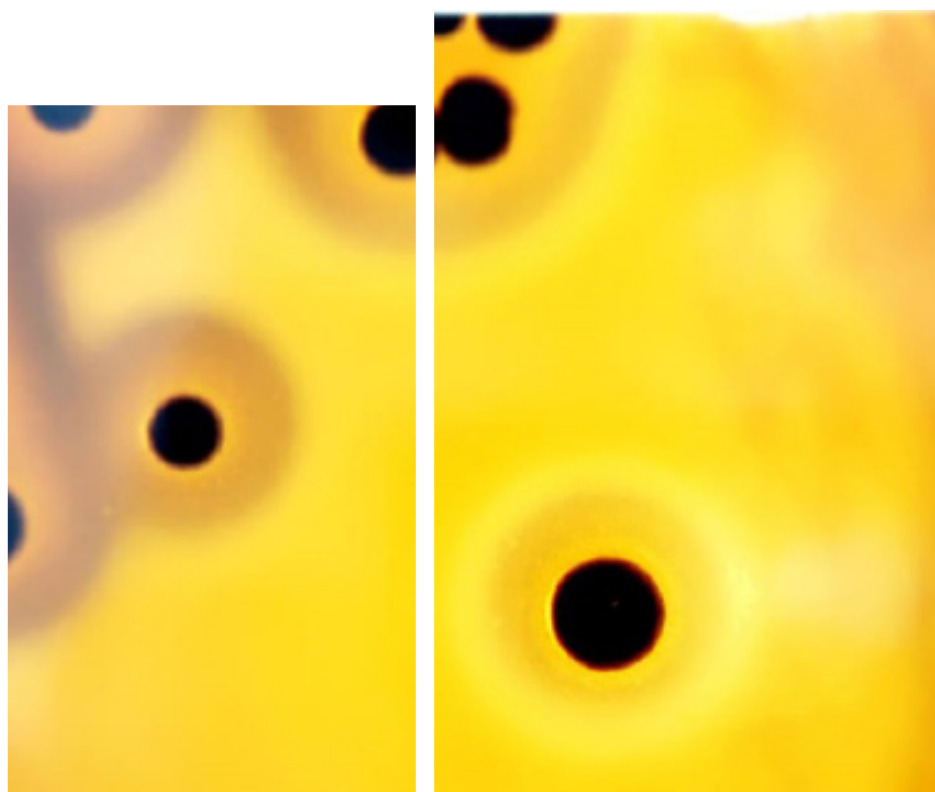


Concentração inibitória mínima de  
solventes utilizados na diluição de extratos  
vegetais com potencial antimicrobiano  
sobre *staphylococcus aureus*



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Pecuária Sudeste  
Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
42**

**Concentração inibitória mínima de  
solventes utilizados na diluição de extratos  
vegetais com potencial antimicrobiano  
sobre *staphylococcus aureus***

*Lea Chapaval  
João Oiano Neto  
Bruna Moraes Estella  
Amanda Araújo Cavalcante*

**Embrapa Pecuária Sudeste  
São Carlos, SP  
2018**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Pecuária São Carlos**  
Rod. Washington Luiz, km 234  
13560-970 , São Carlos, SP  
Fone: (16) 3411-5600  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente

*Alexandre Berndt*

Secretário-Executivo

*Simone Cristina Méo Niciurea*

Membros

*Emília Maria Pulcinelli Camarnado, Mara  
Angélica Pedrochi, Maria Cristina Campanelli  
Brito, Milena Ambrosio Telles*

Revisão de texto

*Milena Ambrosio Telles*

Normalização bibliográfica

*Mara Angélica Pedrocchi*

Editoração eletrônica

*Maria Cristina Campanelli Brito*

Foto da capa

*Léa Chapaval*

**1ª edição on-line: 2018**

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Pecuária Sudeste

---

Chapaval, Lea

Concentração inibitória mínima de solventes utilizados na diluição de extratos vegetais com potencial antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus* / Lea Chapaval et al. — São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2018.

16 p. – (Embrapa Pecuária Sudeste. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 42). ISSN 1981-2078

1. Mamite. 2. Microbiologia. 3. Extrato vegetal. 4. *Staphylococcus aureus*. I. Chapaval, Lea. II. Oiano Neto, João. III. Estella, Bruna Moraes. IV. Cavalcante, Amanda Araújo. II. Título. III. Série.

---

CDD: 636.089

© Embrapa, 2018

## Sumário

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos .....	9
Resultados e Discussão .....	9
Conclusões.....	14
Referências .....	14

## Concentração inibitória mínima de solventes utilizados na diluição de extratos vegetais com potencial antimicrobiano sobre *staphylococcus aureus*

Lea Chapaval<sup>1</sup>

João Oiano Neto<sup>2</sup>

Bruna Moraes Estella<sup>3</sup>

Amanda Araújo Cavalcante<sup>4</sup>

**Resumo** – A mastite é um processo infeccioso da glândula mamária de vacas leiteiras, responsável por grandes perdas econômicas do setor, em razão do comprometimento da produtividade. Em diversos países, o principal agente etiológico da mastite bovina é a bactéria *Staphylococcus aureus*, que possui fatores de virulência que conferem alta resistência aos antimicrobianos. A aplicação de extratos vegetais e/ou de micromoléculas isoladas de plantas é uma alternativa viável para o desenvolvimento de novos tratamentos terapêuticos. A etapa de avaliação da toxicidade dos solventes utilizados na diluição dos extratos concentrados torna-se tão importante quanto a avaliação dos extratos propriamente ditos. Neste estudo avaliou-se a atividade antibacteriana de 22 solventes (puros e em misturas) no desenvolvimento da cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 através da concentração inibitória mínima (CIM) por meio de microdiluição em placa. Todos os 21 solventes testados permitiram crescimento bacteriano em concentrações de solventes iguais a ou menores que 5%. No geral, os alcoóis e suas misturas permitiram o crescimento bacteriano até a diluição de  $10^{-6}$ , na concentração de 5%. Os melhores resultados foram obtidos com os surfactantes *Tween* 80 e dimetilsulfóxido (DMSO) e suas misturas, que, utilizados como solventes, possibilitaram o crescimento bacteriano em todas as concentrações e diluições avaliadas.

**Termos para indexação:** mastite; produtos naturais; microbiologia.

<sup>1</sup> Médica Veterinária, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste. lea.chapaval@embrapa.br

<sup>2</sup> Químico, pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste. joao.oiano@embrapa.br

<sup>3</sup> Graduanda em Medicina Veterinária. brunamrse@gmail.com

<sup>4</sup> Química. amanda.cavalcante@live.com

## Minimum inhibitory concentration of solvents used in the dilution of plant extracts with potential antimicrobial on *Staphylococcus aureus*

Abstract – Mastitis is an infectious process of the mammary gland of dairy cows, responsible for large economic losses in the sector, due to the commitment of the productivity. In several countries, the main etiological agent of bovine mastitis is *Staphylococcus aureus*, which has virulence factors that confer high resistance to antimicrobials. The application of plant extracts and / or micromolecules isolated from plants is a viable alternative for the development of new therapeutic treatments. The stage of evaluation of toxicity of the solvents used in the dilution of the concentrated extracts becomes as important as the evaluation of the extracts themselves. In this study, the antibacterial activity of 22 solvents (pure and in mixtures) in the development of the *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 through the minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution. All 21 solvents tested allowed bacterial growth at concentrations of solvents equal to or less than 5%. In general, alcohols and their mixtures allowed the bacterial growth until the dilution of 10<sup>-6</sup>, in the concentration of 5%. The best results were obtained with surfactants Tween 80 and dimethylsulfoxide (DMSO) and their mixtures, which, used as solvents, allowed the bacterial growth in all the concentrations and dilutions evaluated.

**Index terms:** mastitis, natural products, microbiology

## Introdução

O leite, por natureza, é um alimento rico em nutrientes, e sua qualidade é um dos temas mais discutidos dentro do cenário nacional de produção leiteira (FONSECA; SANTOS, 2001). Segundo Langoni et al. (2011), o controle de qualidade no setor de laticínios inicia-se bem antes da produção da matéria prima nas fazendas ou granjas leiteiras, pois o leite de boa qualidade só é obtido de animais saudáveis, adequadamente manejados, bem nutridos e livres de doenças ou infecções. A mastite, inflamação da glândula mamária, é uma das principais doenças que acometem os bovinos leiteiros, e os principais impactos econômicos dessa enfermidade são: queda na produção leiteira; perda na qualidade do leite; maior custo de produção; descarte prematuro de vacas por perda de um ou mais quartos mamários, que se tornam fibrosos e improdutivos.

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças é uma estratégia antiga, utilizada praticamente por todas as populações. Registros históricos desde 4.000 a.C. comprovam a utilização de plantas na busca pela cura de enfermidades entre os povos egípcios e chineses, além de outros.

O Brasil possui a maior biodiversidade de plantas do mundo, com um número estimado acima de 20% do número total de espécies do planeta. Com mais de 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial, essa rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e de conhecimento tradicional associado. Aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica humana advêm direta ou indiretamente de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais (CARVALHO et al., 2008).

Em razão do aumento da resistência bacteriana às múltiplas drogas antimicrobianas, ocorre a procura por novas alternativas terapêuticas. Nesse cenário, as plantas medicinais representam uma importante fonte para a obtenção desses medicamentos. A atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais foi comprovada em vários estudos realizados em países que possuem uma flora diversificada, tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia (HOLETZ et al., 2002; NOVAIS et al., 2003;

NOSTRO et al., 2004; AHMED; SELIM; SHILPI, 2005; LIMA et al., 2006; PAREKH; CHANDA, 2007; PORFÍRIO et al., 2009; CANTON; ONOFRE, 2010; MULYANINGSIH et al., 2011; CHEN-LUNG; PEI-CHUN; YU-CHANG, 2012). Apesar de os antibacterianos derivados de plantas serem menos potentes, os vegetais combatem infecções com sucesso. Além de sua importância no tratamento de infecções humanas, estudos de etnoveterinária mostram a utilização de diversas plantas medicinais por produtores rurais. Essas plantas têm sido utilizadas no tratamento de infecções de animais como vacas, ovelhas, aves domésticas, cavalos e porcos (MARINHO et al., 2007; DIAZ et al., 2010).

*Staphylococcus aureus* destaca-se como microrganismo causador de mastite contagiosa de maior importância e de maior ocorrência nos rebanhos mundiais. É também o microrganismo patogênico mais frequentemente isolado no leite cru. É importante lembrar que *S. aureus* está envolvido em infecções intramamárias de fêmeas em lactação e é o principal agente causador de mastite em bovinos, capaz de produzir grande variedade de toxinas extracelulares, além de apresentar grande resistência aos antimicrobianos.

A presença de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal é uma preocupação em termos de segurança alimentar e a aplicação de extratos vegetais e/ou de micromoléculas isoladas de plantas é uma alternativa viável para o desenvolvimento de novos tratamentos terapêuticos. Além disso, moléculas provenientes do metabolismo secundário vegetal servem de modelo químico (*lead compounds*) para a síntese de compostos com uma dada ação terapêutica.

Considerando o emprego de extratos de plantas e para evitar a obtenção de resultados errôneos, é importante que a atividade dos solventes seja avaliada. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de 21 solventes (puros e em misturas) no desenvolvimento da cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 .



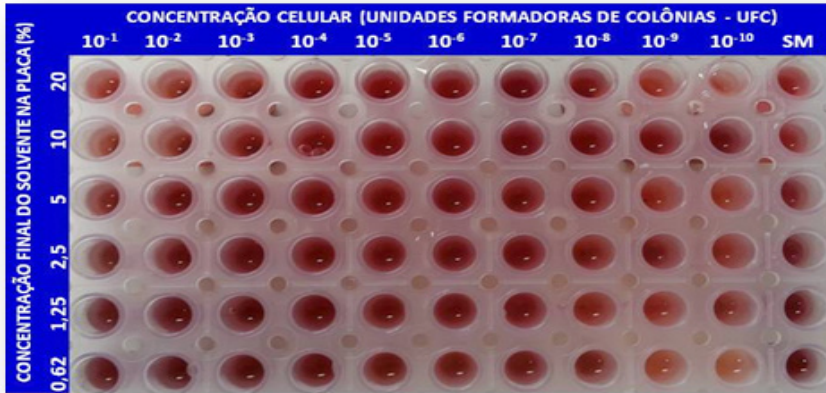
## Material e Métodos

Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), optou-se pelo método de Ellof (1998), o qual, por meio de microdiluição em placa, permite avaliar quantitativamente o potencial antimicrobiano de uma planta, o que torna possível comparar as respostas de diferentes amostras como extratos, frações e substâncias puras obtidas do mesmo material (BUGNO et al., 2007). Como revelador do crescimento bacteriano, foi utilizado o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC - Sigma Aldrich®) que, na presença de células viáveis, facilita a verificação da presença de crescimento microbiano (coloração vermelha indica ausência de crescimento visível). Em placas estéreis de poliestireno com 96 poços em fundo 'U', foram adicionados 100 µL de inóculo bacteriano em meio Brain Heart Infusion (BHI - BioMerieux®) em diferentes diluições (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup> UFC/mL e solução mãe) e 100 µL dos solventes em diferentes concentrações (20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25% e 0,62%).

As placas foram incubadas a 37°C por 24h em estufa bacteriológica. A leitura das placas foi realizada visualmente com a adição de 50 µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC - Sigma Aldrich®) em cada poço e incubadas novamente a 37°C por 2h em estufa bacteriológica.

## Resultados e Discussão

As Figuras 1 e 2 indicam os resultados obtidos. As colorações vermelha e amarela indicaram, respectivamente, presença e ausência de células ativas.



**Figura 1.** Placa de 96 poços contendo meio BHI em diferentes diluições de *Staphylococcus aureus* e solventes. A coloração vermelha indica a presença de atividade bacteriana.



**Figura 2.** Placa de 96 poços contendo meio BHI em diferentes diluições de *Staphylococcus aureus* e solventes. A coloração vermelha indica a presença de atividade bacteriana e a coloração amarela, ausência de atividade bacteriana.

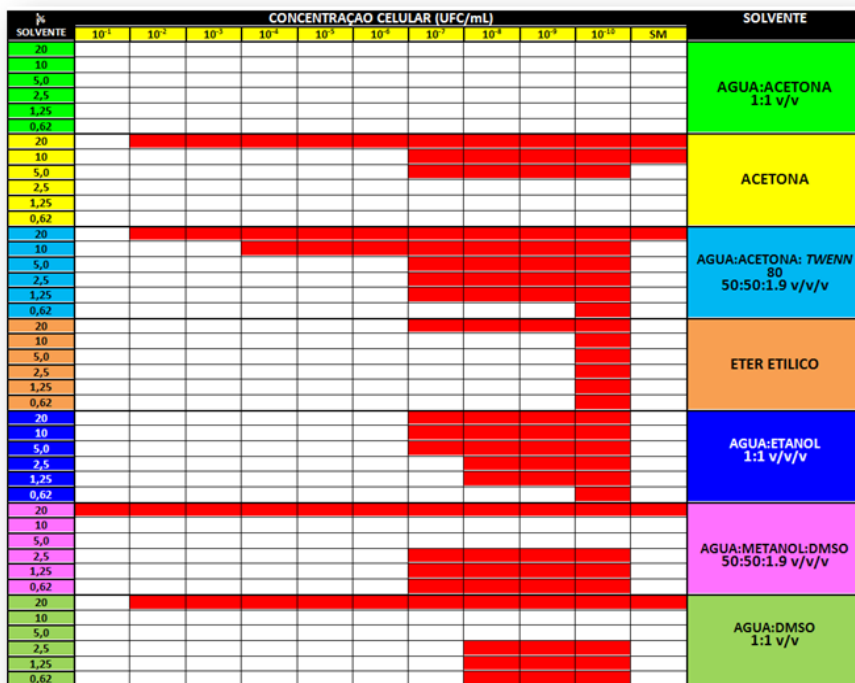
As Figuras 3, 4 e 5 mostram a CIM dos solventes frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As barras vermelhas indicam as concentrações celulares onde não houve crescimento bacteriano, em função da concentração do solvente utilizada no meio de incubação.

% SOLVENTE	CONCENTRAÇÃO CELULAR (UFC/mL)											SOLVENTE	
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	SM		
20													TWEEN 80
10													
5,0													
2,5													
1,25													
0,62													TWEEN 80 3%
20													
10													
5,0													
2,5													
1,25													
0,62													AGUA:TWEEN 80 100:2 v/v
20													
10													
5,0													
2,5													
1,25													
0,62													AGUA:CRODAMOL® 1:1 v/v
20													
10													
5,0													
2,5													
1,25													
0,62													TWEEN 20 3%
20													
10													
5,0													
2,5													
1,25													
0,62													ACETATO DE ETILA
20													
10													
5,0													
2,5													
1,25													
0,62													ETANOL
20													
10													
5,0													
2,5													
1,25													
0,62													

**Figura 3.** Concentração inibitória mínima dos solventes frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Barras vermelhas indicam as concentrações celulares onde não houve crescimento bacteriano, em função da concentração do solvente utilizada no meio de incubação.

% SOLVENTE	CONCENTRAÇÃO CELULAR (UFC/mL)										SOLVENTE	
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$		SM
20												CLOROFORMIO
10												
5,0												
2,5												
1,25												
0,62												
20												DICLOROMETANO
10												
5,0												
2,5												
1,25												
0,62												
20												DIMETILSULFOXIDO
10												
5,0												
2,5												
1,25												
0,62												
20												METANOL
10												
5,0												
2,5												
1,25												
0,62												
20												AGUA:METANOL 1:1 v/v
10												
5,0												
2,5												
1,25												
0,62												
20												AGUA:METANOL: TWENN 80 50:50:1.9 v/v/v
10												
5,0												
2,5												
1,25												
0,62												
20												AGUA:METANOL: CRODAMOL® 50:50:1 v/v/v
10												
5,0												
2,5												
1,25												
0,62												

**Figura 4.** Concentração inibitória mínima dos solventes frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Barras vermelhas indicam as concentrações celulares onde não houve crescimento bacteriano, em função da concentração do solvente utilizada no meio de incubação.



**Figura 5.** Concentração inibitória mínima dos solventes frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Barras vermelhas indicam as concentrações celulares onde não houve crescimento bacteriano, em função da concentração do solvente utilizada no meio de incubação.

A etapa de avaliação da toxicidade dos solventes utilizados na diluição dos extratos concentrados torna-se tão importante quanto a avaliação dos extratos propriamente ditos. A utilização de solventes que não forneçam resultados errôneos (falsos negativos ou positivos) é crucial para que a atividade antimicrobiana seja avaliada de forma correta.

O solvente utilizado e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é aspecto-chave na extração de polifenóis e, conseqüentemente, na capacidade antioxidante (ROCKENBACH et al., 2008). Muitos estudos vêm demonstrando a influência da extração no teor de metabólitos secundários (VONGSAK et al., 2013; BAMPOULI et al., 2014; KARABEGOVIĆ et al., 2014).

Levando em consideração os solventes utilizados, observa-se que os de base hidroalcoólica mostraram melhores resultados do que os outros. A utilização de solventes dessa natureza permitiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, o que é um efeito positivo para sua utilização nos extratos de forma, pois permite avaliar a atividade bactericida/bacteriostática dessas substâncias.

Na próxima etapa de estudo, os extratos vegetais concentrados que se mostrarem mais ativos serão submetidos ao fracionamento cromatográfico e as subfrações obtidas nesse processo terão sua atividade bactericida/bacteriostática novamente avaliada no ensaio *in vitro*.

## Conclusões

Este estudo foi fundamental para estabelecer as faixas de concentração celular x concentração do solvente ideal para os ensaios futuros, quando será avaliada a ação bactericida/bacteriostática dos extratos vegetais concentrados. Os solventes que se mostraram menos tóxicos no presente estudo serão utilizados na solubilização dos extratos vegetais concentrados, que serão submetidos ao ensaio biológico *in vitro*.

## Referências

AHMED, F.; SELIM, M. S. T.; SHILPI, J. A. Antibacterial activity of *Ludwigia adscendens*. **Fitoterapia**, [S.l.], v.76, p.473-475, 2005.

BAMPOULI, A. et al. Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, [S.l.], v.1, n.3, p.81-91, 2014.

BUGNO, A.; NICOLETTI, M. A.; ALMODOVAR, A. R.; PEREIRA, T. C.; AURICCHIO, M. T. Antimicrobial efficacy of *Durcuma zedoaria* extract as assessed by linear regression compared with commercial mouthrinses. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38, p.440-445, 2007.

CANTON, M.; ONOFRE, S. B. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., *Asteraceae*, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.20, n.3, p.348-354, 2010.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.18, n.2, p.314-319, 2008.

CHEN-LUNG, H.; PEI-CHUN, L.; YU-CHANG, S. Composition and antimicrobial activities of the leaf essential oil of *Machilus zuihoensis* from Taiwan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.22, n.2, p.277-283, 2012.

DIAZ, M. A. N.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, D. M.; RIBON, A. O. B.; AGUILAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.20, p.724-728, 2010.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, [S.l.], v.64, p.711-713, 1998.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos, 2001. 175 p.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

KARABEGOVIĆ, I. T. et al. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, [S.l.], v.54, p.142-148, 2014.

LANGONI H.; PENACHIO D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.31, p.1059-1065, 2011.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v.105, p.137-147, 2006.

MARINHO, M. L.; ALVES, M. S.; RODRIGUES, M. L. C.; ROTONDANO, T. E. F.; VIDAL, I. F.; SILVA, W. W.; ATHAYDE, A. C. R. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v.9, p.64-69, 2007.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; REICHLING, J.; WINK, M. Antibacterial activity of essential oils from Eucalyptus and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharmaceutical Biology**, Nova York, v.49, n.9, p.893-899, 2011.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, Plymouth, v.230, n.2, p.191-195, 2004.

NOVAIS, T. S.; COSTA J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.13, supl. 2, 2003.

PAREKH, J.; CHANDA, S. V. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some indian medicinal plants. **Turkish Journal of Biology**, Turkey, v.31, p.53-58, 2007.

PORFÍRIO, Z.; MELO FILHO, G. C.; ALVINO, V.; LIMA, M. R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoesia pacari* A. St.-Hil., *Lythraceae*, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.19, n.3, p.785-89, 2009.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, p.238-244, 2008.

VONGSAK, B. et al. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**, [S.l.], v.44, p.566–571, 2013.





---

*Pecuária Sudeste*

MINISTÉRIO DA  
**AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO**



CGPE: 14806