célula como transporte de elétrons, translocação de proteínas, etapas da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas resultando em perdas do controle quimiosmótico da célula afetada e conseqüentemente a morte bacteriana (Droman e Deans, 2000; Hänsel et al., 2002).

Os efeitos benéficos das plantas estão relacionados à constituição dos princípios ativos. Esses compostos representam um mecanismo de defesa da planta contra fatores externos como estresse fisiológico, alterações ambientais e proteção contra predadores e patógenos. Assim, os constituintes de uma espécie vegetal podem variar em função de fatores ambientais e genéticos ao longo do desenvolvimento (Kamel, 2000).

Os princípios ativos dos vegetais são moléculas de baixo peso molecular oriundas do metabolismo secundário das plantas. São glucosídeos, alcalóides (álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres e lactonas), compostos fenólicos e polifenólicos (quinonas, flavonas, taninos e cumarinas), terpenoides (mono e sesquiterpenos e esteróides), saponinas, mucilagens, flavonoides e óleos essenciais (Martins et al., 2000). As substâncias ativas das plantas medicinais, normalmente, não se encontram em estado puro, mas sob a forma de complexos, cujos componentes se completam e reforçam sua ação sobre o organismo em questão (Martins et al., 2000).

Extratos vegetais com ação antibacteriana para bactérias de origem bovina ou humana

A utilização de fitoterápicos em animais têm o objetivo de aumentar as opções de tratamentos e prevenção de diversas doenças, com a oferta de novos medicamentos registrados. Esses fármacos seriam mais acessíveis

economicamente aos produtores e alternativo ao uso de fármacos convencionais (Lapa et al., 2007).

Alguns estudos relatam a atividade antimicrobiana *in vitro* ou *in vivo* de extratos vegetais de diversas plantas. Grande parte destes estudos aborda a atividade *in vitro* dos extratos. As principais metodologias utilizadas são o teste de difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) (NCCLS, 2003). Poucos estudos são realizados em ruminantes, com o objetivo de inibir o crescimento bacteriano, o que dificulta a recomendação desses produtos. A maioria desses estudos reporta plantas com ação contra *S. aureus*, agente de mastite em bovinos (Tabela 1).

Tabela 1 - Extratos de plantas com eficácia contra bactérias isoladas de bovinos com mastite

Espécie vegetal	Nome popular	Parte utilizada	Forma de utilização	Micro-organismo	Halo de inibição	Referência
<i>Anacardium occidentale</i>	Cajueiro	Casca (caule)	EE	<i>Staphylococcus aureus</i>	20 mm	Pereira et al. (2010)
<i>Lippia sidoides</i>	Alecrim-pimenta	Casca (caule)	EE	<i>S. aureus</i>	19 mm	Pereira et al. (2010)
<i>Momordica Charantia</i>	Melão-de-São-Caetano	Casca (caule)	EE	<i>S. aureus</i>	19 mm	Pereira et al. (2010)
<i>Myrciaria cauliflora</i>	Jabuticaba	Casca (caule)	EE	<i>S. aureus</i>	17 mm	Pereira et al. (2010)
<i>Psidium guajava</i>	Goiabeira	Casca (caule)	EE	<i>S. aureus</i>	15 mm	Pereira et al. (2010)
<i>Punica granatum</i>	Romã	Casca (caule)	EE	<i>S. aureus</i>	26 mm	Pereira et al. (2010)
<i>Punica granatum</i>	Romã	Folha	EA, EE	<i>S. aureus</i>	12 mm	Gopinath et al. (2012)
<i>Punica granatum</i>	Romã	Folha	EA, EE	<i>Escherichia coli</i>	15 e 14 mm	Gopinath et al. (2012)
<i>Punica granatum</i>	Romã	Folha	EA, EE	<i>Streptococcus uberis</i>	16 e 11 mm	Gopinath et al. (2012)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	Casca (caule)	EE	<i>S. aureus</i>	22 mm	Pereira et al. (2010)
<i>Solanum paniculatum</i>	Jurubeba	Casca (caule)	EE	<i>S. aureus</i>	29 mm	Pereira et al. (2010)

Notas: EA: Extrato Aquoso; EE: Extrato Etanólico.

Pereira et al. (2010) e Gopinath et al. (2010), concluem que os extratos apresentaram inibição para as respectivas bactérias causadoras de doenças em bovinos *in vitro*, porém novos estudos devem ser realizados para comprovar a atividade inibitória *in vivo* a fim de melhorar o desempenho animal, o bem estar e reduzir gastos com tratamentos de doenças, aumentando o lucro dos produtores.

Os pesquisadores ainda encontram alguns problemas nas pesquisas, como a dificuldade de padronização dos extratos para a CIM e CBM. Pois dependendo do extrato utilizado sua diluição com o eluente é difícil, o que dificulta os experimentos.

Diversas plantas têm sido avaliadas em bactérias padrão ou isoladas de humanos doentes. Essas plantas devem ser estudadas em testes de toxicidade *in vivo* para possivelmente serem utilizadas no tratamento de doenças em ruminantes (Tabela 2).

Tabela 2 - Extratos de plantas com eficácia antimicrobiana para bactérias patogênicas de humanos

Espécie vegetal	Nome popular	Parte utilizada	Forma de utilização	Micro-organismo	Halo de inibição	Referência
<i>Acacia riparia</i>	-	Folhas	EAE	<i>Staphylococcus aureus</i>	11 mm	Novais et al. (2003)
<i>Anacardium occidentale</i>	Cajueiro	Castanha	EHA	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.	18, 18, 24 e 12 mm	Gonçalves et al. (2005); Silva et al. (2007)
<i>Bixa orellana</i>	Urucum	Semente	EHA	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. aureus</i>	16, 22 e 22 mm	Gonçalves et al. (2005)
<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	-	Folhas/Caule	EAE	<i>S. aureus</i>	10 mm	Novais et al. (2003)
<i>Copaifera langsdorffii</i>	Copaíba	Casca (caule)	EHA	<i>P. mirabilis</i> , <i>S. sonnei</i>	9 e 14 mm	Gonçalves et al. (2005)
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim-limão	Folhas	EE	<i>Shigella flexneri</i>	26 mm	Alvarenga et al. (2007)
<i>Esenbeckia grandiflora</i>	-	Folhas	EAE / EC	<i>S. aureus</i>	08 e 10 mm	Novais et al. (2003)
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitangueira	Fruto	EHA	<i>Escherichia coli</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Providencia</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.	14, 28, 12, 32, 34, 24 e 14 mm	Gonçalves et al. (2005)
<i>Galipea simplicifolia</i>	-	Folhas	EC	<i>S. aureus</i>	16 mm	Novais et al. (2003)
<i>Hymenaea courbaril</i>	Jatobá	Casca (caule)	EHA	<i>P. mirabilis</i> ; <i>S. aureus</i>	28 e 23 mm	Gonçalves et al. (2005)
<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	-	Folhas	EC	<i>S. aureus</i>	08 mm	Novais et al. (2003)
<i>Ilex paraguariensis</i>	Erva-mate	Folhas	EHA	<i>S. sonnei</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.	14, 24 e 10 mm	Gonçalves et al. (2005)

Tabela 2 - Extratos de plantas com eficácia antimicrobiana para bactérias patogênicas de humanos (continuação)

Espécie vegetal	Nome popular	Parte utilizada	Forma de utilização	Micro-organismo	Halo de inibição	Referência
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Tepezcuite	Casca (caule)	EHA	<i>S. pyogenes</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.	24, 33, 20, 23 e 12 mm	Gonçalves et al. (2005)
<i>Myroxylon peruiferum</i>	Bálsamo -do-peru	Casca (caule)	EHA	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. sonnei</i> ; <i>Staphylococcus</i> spp.	9, 12 e 9 mm	Gonçalves et al. (2005)
<i>Ocotea odorifera</i>	Sassafrás	Casca(caule)	EHA	<i>S. aureus</i>	22 mm	Gonçalves et al. (2005)
<i>Psidium guajava</i>	Goiabeira	Casca (caule)/ Folha	EE / EHA	<i>S. aureus</i>	21 mm	Gonçalves et al. (2005)
<i>Pterodon emarginatus</i>	Sucupira	Fruto-sâmara	EHA	<i>P. mirabilis</i>	26 mm	Gonçalves et al. (2005)
<i>Schinus terebinthifolia</i>	Aroeira	Casca (caule)	EHA	<i>S. aureus</i>	24 mm	Gonçalves et al. (2005)
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Barbatimão	Casca (caule)	EHA	Diferentes espécies	≥ 9mm	Gonçalves et al. (2005); Souza et al. (2007)
<i>Syzygium cumini</i>	Jambolão	Folhas	EHA	Diferentes espécies	≥12 mm	Loguercio et al. (2005)

Notas: EE: Extrato Etanólico; EAE: Extrato com Acetato de Etila; EHA: Extrato Hidroalcoólico; EC; Extrato Clorofórmico.

Considerações finais

A utilização de extratos vegetais em substituição aos antibióticos no tratamento de doenças é promissora. Estudos com extratos vegetais indicam efetiva inibição *in vitro* de bactérias patogênicas de bovinos e de humanos. Entretanto, futuros estudos sobre a toxicidade desses extratos, mecanismos de ação e ensaios *in vivo* devem ser realizados para indicação efetiva e segura desses extratos para o controle de bactérias patogênicas.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

Referências

Alvarenga AL, Schwan RF, Dias DR, Schwan-estrada KRF, Bravo-martins CEC. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Rev. Bras. Plantas Med.** 2007; 9(4): 86-91.

Borges LMF, Souza LAD, Barbosa CS. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 2011; 20(2): 86-96.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n ° 48**, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos Fitoterápicos. Brasília, DF, 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05 maio 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisa de plantas medicinais da central de medicamentos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006. 148p.

Brenes A, Roura E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Anim. Feed Sci. Technol.** 2010; 158(1): 1-14.

Costa LB, Tse MLP, Miyada VS. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém-desmamados. **Rev. Bras. Zootec.** 2007; 36(3): 589-595.

Droman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J. Appl. Microbiol.** 2000; 88(2): 308-316.

Gonçalves AL, Filho AA, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.** 2005; 72(3): 353-358.

Gopinath SM, Suneetha TB, Sumer S. Evaluation of effect of methanolic and aqueous extracts of *Punica granatum* L. against bacterial pathogens causing bovine mastitis. **Glob. J. Res. Med. Plants Indig. Med.** 2012; 1(10): 496-502.

Hänsel R, Tyler VE, Schulz V. **Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde.** Barueri, SP: Manole, 2002. 386 p.

Kamel C. A novel look at a classic approach of plant extracts. **Feed Mix – Intern. J. Feed, Nutrit. Techn.** 2000; 18(6): 19-24.

Lapa AJ, Souccar C, Landman MTRL, Godinho RO, Nogueira TCML. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre, Porto Alegre, RS: UFRGS, 2007. p. 247-262.

Loguercio AP, Battistin A, Vargas AC, Henzel A, Witt NM. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciênc. Rural.** 2005; 35(2): 371-376.

Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. **Plantas Mediciniais**. Viçosa: UFV, 2000. 220p.

Morais-Costa F, Soares ACM, Bastos GA, Nunes YRF, Gerassev LC, Braga FC, Lima WS, Duarte ER. Plants of the Cerrado naturally selected by grazing sheep may have potential for inhibiting development of *Haemonchus contortus* larva. **Trop Anim Health Prod**. 2015; 171(1): 361-364.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf. Acesso em: 10 mai. 2014.

Nogueira FA, Fonseca LD, Silva RB, Ferreira AVP, Nery PS, Gerassev LC, Duarte ER. In vitro and in vivo efficacy of aqueous extract of *Caryocar brasiliense* Camb. to control gastrointestinal nematodes in sheep. **Parasitol. Res**. 2012; 111(1): 325–330.

Novais TS, Costa JFO, David JPL, David JM, Queiroz LP, França F, Giulietti AM, Soares MBP, Santos RR. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Rev. Bras. Farmacogn**. 2003; 13(2): 08-11.

OMS. Organización Mundial de la Salud. **Estratégia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Ginebra: OMS, 2002. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/op000023.pdf>. Acesso em: 13 set. 2013.

Pereira AV, Silva VA, Freitas AFR, Pereira MSV, Trevisan LFA, Costa MRM. Extratos vegetais: atividade antimicrobiana e genético sobre plasmídios de resistência a antibióticos em microrganismos. **Rev. Biol. Farm**. 2010; 4(1): 60-65.

Smith-palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five import food-borne pathogens. **Lett. Appl Microbiol.** 1998; 26(2): 118-122.

Silva JG, Souza IA, Higino JS, Siqueira-junior JP, Pereira JV, Pereira MS. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Rev. Bras. Farmacogn.** 2007; 17(4): 572-577.

Souza TM, Moreira RRD, Pietro RCLR, Isaac VLB. Avaliação da atividade antisséptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Braz. J. Pharmacog.** 2007; 17(1): 71 – 75.

Toyang NJ, Wanyama J, Nuwanyakpa M, Django S. **Ethnoveterinary medicine: a practical approach to the treatment of cattle diseases in sub-Saharan Africa.** 2 ed. Roosendaal, Netherlands: Agromisa Foundation and CTA, 2007.

Waller K, Bernes G, Thamsborg SM, Sukura A, Richter SH, Ingebrigtsen PJ, Höglund J. Plants as de-worming agents of livestock in the nordic countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future, **Acta Vet. Scand.** 2001; 42(1): 31-44.

4 ARTIGO

Extratos de plantas do Cerrado com eficácia antibacteriana *in vitro* para *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* de bovinos

(Elaborado conforme normas da revista Journal of Applied Microbiology)

Extratos de plantas do Cerrado com eficácia antibacteriana *in vitro* para *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* de bovinos

Resumo: Diarreias em bezerros e mastites em bovinos geram impacto negativo na pecuária. No presente estudo foram selecionados extratos de plantas do Cerrado com efeito inibitório para amostras de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus* provenientes de bovinos. Foi realizado teste de difusão em Ágar para comparar halos de inibição de crescimento bacteriano em delineamento inteiramente casualizado. Após análise prévia de 13 extratos vegetais, cinco extratos, provenientes de três plantas foram selecionados e promoveu-se a caracterização fitoquímica em cromatografia líquida de alta eficiência, remoção de taninos condensados e avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Para *Staphylococcus* spp., os extratos etanólico de *Annona crassiflora* Mart. e aquoso de *Schinopsis brasiliensis* Engl. foram mais eficientes. Verificou-se maior suscetibilidade das amostras de *E. coli* para o extrato etanólico das folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess. A CIM do extrato aquoso de *S. brasiliensis* foi de 37,5 mg/mL para o isolado E2 e para os demais extratos, foi de 150 mg/mL. A CBM do extrato etanólico de *A. crassiflora* foi estabelecida a 150 mg/mL para todas as bactérias avaliadas, demonstrando potencial antibacteriano com maior espectro de ação. Após a extração de taninos, não se observaram efeitos antimicrobianos para os extratos selecionados, indicando que essa classe de metabólitos representam os principais componentes antibacterianos ativos nesses extratos. Esses extratos selecionados, após estudos de toxicidade e testes *in vivo*, poderiam contribuir para o controle alternativo dessas bactérias.

Palavras-chave: Antibacterianos, Colibacilose, Fitoterapicos, Mastite bovina, Plantas Medicinais, Savana

Introdução

Na criação de animais ruminantes, doenças devem ser prevenidas ou controladas visando à melhor produtividade dos animais. Nos bezerros, a diarreia em recém-nascidos é a patologia mais frequente nos criatórios e é, em sua maioria, ocasionada por *Escherichia coli*. Em animais adultos, a mastite reduz a produção de

leite e eleva o custo de produção. Nesse caso, geralmente a mastite é ocasionada por cepas de *Staphylococcus* spp. (Salvadori *et al.* 2003; Santos *et al.* 2003).

Essas bactérias apresentam populações resistentes a diversos grupos de antimicrobianos utilizados no tratamento de doenças. Por isso, a pesquisa com extratos de plantas é crescente em função dos benefícios potenciais, como a menor probabilidade de selecionar micro-organismos resistentes e reduzido risco de acumular resíduos tóxicos nos alimentos (Toyang *et al.* 2007).

O Cerrado é a segunda maior formação vegetal brasileira e um do mais importante domínio do país, compreendendo mais de 10 mil espécies vegetais. Esse domínio é considerado um celeiro de produtos naturais para a fitoterapia (Chagas *et al.* 2004). Entretanto, na literatura científica são descritas pesquisas de extratos vegetais com ação antimicrobiana para bactérias de origem humana. Entretanto, poucos estudos têm reportado extratos de plantas com ação inibitória sobre esses micro-organismos provenientes de ruminantes. Em pesquisa de oito extratos do caule de plantas do semi-árido brasileiro, foi descrito maior efeito antimicrobiano de *Solanum paniculatum* Linnaeus (Jurubeba) e *Punica granatum* Linn (Romã) sob bactérias isoladas de mastite bovina com diâmetros de halos inibição ≥ 17 mm (Pereira *et al.* 2010).

A detecção de extratos de plantas do Cerrado com efeitos antimicrobianos para *E. coli* e *Staphylococcus* spp. contribuiria no controle alternativo das doenças ocasionadas por cepas multirresistentes em animais e humanos. Em sistemas orgânicos de produção animal, a utilização desses extratos vegetais poderia favorecer a produção de alimentos livres de resíduos antibacterianos convencionais, favorecendo a comercialização e valorização desses produtos.

Neste estudo, selecionou-se espécies vegetais comumente encontradas no Cerrado com potencial antimicrobiano para as espécies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus* provenientes de bovinos

Materiais e Métodos

Micro-organismos

Os efeitos antibacterianos dos extratos foram avaliados para a amostra de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e três amostras isoladas (S178, S135 e S182) de vacas com mastite criadas na fazenda experimental do Instituto de Ciências

Agrárias da UFMG. Os efeitos inibitórios foram também verificados para a amostra ATCC 25922 de *Escherichia coli* e duas amostras (E2 e E3) provenientes de fezes de bezerros mestiços com diarreia e criados na fazenda experimental do ICA/UFMG, no norte de Minas Gerais.

Para identificação molecular dessas bactérias, foi promovida a extração e amplificação do DNA como descrito por Chapaval *et al.* (2008). Utilizou-se um par de iniciadores que se anelam em regiões conservadas dos genes 16S e 23S, 16-1A (5' GAATCGCTAGTAATCG 3') e 23-1B (5' GGGTTCCCCCAT TCGGA 3'). Sequenciou-se o gene 16S rRNA pelo método de Sanger, utilizando-se o sequenciador automático MegaBACETM 1000 e os *primers* utilizados foram o 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') no Laboratório Myleus Biotechnology (Reysenbach *et al.* 2000). O resultado do sequenciamento foi verificado com o software SeqScanner, e os resultados comparados *online* no BLAST (banco de dados do NCBI). As bactérias foram identificadas com nível mínimo de 99% de similaridade.

Sensibilidade a antibacterianos

Os procedimentos para o teste de difusão em Ágar foram, de acordo com o NCCLS (2003), conduzidos em duplicata. Inóculos de cada bactéria foram preparados com a suspensão direta de colônias crescidas em placas contendo Ágar para contagem de micro-organismos (PCA) em solução salina estéril. A suspensão foi ajustada com o padrão de 0,5 da escala de McFarland, que correspondeu a aproximadamente a 10^8 UFC/mL. Em placas de Ágar Mueller-Hinton foram inoculados 200 μ L do inóculo que foram espalhados com o auxílio de *swabs* estéreis. Sobre a superfície desse meio foram adicionados discos de antimicrobianos: cloranfenicol 30 μ g, eritromicina 15 μ g, vancomicina 30 μ g, oxacilina 1 μ g, gentamicina 10 μ g, tetraciclina 30 μ g, clindamicina 2 μ g e penicilina 10 μ g para *Staphylococcus* spp. e cloranfenicol 30 μ g, ampicilina 10 μ g, gentamicina 10 μ g, ciprofloxacina 5 μ g, tetraciclina 30 μ g e norfloxacina 10 μ g para *Escherichia* spp., segundo descrito no NCCLS (2005). As placas foram incubadas em estufa BOD a 35°C por 24 horas e os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados em milímetros (mm). Posteriormente, as bactérias foram classificadas como resistentes ou sensíveis de acordo com o NCCLS (2005).

Extratos vegetais

As folhas das espécies vegetais foram coletadas no Instituto de Ciências Agrárias da UFMG em Montes Claros. Essa região localiza-se aproximadamente a 16°51' de latitude e 44°55' de longitude, o clima da região, tropical úmido com verão seco (As) de acordo com a classificação de Köppen (Alvares *et al.* 2014), é marcada por uma longa estação seca de maio a setembro e um período chuvoso em janeiro e fevereiro.

Foram coletadas folhas de *Caryocar brasiliense*, *Annona crassiflora*, *Schinopsis brasiliensis*, *Piptadenia viridiflora* (Kunth) Benth, *Paullinea sp.*, *Ximenia americana* L. Após a coleta, 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 (Morais-Costa *et al.* 2015).

Seleção de extratos vegetais com efeito inibitório

Foram utilizados sete extratos vegetais etanólicos e seis extratos vegetais aquosos que foram suspensos na proporção de 0,1 g de extrato em 1 mL de água destilada estéril e utilizados imediatamente. Em placas contendo Ágar Mueller-Hinton, solução do inóculo padronizado foi espalhado com o auxílio de *swabs* estéreis e discos de papel filtro, com diâmetro de 6 mm, foram embebidos com a solução dos extratos e adicionados à superfície do meio de cultura. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e após esse período, os halos de inibição foram medidos em mm com auxílio de paquímetro digital (NCCLS, 2003).

Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), dos extratos vegetais

Foram selecionados cinco extratos vegetais na etapa anterior, que foram avaliados em sistema de High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Waters

Alliance 2695. Para o controle do sistema cromatográfico e coleta dos dados foi usado o programa Waters Empower. As análises foram realizadas em coluna RP-18 LiChrospher 100 (250 × ID de 4 mm, 5 µm) combinado com um 100 RP-LiChrospher 18, coluna (4 x 4 mm id, 5 µm) a 40°C. Água (A) e acetonitrila (B) foram utilizadas como eluentes, ambos contendo 0,1% (v/v) de H₃PO₄, com taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹ como se segue: 0 min, 95% A e 5% de B; 60 min, 5% de A, 95% de B, seguido por 10 min de eluição isocrático. Os solventes utilizados foram de grau HPLC e foram desgaseificados por ultra-son antes da utilização. Os cromatogramas foram obtidos a 210 nm, e os espectros de UV foram registados em linha 190-400 nm. Os extratos secos foram dissolvidos em metanol (grau HPLC), água ultrapura, ou soluções hidroetanólicas, de acordo com a solubilidade, a concentrações de 10 mg mL⁻¹. Após centrifugação a 8400 x g, as soluções da amostra (10 µL) foram automaticamente injectadas no cromatógrafo.

O teor total de proantocianidinas que representa o total de tanino condensado dos extratos, foi quantificado após solvólise catalizada por ácido com n-BuOH/HCl 37% (95:5) (Hiermann *et al.* 1986). Após a reação com n-BuOH/HCl 37% (95:5), procedeu-se à leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro a 540 nm, sendo os valores expressos em porcentagem de cloreto de cianidina. Esses procedimentos foram realizados em triplicata.

Para os extratos selecionados, realizou-se a remoção de taninos conforme metodologia descrita por Nyman *et al.* (1998). Esses extratos foram dissolvidos, sendo 1 g em 20 mL de água a 90°C. Após arrefecimento à temperatura ambiente, adicionou-se quatro gotas de NaCl (10%) e 1 mL desta solução foi misturada com 4 mL de solução de gelatina (1%) e centrifugada durante 6 min.

Efeitos inibitórios dos extratos vegetais selecionados para as bactérias

Os extratos selecionados, com e sem taninos, foram filtrados em membrana milipore de celulose com 0,2 µm e, posteriormente, alíquotas das soluções obtidas foram submetidas à determinação de matéria seca, a 105°C, para cálculo das concentrações a serem testadas (Cunnif, 1995). 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 sobre cada isolado bacteriano foi determinada de acordo com o NCCLS (2003). Em placas contendo meio Ágar Mueller-Hinton foram inoculados 200 µL com a solução do inóculo padronizado 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, previamente preparados e homogeneizados em vórtex durante um minuto. As placas foram incubadas a 35°C e após 24 horas os halos de inibição foram mensurados em mm, conforme descrito por Tagg and Mc Given (1971).

Os procedimentos foram realizados em triplicata para cada isolado avaliado. Os resultados foram avaliados em análise de variância e as médias comparadas pelo teste de SNK (*Student-Newman-Keuls*), considerando a significância de 5%, no programa estatístico SAEG (2007).

Análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Foram avaliados os extratos utilizados na etapa anterior. A determinação da concentração mínima de substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo (CIM) (Guedes *et al.* 2009) foi realizada com o método de macrodiluição em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) como descrito em NCCLS (2003).

Para a CIM, após padronizar as soluções à 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, foram inoculados 12 µL da suspensão de cada bactéria. 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* (Nova técnica equipamentos para laboratórios) para melhor homogeneização. Após esse período, foi avaliado o crescimento microbiano, com auxílio de 125 µL da solução 0,5% do Cloreto de Tetrafeniltetrazólio (TTC), que indica a multiplicação celular, apresentando coloração avermelhada na presença de células viáveis.

A determinação da concentração mínima de substância necessária para causar a eliminação de 99,9% do micro-organismo (CBM) (Guedes *et al.* 2009) foi determinada pela imersão de um *swab* em cada tubo da CIM que não apresentou coloração avermelhada ou seja, que não teve 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 (NCCLS, 2003).

Resultados

Caracterização dos isolados avaliados

A análise molecular identificou a amostra S178 como *Staphylococcus aureus* e as cepas S135 e S182 como *Staphylococcus haemolyticus*. As cepas E2 e E3 foram identificadas como *Escherichia coli*, com similaridade mínima de 99% (TABELA 1).

Tabela 1 – Identificação das bactérias por sequenciamento do rRNA 16S e classificação de acordo com o BLAST (Banco de Dados do NCBI)

Amostra isolada	Origem	Nº de nucleotídeos analisados	Identificação com similaridade de 99%
S178	Vaca com mastite	551	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> estirpe NCTC 8325
S135	Vaca com mastite	553	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> estirpe JCSC1435
S182	Vaca com mastite	550	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> estirpe JCSC1435
E2	Bezerro com diarreia	590	<i>Escherichia coli str. K-12 substr.</i> estirpe MG1655
E3	Bezerro com diarreia	574	<i>Escherichia coli str. K-12 substr.</i> estirpe MG1655

Perfil de sensibilidade a antibacterianos convencionais

A amostra S178 e a cepa padrão, identificadas como *S. aureus*, foram resistentes aos antibacterianos vancomicina, oxacilina, clindamicina e penicilina. Contudo, as amostras S135 e S182, identificados como *S. haemolyticus*, foram sensíveis a todos os antibióticos testados. A cepa padrão e a amostra E2 de *E. coli* apresentaram resistência a tetraciclina (TABELA 2).

Tabela 2 – Perfil de sensibilidade a antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Escherichia coli* isoladas de bovinos e cepas padrão

Antibacterianos	<i>S. haemolyticus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		
	S135	S182	S178	ATCC	ATCC	E2	E3
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S	S
Eritromicina	S	S	R	S	-	-	-
Ampicilina	-	-	-	-	S	S	I
Vancomicina	S	S	R	R	-	-	-
Oxacilina	S	S	R	R	-	-	-
Gentamicina	S	S	S	S	I	S	I
Ciprofloxacina	-	-	-	-	S	S	S
Tetraciclina	S	S	R	S	R	R	I
Clindamicina	S	S	R	R	-	-	-
Penicilina	S	S	R	R	-	-	-
Norfloxacina	-	-	-	-	S	S	S

Legenda: Cloranfenicol 30 µg, eritromicina 15 µg, ampicilina 10 µg, vancomicina 30 µg, oxacilina 1 µg, gentamicina 10 µg, ciprofloxacina 5 µg, tetraciclina 30 µg, clindamicina 2 µg, penicilina 10 µg e norfloxacina 10 µg. S=Sensível, I=Intermediário, R=Resistente, segundo NCCLS (2005)

Seleção de extratos vegetais do Cerrado com efeito antibacteriano

Todos os extratos apresentaram efeito inibitório sobre pelo menos uma das amostras bacterianas avaliadas. Observou-se que 12 extratos apresentaram efeito inibitório para as três espécies bacterianas estudadas (TABELA 3).

Tabela 3 – Seleção dos extratos de acordo com o halo de inibição (mm) do crescimento bacteriano após a adição de extratos de folhas de espécies vegetais do Cerrado em teste de difusão em Ágar para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Escherichia coli*

Espécie Vegetal	Tipo de Extrato	Tanino condensado (%)	<i>S. haemolyticus</i>		<i>S aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		
			135 AE	182	178	ATCC	ATCC	E2	E3
<i>Caryocar brasiliense</i> em floração	Etanólico	1,99	26,7	14,1	30,2	20,2	19	0	0
<i>Caryocar brasiliense</i> em floração	Aquoso	1,37	23,5	14,3	21,8	19,3	14,2	0	0
<i>C. brasiliense</i> em frutificação	Aquoso	1,25	24,3	14	21	23,8	16,4	0	0
<i>C. brasiliense</i> sem flor e sem fruto	Aquoso	2,66	20,2	11,1	16,2	15,8	13,8	0	0
<i>Annona crassiflora</i>	Aquoso	2,59	12,8	0	15,9	13,1	0	0	8
<i>Annona crassiflora</i>	Etanólico	4,20	9,3	14,5	15,9	14,6	11,1	0	19,8
<i>Piptadenia viridiflora</i>	Aquoso	0,23	16,4	0	19,1	0	29,9	0	11,5
<i>Piptadenia viridiflora</i>	Etanólico	1,75	9	0	13,3	17,1	27	0	0
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	Aquoso	0,16	16,4	18	24,1	20,8	22,3	9,4	0
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	Etanólico	0,72	21,7	21,2	22,5	22,8	20,6	0	16,2
<i>Paullinea sp.</i>	Etanólico	6,37	13,2	11	14,5	18,5	11,7	0	10
<i>Casearia sylvestris</i>	Etanólico	7,36	8,2	0	10,9	7,5	15	0	0
<i>Ximenia americana</i>	Etanólico	0,29	0	0	0	24,2	0	0	0

Verificou-se que os extratos etanólico e aquoso de *C. brasiliense* e etanólico de *A. crassiflora*, *S. brasiliensis* e *Paullinea* sp. apresentaram antagonismo para todos os isolados de *Staphylococcus* spp. e para *S. aureus* ATCC. Para *E. coli* foi observado que somente os extratos etanólico de *A. crassiflora*, aquoso de *P. viridiflora*, *S. brasiliensis* e *Paullinea* spp. apresentaram antagonismo para a cepa ATCC e para o isolado E3 (TABELA 3).

O extrato etanólico de *A. crassiflora*, e os extratos etanólicos e aquosos de *S. brasiliensis* e de *C. brasiliense* foram selecionados, pois apresentaram as maiores médias de halos de inibição. Esta seleção foi realizada também com o objetivo de avaliar plantas que atuassem em somente uma das espécies bacterianas e outras plantas que atuassem sobre ambas as bactérias, com amplo espectro de inibição.

Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) dos extratos vegetais

Conforme os espectros de UV observados, verificou-se a presença de flavonóides na região de absorvância entre 261-279 nm para os extratos etanólico de *Annona crassiflora*, etanólico e aquoso de *Caryocar brasiliense* e a presença de tanino nos extratos etanólico e aquoso de *Schinopsis brasiliensis*, com absorvância na região de 257-263 nm, nos respectivos tempos de retenção (Figura 1, Figura 2).

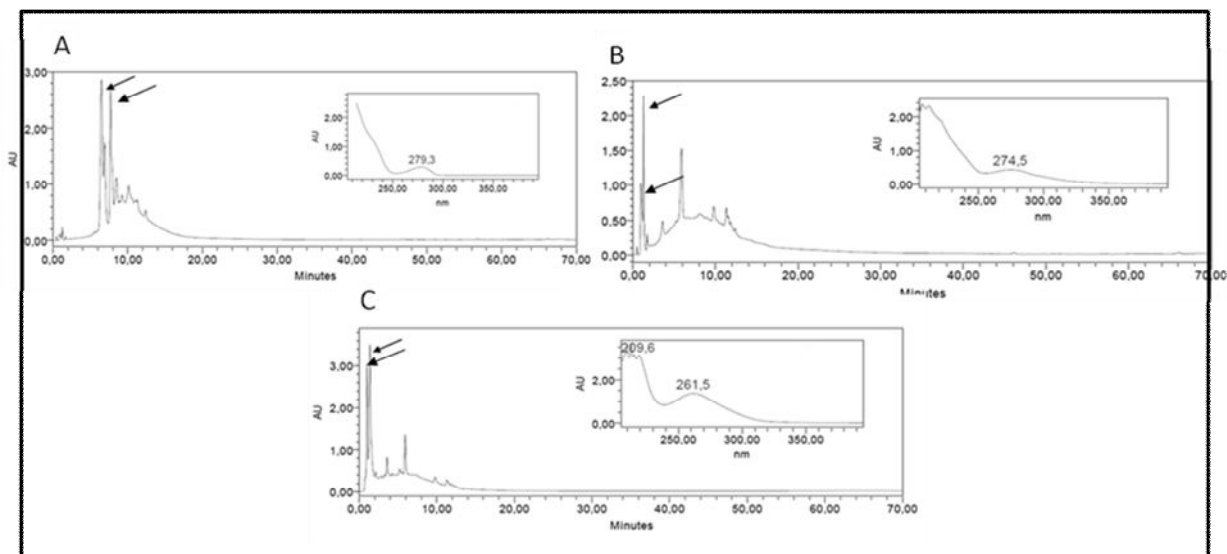


Figura 01: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, valor do tempo de retenção (TR), e características do espectro de UV de flavonoides nos extratos A: *Annona crassiflora* etanólico (TR=6.484), B: *Caryocar brasiliense* etanólico (TR=1.284), C: *Caryocar brasiliense* aquoso (TR=1.378).

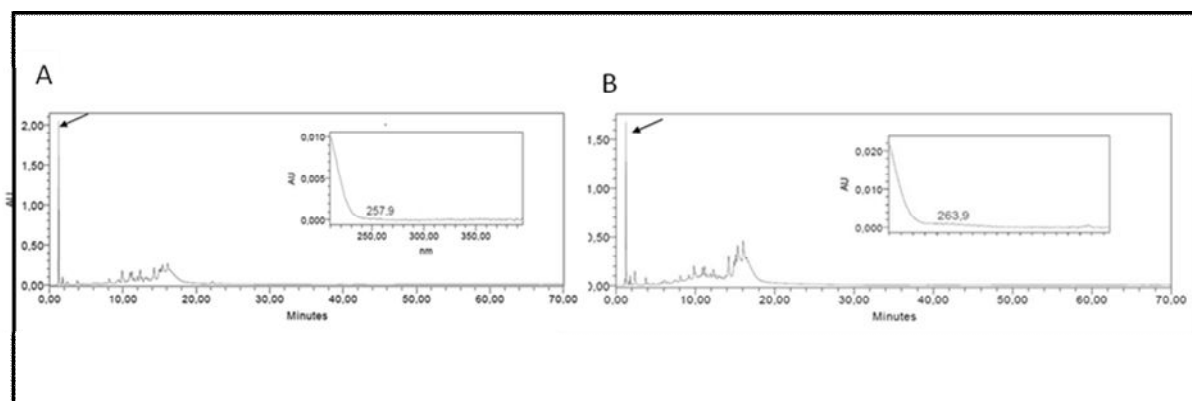


Figura 02: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, valor do tempo de retenção (TR), e características do espectro de UV de taninos, nos extratos A: *Schinopsis brasiliensis* etanólico (TR=1.053), B: *Schinopsis brasiliensis* aquoso (TR=1.054).

Comparação dos efeitos inibitórios dos extratos vegetais selecionados para *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*

Para *Escherichia coli*, todos os extratos apresentaram médias de halo de inibição estatisticamente semelhantes e superiores a 9 mm. Entretanto, os extratos etanólico de *A. crassiflora* e aquoso de *S. brasiliensis* foram mais eficientes na inibição de *Staphylococcus* spp. ($P < 0,01$). (TABELA 4).

Tabela 4 - Média de halo de inibição (mm) para *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* em teste de difusão em Ágar tratados com extratos das folhas de *Annona crassiflora*, *Caryocar brasiliense* e *Schinopsis brasiliensis* na concentração de 84 mg/mL

Bactérias	<i>A. crassiflora</i>	<i>C. brasiliense</i>		<i>S. brasiliensis</i>	
	Etanólico	Etanólico	Aquoso	Aquoso	Etanólico
<i>Staphylococcus</i> spp.	14,74 Aa	10,07 Bb	13,05 Aab	14,1 Aa	10,58 Ab
<i>Escherichia coli</i>	10,25 Aa	13,38 Aa	15,15 Aa	11,5 Aa	9,72 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*) ($P < 0,01$) Coeficiente de variação 36,7%.

Verificou-se diferenças de susceptibilidade aos extratos vegetais entre as espécies de bactérias e cepas avaliadas. Os extratos etanólicos de *A. crassiflora* e aquoso de *S. brasiliensis* foram mais efetivos para *Staphylococcus* spp. Considerando o antagonismo verificado para o extrato etanólico das folhas de *C. brasiliense*, o único extrato que diferiu entre as espécies, as médias dos halos de inibição foram significativamente maiores para *Escherichia coli* ($P < 0,01$), indicando maior suscetibilidade dessa bactéria (TABELA 4).

No teste de difusão em Ágar para comparar as cepas em diferentes extratos verificou-se influência do tipo do extrato, da espécie e da cepa bacteriana e da interação entre esses fatores na média do diâmetro do halo de inibição ($P < 0,01$) (TABELA 5).

Verificou-se que as médias dos halos não diferiram estatisticamente entre as plantas para a cepa *S. aureus* ATCC e para o isolado de vacas com mastite S178, que corresponde à espécie *S. aureus*. Entretanto, para os isolados S182 e S135 (*S. haemolyticus*), essas médias diferiram para os extratos avaliados ($P < 0,01$). Para o isolado S135, verificou-se que 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* ($P < 0,01$).

Para *Escherichia coli*, verificou-se também diferenças significativas entre os extratos, entre as cepas e interação entre esses dois fatores ($P < 0,01$). Para a cepa ATCC 25922, o extrato aquoso *C. brasiliense* foi o mais eficiente, para o isolado E3 o extrato *A. crassiflora* foi o menos eficiente e os demais não diferiram estatisticamente ($P < 0,01$). Para o isolado E2, o antagonismo foi significativamente maior para os extratos *A. crassiflora* e *C. brasiliense*.

Tabela 5 – Valores médios de halo de inibição (mm) em teste de difusão em Ágar para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Escherichia coli* após adição de extratos das folhas de *Annona crassiflora*, *Caryocar brasiliense* e *Schinopsis brasiliensis* na concentração de 84 mg/mL

Espécie/Cepa	<i>A. crassiflora</i>		<i>C. brasiliense</i>		<i>S. brasiliensis</i>	
	Etanólico	Aquoso	Etanólico	Aquoso	Etanólico	Aquoso
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>						
S135	21,50Aa	10,16 Bb	14,43 Ab	9,93 Ab	15,53 Ab	
S182	12,13 Bab	9,76 Bb	12,06 Aab	9,90 Ab	14,56 Aa	
<i>Staphylococcus aureus</i>						
S178	11,20 Ba	8,63 Ba	8,66 Aa	8,86 Aa	9,53 Aa	
ATCC 25923	14,13 Ba	11,73 Ba	17,06 Aa	13,63 Aa	16,76 Aa	
<i>Escherichia coli</i>						
E2	19,00 Aa	18,93 Aa	16,53 Aab	8,66 Ac	14,6 Ab	
E3	2,73 Cb	12,20 Ba	17,66 Aa	10,60 Aa	17,00Aa	
ATCC 25922	9,03 Bab	9,03 Bab	11,26 Aa	9,90 Aab	3,10 Bb	

Notas: Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste SNK (Student-Newman-Keuls) ($P < 0,01$) Coeficiente de variação 16,1%.

Não foram verificados efeitos inibitórios para o extrato etanólico de *Caryocar brasiliense* e aquoso e etanólico de *Schinopsis brasiliensis* após a remoção de taninos (TABELA 6) indicando que esse metabólito representa o principal princípio antibacteriano para esses extratos avaliados.

Tabela 6 – Valores médios de halo de inibição (mm) em teste de difusão em Ágar para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Escherichia coli* após adição de extratos com e sem taninos das folhas de *Caryocar brasiliense* e *Schinopsis brasiliensis* a 150 mg/mL

Cepas	Extrato etanólico <i>Caryocar brasiliense</i>		Extrato aquoso <i>Schinopsis brasiliensis</i>		Extrato etanólico <i>Schinopsis brasiliensis</i>	
	com tanino	sem tanino	com tanino	sem tanino	com tanino	sem tanino
	S135	13ABab	0c	14Aa	0c	11Bb
S182	13Aba	0b	14Aa	0b	12ABa	0b
S178	13Aba	0b	16Aa	0b	13ABa	0b
ATCC5923	13Aba	0b	0b	0b	14Aa	0b
E2	11Bab	0c	14Aa	0c	10Bb	0c
E3	15Aa	0c	0c	0c	12ABb	0c
ATCC5922	13ABab	0c	15Aa	0c	11ABb	0c

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) Coeficiente de variação. 27,12%

Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

Verificou-se que a CIM, do extrato aquoso de *Schinopsis brasiliensis* sob a E2 foi menor (37,5 mg/mL) que aquela observada para os demais extratos para ambas as bactérias avaliadas. Constatou-se CBM do extrato etanólico de *Annona crassiflora* na concentração 150 mg/mL, para os extratos etanólico de *S. brasiliensis* e *Caryocar brasiliense* a CBM foi maior que 150 mg/mL, para esses extratos houve variação da CBM entre os diferentes micro-organismos (TABELA 7).

Tabela 7 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em mg/mL dos extratos das folhas de *Annona crassiflora*, *Caryocar brasiliense* e *Schinopsis brasiliensis*

Amostra	<i>Annona</i>									
	<i>crassiflora</i>		<i>Schinopsis brasiliensis</i>				<i>Caryocar brasiliense</i>			
	Etanólico		Etanólico		Aquoso		Etanólico		Aquoso	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Staphylococcus spp.</i>										
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
<i>Escherichia coli</i>										
E2	150	150	150	> 150	37,5	150	150	> 150	150	> 150
E3	150	150	150	> 150	150	150	150	> 150	150	150
ATCC										
25922	150	150	150	> 150	150	150	150	> 150	150	> 150

Discussão

Neste estudo foram identificadas e caracterizadas três espécies bacterianas relacionadas à mastite bovina ou à colibacilose que têm promovido grande impacto negativo na pecuária mundial. As amostras de *E. coli* foram resistentes à tetraciclina e as de *S. aureus* foram resistentes aos antibacterianos vancomicina, oxacilina, clindamicina e penicilina. Já as amostras de *S. haemolyticus* foram sensíveis a todos antibióticos testados. Este resultado justifica a alta contaminação dos rebanhos bovinos com *S. aureus* e *E. coli*. Com a frequente administração de antibacterianos no controle da mastite e colibacilose, essas espécies têm sofrido intensa pressão de seleção, acumulando muitos alelos de resistência (Pereira and Siqueira Júnior, 1995). Esses resultados corroboram com o estudo de Coelho *et al.* (2007) que também relataram resistência de *S. aureus* isolados de mastite aos antibióticos ampicilina, penicilina, gentamicina, vancomicina e oxacilina. Segundo Duse *et*

al. (2015), um dos principais fatores associados à excreção de *E. coli* resistentes à tetraciclina em fezes de bovinos jovens, é a frequente administração sistêmica desse antibacteriano para vacas em lactação e bezerros para o tratamento de doenças.

Entre os 13 extratos vegetais avaliados, 12 extratos apresentaram efeito inibitório para as três espécies de bactérias avaliadas, o que indica a importância de estudos de bioprospecção com plantas do Cerrado para a busca de substâncias com efeitos antimicrobianos. Nesta pesquisa verificou-se diferenças na susceptibilidade aos extratos vegetais entre as espécies e cepas bacterianas avaliadas que devem ser elucidadas em futuros estudos.

Os extratos etanólico de *Annona crassiflora* e etanólico e aquoso de *Caryocar brasiliense* apresentaram perfis cromatográficos compatíveis com flavonóides. Esses perfis foram semelhante ao cromatograma obtido para a solução extrativa de *Psidium guajava*, que apresentou espectros de UV para flavonoides entre 271-281 nm (Versa *et al.* 2007).

Segundo Cushnie and Lamb (2005) os taninos estão inseridos no grupo dos flavonoides, podendo interagir com a membrana citoplasmática, inibindo a função e comprometendo a integridade celular. Podem também inibir a síntese de ácidos nucléicos e interromper o metabolismo bacteriano.

Os taninos possuem diversos mecanismos de ação antimicrobiana, pode-se destacar segundo Mello and Santos (2002), a inibição de enzimas, a modificação do metabolismo celular pela atuação nas membranas e a complexação com íons metálicos com consequente diminuição da sua disponibilidade para o metabolismo dos micro-organismos. Scalbert (1991) sugere que a ação de taninos reagindo com a membrana celular de micro-organismos e organelas celulares, pode causar a inibição da fosforilação oxidativa por mitocôndrias e a modificação na integridade de membranas na presença de ácido tânico, propondo que tais fenômenos sejam responsáveis pelas suas propriedades bactericidas. Segundo Loguercio *et al.* (2005) os polifenóis se complexam com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano.

Quando taninos condensados foram removidos, os extratos etanólico de *Caryocar brasiliense* e aquoso e etanólico de *Schinopsis brasiliensis* não

apresentaram inibição sobre as bactérias avaliadas. Os extratos brutos, com a presença de taninos, foram mais eficientes indicando que esse metabólito, de forma isolada ou juntamente em associação com outros compostos vegetais seria o principal componente com ação antibacteriana para esses extratos avaliados. Futuros estudos devem elucidar o mecanismo de ação desses extratos que podem estar relacionados a um complexo de substâncias que promoveriam a inibição bacteriana.

Nas espécies do gênero *Caryocar* estão descritas na literatura substâncias em quantidades expressivas de saponinas, carotenóides totais e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos agem como antioxidante, antimicrobiano e antiinflamatório. Foram realizados testes fitoquímicos no *Caryocar brasiliense* que identificaram taninos condensados, taninos hidrolisados, flavonoides, terpenoides e saponinas (Paula-júnior *et al.* 2006; Miranda-Vilela *et al.* 2008; Vieira *et al.* 2008).

Ao avaliar o efeito antibacteriano de *C. brasiliense* contra *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, Paula-Júnior *et al.* (2006) concluíram que substâncias antioxidantes presentes no extrato hidro-etanólico das folhas foram responsáveis pela atividade antimicrobiana. Estudo com extrato dessa espécie vegetal para o tratamento de feridas em camundongos mostrou que o óleo tem ação cicatrizante. As feridas do grupo tratado curaram rapidamente comparadas com o grupo controle que apresentaram secreção purulenta, o que não ocorreu no grupo tratado. Esse achado foi atribuído pelos autores a uma possível atividade antimicrobiana (Batista *et al.* 2010).

A família Annonaceae apresenta grande diversidade química, produzindo alcaloides, acetageninas, flavonoides, óleo essencial, compostos aromáticos e taninos. Para *A. crassiflora* já foi detectada a presença de alcaloides, acetogeninas, flavonoides e compostos fenólicos, predominantemente da classe das lignanas (Leboeuf *et al.* 1982; Roesler *et al.* 2007).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram o estudo de Lima *et al.* (2006), 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.

Nos resultados encontrados para a média de halos de inibição, para *Staphylococcus* spp. foram mais eficientes os extratos etanólico de *A. crassiflora* e aquoso de *S. brasiliensis*, sugerindo que esses extratos sejam mais indicados para o controle e prevenção das mastites bovinas. Já para *E. coli* os extratos foram estatisticamente semelhantes, ou seja, para o controle de diarreia em bezerros ou mastites ambientais poderiam ser selecionados os cinco extratos testados. O espectro de ação restrito para *E. coli* foi verificado somente para o extrato etanólico de *C. brasiliense* e futuras pesquisas devem elucidar esse mecanismo.

As diferenças de espectro de ação verificadas entre *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* poderiam ser justificadas pela constituição da parede celular, pois bactérias Gram negativas (*E. coli*) apresentam parede celular com fina camada de peptidoglicano, lipoproteína, membrana externa e interna e lipopolissacarídeo. Entretanto, bactérias Gram positivas (*S. aureus*) possuem estrutura celular mais rígida, parede celular quimicamente menos complexa e menor teor lipídico. Possivelmente, um constituinte específico do extrato de *C. brasiliense* como, por exemplo, as saponinas, poderiam apresentar maior toxicidade para a parede com maior teor de lipídios, como a de *E. coli* (Paula-Júnior *et al.* 2006; Harvey *et al.* 2008).

Silva *et al.* (2014) ao analisarem o extrato da folha de *A. crassiflora* sobre *S. aureus* multirresistentes de humanos e ATCC 6538 reportaram valores de halo de inibição de 10-14 mm. Em uma pesquisa com extrato da casca de *C. brasiliensis* sobre *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25753 nas concentrações de 200 a 500 mg/mL não obteve formação de halo de inibição em nenhuma concentração testada (Pinho *et al.* 2012).

Ao avaliar a castanha de caju, *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae), mesma família de *Schinopsis brasiliensis*, apresentou efeito sobre *S. aureus* com halo de inibição de 24 mm e para *E. coli* foi resistente (Gonçalves *et al.* 2005). Sobre diferentes cepas de *S. aureus* multirresistentes de origem hospitalar, apresentou halos de inibição no extrato puro e nas

concentrações 1:2 a 1:16, com diâmetros de inibição entre 10 e 20 mm (Silva *et al.* 2007).

Verificou-se que a CIM do extrato aquoso de *Schinopsis brasiliensis* para a amostra E2 de *E. coli* foi menor que aquela observada para os demais extratos e cepas, sugerindo melhor eficácia para essa bactéria. O extrato etanólico de *Annona crassiflora* apresentou CIM e CBM comprovada a 150 mg/mL para todas as cepas avaliadas, indicando que seria o mais seguro para garantir a completa inibição ou morte desses micro-organismos.

Silva *et al.* (2014) avaliaram o extrato da folha de *Annona crassiflora* sobre *S. aureus* multirresistentes de humanos e ATCC 6538 e verificaram CIM de 25 mg/mL para ambas as cepas e detectaram alcaloides e flavonoides como composto ativos.

Para os extratos etanólico e aquoso de *S. brasiliensis* e *Caryocar brasiliense* a CIM foi de 150 mg/mL para todas as cepas, porém a CBM foi maior que 150 mg/mL e para esses extratos houve variação da CBM entre os diferentes micro-organismos estudados. Amaral *et al.* (2014) descreveram CIM inferiores para o extrato etanólico de *Caryocar brasiliense* (CIM de 25 mg/mL) para *Eschechiria coli* ATCC 25922 e (100 mg/mL) para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Valores de CIM inferiores aos verificados nesta pesquisa para *S. brasiliensis* foram descritos por Saraiva *et al.* (2013). Para *E. coli* ATCC 9723 e *S. aureus* multirresistentes os autores verificaram CIM entre 25 a >100 µg/mL, dependendo da fração da folha utilizada.

Nesta pesquisa, amostras de *S. aureus* e *E. coli*, que apresentaram resistência a antibacterianos foram sensíveis aos cinco extratos selecionados (etanólico *A. crassiflora*, etanólico e aquoso de *S. brasiliensis* e *C. brasiliense*), apresentando halos de inibição e CIM para todas as cepas. Os extratos na forma natural, contendo taninos, são mais eficientes e esse metabólito representa o principal componente com ação antibacteriana. O extrato de folhas de *Annona crassiflora* apresenta maior espectro de ação, com CBM de 150 mg/mL. O etanólico de *Caryocar brasiliense* apresenta espectro mais restrito para *E. coli* com CIM de 150 mg/mL.

Esses extratos selecionados devem ser avaliados quanto à toxicidade aos animais e testados *in vivo* para serem então recomendadas para o controle alternativo de colibaciloses, mastites ou outras doenças relacionadas a essas bactérias.

Agradecimentos

A professora Anna Christina de Almeida por ceder às bactérias de mastite bovina. Este trabalho teve apoio da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

Conflito de interesse

Declaro não haver nenhum conflito de interesse.

Referências

- Amaral, L.F.B., Moriel, P., Foglio, M.A. and Mazzola, P.G. (2014) *Caryocar brasiliense* supercritical CO₂ extract possesses antimicrobial and antioxidant properties useful for personal care products. *BMC Complementary Altern Med* **73**.
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M. and Sparovek, G. (2014) Köppen's climate classification map for Brazil. *Met Zet* **22**, 711-728.
- Batista, J.S., Silva, C.M.F., Rodrigues, K.M.F.M., Costa, A.F., Oliveira, E.S., Paiva, F.V.A. and Nunes, R.G. (2010) Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* WITTM) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. *Arq Inst Biol* **77**, 441-447.
- Chagas, A.C.S. (2004) Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Rev Bras Parasitol Vet* **13**, 156-160.
- Chapaval, L., Moon, D.H., Gomes, J.E., Duarte, F.R. and Tsai, S.M. (2008) An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. *Arq Bras Med Vet Zootec* **60**, 299-306.

- Coelho, S.M.O., Moraes, R.A.M., Soares, L.C., Pereira, I.A., Gomes, L.P. and Souza, M.M.S. (2007) Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. *Ciênc Rural* **37**, 195-200.
- Cunnif, P. (Ed.) **Official methods of AOAC International**. AOAC International, ed. 16, v. 1, 1995.
- Cushnie, T.P.T. and Lamb, A.J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* **26**, 343-356.
- Duse, A. , Waller, K.P., Emanuelson, U., Unnerstad, H.E., Persson, Y. and Bengtsson, B. (2015) Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. *J Dairy Sci* **98**, 500–516.
- Gonçalves, A.L., Filho, A.A. and Menezes, H. (2005) Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol* **72**, 353-358.
- Guedes, R.C.M., Nogueira, N.G.P., Fusco-almeida, A.M., Souza, C.R.F. and Oliveira, W.P. (2009) Atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Petiveria alliacea* L. *Lat Am J Pharm* **28**, 520-524.
- Harvey, R.A., Champe, P.C. and Fisher, B.D. (2008) *Microbiologia ilustrada*. Artmed, 436 p.
- Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaaumik, P.K., Mukherjee, B. and Mukherjee, R. (1982) The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* **21**, 2783-2813.
- Lima, M.R.F., Ximenes, C.P.A., Luna, J.S. and Sant'ana, A.E.G. (2006) The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev Bras Farmacogn* **16**, 300-306.
- Loguercio, A.P., Battistin, A., Vargas, A.C., Henzel, A. and Witt, N.M. (2005) Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoolico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciênc Rural* **35**, 371-376.
- Mello, C.P. and Santos, S.C. (2002) *Taninos*. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento 4 ed*. Porto Alegre: Editora Universitária/UFRGS/Ed. da UFSC.

- Miranda-vilela, A.L., Resck, I.S. and Grisolia, C.K. (2008) Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. *Genet Mol Biol* **31**, 956-963.
- Morais-Costa, F.; Soares, A.C.M., Bastos, G.A., Nunes, Y.R.F., Gerassev, L.C., Braga, F.C., Lima, W.S. and Duarte, E.R. (2015) Plants of the Cerrado naturally selected by grazing sheep may have potential for inhibiting development of *Haemonchus contortus* larva. *Trop Anim Health Prod* **171**, 361-364.
- NCCLS (2005) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement*. [Online]. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. Available: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf>. [Accessed 10 may 2015].
- 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/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. [Accessed 10 may 2015].
- Paula-Júnior, W., Rocha, F.H., Donatti, L., Fadel-picheth, C.M.T. and Weffort-santos, A.M. (2006) Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. *Rev Bras Farmacogn* **16**, 625-630.
- Pereira, A.V., Silva, V.A., Freitas, A.F.R., Pereira, M.S.V., Trevisan, L.F.A., Costa, M.R.M. (2010) Extratos vegetais: atividade antimicrobiana e genético sobre plasmídios de resistência a antibióticos em microrganismos. *Rev Biol Farm* **4**,60-65.
- Pereira, M.S.V. and Siqueira Júnior, J.P. (1995) Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. *Lett Appl Microbiol* **20**, 391-395.

- Pinho, L., Souza, P.N.S., Macedo sobrinho, E., Almeida, A.C. and Martins, E.R. (2012) Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciênc Rural* **42**, 326-331.
- Reysenbach, A.L., Longnecker, K. and Kirshtein, J. (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3798-3806.
- Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Holanda, R.B., Souza, C.A.S. and Pastore, G.M. (2007) Atividade Antioxidante de frutas do Cerrado. *Ciênc Tecnol Alimentos* **27**, 53-60.
- Salvadori, M.R., Valadares, G.F., Leite D.S., Blanco, J. and Yano, T. (2003) Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Braz J Microbiol* **34**, 230-235.
- Santos, F.G.B., Mota, R.A., Silveira filho, V.M., Souza, H.M., Oliveira, M.B.M., Johner, J.M.Q., Leal, N.C., Almeida, A.M.P. and Leal albino, T.C. (2003) Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. *Napgamma* **6**, 19-23.
- Saraiva, A.M., Saraiva, C.L., Cordeiro, R.P., Soares, R.R., Xavier, H.S. and Caetano, N. (2013) Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Pl Med* **15**, 199-207.
- Scalbert, A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**, 3875-3883.
- Silva, J.G., Souza, I.A., Higino, J.S., Siqueira-junior, J.P., Pereira, J.V. and Pereira, M.S. (2007) Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Farmacogn* **17**, 572-577.
- Silva, J.J., Cerdeira, C.D., Chavasco, J.M., Cintra, A.B.P., Silva, C.B.P., Mendonça, A.N., Ishikawa, T., Boriollo, M.F.G. and Chavasco, J.K. (2014) *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**, 333-340.

Sistema para Análises Estatísticas (SAEG), Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes, UFV, Viçosa, 2007.

Tagg, J.R. and Mc. given, A.R. (1971) Assay sistem for bacteriocins. *Appl Microbiol* **21**, 943.

Toyang, N.J., Wanyama, J., Nuwanyakpa, M. and Django, S. (2007) *Ethnoveterinary medicine: a practical approach to the treatment of cattle diseases in sub-Saharan 2 ed. Africa.* . Roosendaal, Netherlands: Agromisa Foundation and CTA.

Versa, S.G., Kreinecker, M.T., Reis, V., Henrique, A.T. and Ortega, G.G. (2007) Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso da folha de *Psidium guajava L.* *Quím Nova* **30**, 815-820.

Vieira, A.P., Santos, N.R., Borges, J.H.S., Vincenzi, M.P.A. and Schmitz, W.O. (2008) Ação dos flavonoides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. *Semina (Londrina, Braz)* **29**, 65-74.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de extratos vegetais em substituição aos antibióticos no tratamento de doenças é promissora. Amostras de *S. aureus* e *E. coli* que apresentaram resistência a antibacterianos foram sensíveis aos extratos etanólico de *A. crassiflora*, etanólico e aquoso de *S. brasiliensis* e *C. brasiliense*, apresentando halos de inibição e CIM para todas as cepas. Os extratos na forma natural, contendo taninos, são mais eficientes e esse metabólito representa o principal componente com ação antibacteriana. O extrato de folhas de *Annona crassiflora* apresenta maior espectro de ação, com CBM de 150 mg/mL. O etanólico de *Caryocar brasiliense* apresenta espectro mais restrito para *E. coli* com CIM de 150 mg/mL.

Entretanto futuros estudos sobre a toxicidade desses extratos, mecanismos de ação e ensaios *in vivo* devem ser realizados para indicação efetiva e segura desses extratos para o controle de colibaciloses, mastites ou outras doenças relacionadas com essas bactérias patogênicas.