

AÇÃO DE DIFERENTES ANTIMICROBIANOS SOBRE ESTIRPES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

Action of different antimicrobials on strains of staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis

Resumo:

A matite estafilocócica é uma das principais doenças que causam prejuízo na produção de leite. O objetivo dessa pesquisa foi investigar a ação de antimicrobianos em diferentes estirpes de *Staphylococcus aureus*, isolados de mastite bovina. Essas estirpes, foram submetidas a antibióticos (oxacilina, tetraciclina, penicilina, cefepime, ciprofloxacina, cefalotina, gentamicina e ampicilina). As cepas que apresentaram maior sensibilidade aos antibióticos foram submetidas a um outro antibiograma com extrato hidroalcoólico de orégano, cravo da Índia, canela e pimenta calabresa. Os resultados desse experimento mostraram que apenas os antibióticos cefalotina, ciprofloxacina e ampicilina inibiram todas as estirpes de *S. aureus* testadas. Verificou-se que 63% das estirpes, apresentaram múltipla resistência aos antibióticos. A pimenta calabresa não demonstrou efeito inibitório contra os *S. aureus*. O extrato de cravo e o de orégano mostraram potencial inibitório com produção de halo de 11 mm e 9 mm respectivamente.

Abstract:

Staphylococcal mastitis is one of the major diseases causing loss in milk production. The objective of this research was to investigate the action of antimicrobials against different strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. These strains submitted to antibiotics (oxacillin, tetracycline, penicillin, cefepime, ciprofloxacin, cephalothin, gentamicin and ampicillin). The strains that showed the highest sensitivity to the antibiotics were submitted to another antibiogram with hydroalcoholic extract of oregano, clove, cinnamon and Calabrian pepper. The results of this experiment showed that only the cephalothin, ciprofloxacin and ampicillin antibiotics inhibited all *S. aureus* strains tested. It was found that 63% of the strains showed multiple resistance to antibiotics. Calabrian pepper showed no inhibitory effect against *S. aureus*. The clove and oregano extract showed inhibitory potential with halo production of 11 mm and 9 mm, respectively.



*Klecianny Bezerra de Melo,
Marilene da Silva Lima, Juliana
Hellen da Silva Melo, Raniele
Oliveira Alves, Emerson
Rodrigues Costa¹*

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco. E-mail: kleciannymelo@gmail.com

Contato principal

Klecianny Bezerra de Melo¹



*Palavras chave: Mastite, antimicrobianos,
Staphylococcus aureus*

*Keywords: Mastitis, antimicrobials,
Staphylococcus aureus*



INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma afecção de cunho multifatorial que tem nas inter-relações entre o hospedeiro, o ambiente e os agentes infecciosos como fatores determinantes para sua ocorrência (LE BLANK et al., 2006). A presença dessa doença, nos animais, significa para o produtor um menor retorno econômico, devido à redução na produção, aos gastos com medicamentos e também com as penalidades aplicadas pelos laticínios. Além desses prejuízos, esta enfermidade representa um risco à saúde do consumidor (CASSOL et al., 2010). A doença acarreta prejuízos à indústria de laticínios devido a alterações na composição físico-química do leite, e ainda constitui ameaça à saúde dos consumidores devido à veiculação de patógenos e suas toxinas, ou pela presença de resíduos de antibióticos no leite (SANTOS, 2007; OLIVEIRA 1999). A doença pode ser classificada sob duas formas, clínica e subclínica, caracterizadas, respectivamente, pela presença e pela ausência de alterações visíveis das composições físico-química e bacteriológica do leite, bem como dos tecidos do quarto mamário afetado (MACDONALD, 1979).

A sensibilidade de *S. aureus* aos diferentes antibióticos empregados no tratamento das doenças animais é de grande importância, pois visa fornecer subsídios para a terapia do animal acometido, bem como para todos os animais do rebanho submetidos às mesmas condições de manejo e, portanto, sob os mesmos riscos de infecção. Por todo o mundo, o aumento de prevalência de *S. aureus* multi-resistentes causadores de mastite bovina é grave, com a redução da efetividade de antimicrobianos e o aumento da morbidade e dos custos para combater a doença. Existe heterogeneidade genética considerável em populações naturais de *S. aureus*. Além disso, este é um importante patógeno responsável por casos de doenças de origem alimentar, por meio da ingestão de toxinas, constituindo um problema de saúde pública (SABOUR et al., 2004; FAGUNDES et al., 2004).

Nos últimos anos, o uso indiscriminado de antibióticos, favoreceram o aumento da resistência de bactérias aos fármacos. Isso impulsionou pesquisas no descobrimento de substâncias que pudessem ser utilizadas em terapias com ação antimicrobiana. (GONÇALVES et al., 2005). O emprego dos medicamentos fitoterápicos é uma excelente alternativa no tratamento contra diferentes patógenos. Desde a extração e obtenção de óleos essenciais das plantas, são adquiridos compostos que, apesar de conter uma estrutura química diferenciadas dos antimicrobianos produzidos a partir de bactérias e fungos, têm demonstrado grande potência quando se trata do controle no crescimento de micro-organismos patógenos. (CARVALHO et al., 2014).

A indústria de alimentos sempre utilizou os aditivos químicos com o objetivo de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos, bem como os deteriorantes. Algumas alternativas comprovadas para a substituição destes produtos são as especiarias e condimentos, tais

como: cravo (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum verum*), coentro (*Coriandrum sativum*), alho (*Allium sativum*), gengibre (*Zingiber officinale*), tomilho (*Thymus vulgaris*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e sálvia (*Salvia officinalis*). Estes podem ser utilizados tanto *in natura* como também nas formas de extratos, farinha e óleos essenciais além da possibilidade de produção de óleos essenciais para a aplicação direta e indireta, na forma de ingrediente na constituição de determinados alimentos (PINHO, 2012; CRUZ, 2010; FOGGIO et al., 2006)

Segundo Trajano et al. (2009), a bioconservação, dos alimentos, utilizando especiarias com potencial antimicrobiano, é uma tendência da área de Ciência e Tecnologia de alimentos

Assim e diante da relevância do tema, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação de diferentes antimicrobianos naturais, frente a diferentes estirpes de *Staphylococcus aureus*, isoladas de mastite bovina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local da realização

Essa pesquisa foi realizada nos meses de junho e julho de 2017 no Laboratório de ensino de biologia animal (LEBA) da UFRPE, Unidade Acadêmica de Garanhuns, PE.

Micro-organismos

Foram utilizadas treze estirpes de *Staphylococcus aureus*, cedidas pelo laboratório de microbiologia do CENLAG, UFRPE. Como controle, foi utilizado o *S. aureus* ATCC 25923. Os micro-organismos foram mantidos sob congelamento a -18°C em caldo BHI. A reativação dos mesmos ocorreu 48 horas, antes do experimento, utilizando caldo BHI.

Fármacos antimicrobianos

Para os testes da atividade antimicrobiana foram adquiridos oito diferentes tipos antibióticos em discos: Ampicilina (AMP-10µg), Gentamicina (GEN-10µg), tetraciclina (TET-30µg), Oxacilina (OXA- 1µg), Cefepime (CPM-30µg), Penicilina G (PEN-10 UI), Cefalotina (CFL-30µg), Ciprofloxacina (CIP- 5 µg).

Produção do extrato hidroalcoólico

Foram adquiridas quatro tipos de especiarias para a produção do extrato hidroalcoólico: Canela (CAN), Cravo (CRA), Pimenta calabresa (CAL) e Orégano (ORE), adquiridas em comércio local. O material vegetal foi levado ao laboratório onde foram pesados 25 gramas, de cada especiaria, posteriormente triturados e adicionados de 100 mL de uma solução de álcool a 50% em Erlenmeyer. Os Erlenmeyers foram levados ao banho maria a 60°C por 60 minutos. Posteriormente foi realizada filtração em papel de filtro estéril. A solução foi então levada para evaporar em estufa a 40°C até peso constante. O material foi ressuspendido com água(10mL) destilada

estéril (PINHO, 2012). O extrato foi armazenado sob congelamento a -18°C até o momento das análises.

Inóculo Bacteriano

Para preparo do inóculo, todas as estirpes testadas nesse experimento foram previamente repicadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas antes do teste. A suspensão bacteriana foi preparada em tubos com solução salina a 0,85% até a turbidez conforme escala *MacFarland* 0,5(10⁸ UFC/mL) em espectrofotômetro a 580 nm.

Antibiograma

Primeiramente, realizou-se o teste de sensibilidade com as estirpes de *S. aureus* com os seguintes fármacos antimicrobianos: Foram preparadas placas com ágar *Mueller Hinton* para os testes de difusão em disco. As suspensões bacterianas (100µL) foram inoculadas nas placas e espalhadas com alça *Drigalski*. Os discos de cada fármaco foram colocados sobre o ágar e as placas levadas a estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após esse período, os halos de inibição foram medidos em milímetros com auxílio de uma régua escolar.

As estirpes que apresentaram maior sensibilidade aos fármacos foram selecionadas e submetidas a um novo teste de sensibilidade, utilizando os extratos das especiarias. Para tanto, discos de papel de filtro, com 6 mm de diâmetro, foram confeccionados e posteriormente esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Placas contendo o meio *Mueller Hinton*, receberam 100µ das suspensões bacterianas das estirpes selecionadas e espalhadas com alça *Drigalski*. Sobre o ágar foram colocados os discos de papel de filtro e sobre esses, uma alíquota de 10 µL do extrato produzido, para cada estirpe. As placas foram incubadas novamente em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela formação de halo de inibição de crescimento bacteriano em milímetros de diâmetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade inibitória de fármacos antimicrobianos sobre estirpes de *Staphylococcus aureus*

A atividade antimicrobiana dos fármacos pode ser vista na Tabela 1. Conforme os dados, observa-se que os antibióticos que apresentaram maior atividade contra as estirpes, foram a ciprofloxacina, cefalotina e ampicilina, essas apresentaram atividade inibitória em 100% das bactérias, seguido da oxacilina(81,8%) e gentamicina (72,7%). Os menores halos foram observados na tetraciclina (54,%), cefepime (45%) e penicilina. As estirpes 119, 160, 127, 198 e 223, ou seja 63%, das apresentaram múltipla resistência aos antibióticos. Esse comportamento de resistência do *S. aureus*, foi observada entre os isolados de mastite, realizado por Costa et al. 2013. De acordo com estes autores, é necessário um monitoramento do perfil desse gênero afim de investigar a evolução da sensibilidade, destes micro-organismos ao mesmo antibiótico em períodos diferentes.

Os maiores halos de inibição foram obtidos com CFL (30 mm). Zafalon et al.(2007) ao considerar as sensibilidades médias de *S. aureus* isolados de amostras de leite, aos diferentes antimicrobianos, encontraram um percentual de inibição de 87% para a gentamicina, valor que aproxima-se com o do nosso estudo. Em outra pesquisa Zafalon et al. (2012) observaram que entre os princípios ativos de maior resistência por parte das estirpes de *S. aureus*, figuraram a penicilina G, a ampicilina e a oxacilina (77,3%, 68,2% e 40,9%, respectivamente), diferindo com o resultado deste estudo o qual a ampicilina mostrou-se 100% eficaz para a inibição das cepas testadas. A seleção de bactérias resistentes pelo uso incorreto de antimicrobianos, além das modificações biológicas introduzidas pelo próprio homem, podem explicar as diferenças encontradas na sensibilidade bacteriana, o que tornar difícil a comparação de resultados entre diferentes estudos (LANGONI et al., 1984).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana(mm) de fármacos sobre diferentes estirpes de *Staphylococcus aureus*, isolados de mastite bovina.

Código das Estirpes	Fármacos antimicrobianos testados							
	OXA	TET	PEN	CPM	CIP	CFL	GEN	AMP
*25923	R	R	6	R	21	20	13	34
93	11	13	R	R	20	25	14	20
115	14	13	7	15	19	24	20	11
117	16	30	8	17	24	24	14	14
119	R	R	R	R	19	28	R	8
127	2	2	R	R	19	28	R	8
160	6	2	R	R	19	28	R	8
198	6	R	R	R	17	9	20	20
223	R	R	R	15	19	22	11	6
321	13	R	R	15	19	22	11	6
342	19	22	6	19	24	30	12	19

*- micro-organismo controle; **R**- estirpe resistente ao fármaco; **OXA**-oxacilina; **TET**-tetraciclina; **PEN**- penicilina G; **CPM**-cefepime; **CIP**-ciprofloxacina; **CFL**- cefalotina; **GEN**-gentamicina; **AMP**-ampicilina

Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de especiarias sobre estirpes de *Staphylococcus aureus*

Conforme os resultados obtidos, nesse experimento, os extratos hidroalcoólicos das especiarias, que não conseguiram inibir as estirpes do *S. aureus*, não estão representados no Gráfico 1. Observou-se que a estirpe 117

apresentou resistência a todas as especiarias. Já o extrato de cravo foi o que se mostrou mais eficiente para inibição das estirpes, apresentando um halo de 11 mm. Essa atividade se deve as características do cravo (*Eugenia caryophyllata*) que já é reconhecido anti-inflamatório e efeitos antibacterianos (HEMAISWARYA, 2009).

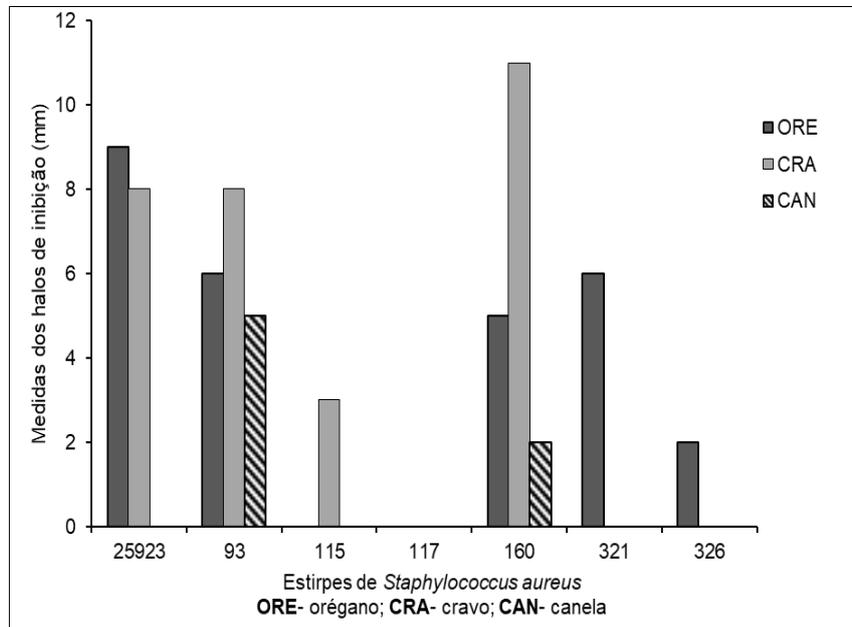


Figura 1. Atividade antimicrobiana (mm) dos extratos hidroalcoólicos de especiarias sobre estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.

O extrato de orégano foi o segundo mais eficiente, apresentando um halo de 9 mm de inibição porém esses valores estão bem abaixo dos resultados encontrados por Cruz (2010). Este testou extrato hidroalcoólico do orégano em *S. aureus* obtendo halo superior a 30mm de diâmetro. SANTOS et al. 2011 verificaram que as cepas de *S. aureus* foram mais susceptíveis aos óleos de cravo, orégano e alho que as demais bactérias por eles utilizadas em seus estudos. Também ressaltaram que o óleo essencial de alho apresentou atividade antibacteriana frente o *S. aureus* e a *Salmonella choleraesuis*; já os óleos de cravo e orégano apresentaram atividade frente a todas as bactérias analisadas. Em levantamento feito por Tarcitano (2017), este concluiu em seu trabalho que o orégano, dentre todos os antimicrobianos de origem vegetal, foi a especiaria mais eficaz, controle bacteriano. Esse efeito é justificado por Marino et al. 2001, que atribui essa atividade antibacteriana, aos compostos fenólicos, contidos no orégano, que se dissolvem na membrana plasmática, penetrando na célula e alterando suas funções vitais e causando morte do micro-organismo.

Pode-se observar que o extrato de canela foi o menos eficiente, neste estudo, onde a média do halo de inibição foi de 3,7 mm.

Os extratos hidroalcoólicos parecem inibir os micro-organismos por mecanismos que envolvem a alteração dos canais de cálcio, na bicamada da membrana lipídica, na célula, causando aumento na permeabilidade e liberação

dos constituintes intracelulares. Assim podem ocorrer danos ao sistema enzimático, na síntese de componentes vitais, como também danos no material genético do micro-organismo alvo (CRUZ, 2010; PORTE, 2001).

CONCLUSÃO

Os resultados, desse experimento, mostraram que os antibióticos cefalotina, ciprofloxacina e ampicilina inibiram todas as estirpes de *Staphylococcus aureus* testadas. A cefalotina produziu o maior halo de inibição. Verificou-se que 63% das estirpes, apresentaram resistência a mais de dois tipos de antibióticos. Nos testes com extratos hidroalcoólicos, a pimenta calabresa não demonstrou efeito inibitório contra os micro-organismos. O extrato de cravo e o de orégano mostraram potencial inibitório com produção de halo de 11 mm e 9mm respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASSOL, D.M.S. et al. Mastite bovina. *A Hora Veterinária*, v.29, n.175, p.27-31, 2010.

CARVALHO, A.F.; SILVA, D.M.; SILVA, T.R.C.; SCARCELLI, E.; MANHANI, M.R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria*

- chamomilla L.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.3, p.521-526, 2014.
- COSTA, G. M.; BARROS, R. A. B.; CUSTÓDIO, D. A. C.; PEREIRA, U. P.; FIGUEIREDO, D. J.; SILVA, N. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 80, n. 3., p. 297-302, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/aib/v80n3/06.pdf>. Acesso em 04/09/2017.
- CRUZ, P. B.; PEREIRA, C. A. M. Avaliação da presença de antimicrobianos naturais em condimentos industrializados. **Revista Simbio-logias**, v. 3, n.5, p. 125-131, 2010. Disponível em: <http://www.redesans.com.br/redesans/wp-content/uploads/2012/10/avaliacao-da-presen%C3%A7a-paraleitura.pdf>. Acesso em: 03/09/2017.
- FAGUNDES, H, OLIVEIRA, CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.
- FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUZA, I. M.O.; RODRIGUES, R. A.F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Revista Multiciência**. Construindo a história dos produtos naturais. Campinas, n. 7, out. 2006. Disponível em: http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf. Acesso em 06/09/2017.
- GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigon testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Arquivos do Instituto de Biologia**. São Paulo, v. 72, n. 4, p. 455-459, 2005.
- HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 997-1005, 2009.
- LANGONI, H.; CORREA, C. N. M.; CORREA, W. M. Etiologia e tratamento das mastites bovinas auxílio do Dimetilsulfoxido. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 1984.
- LEBLANK, S.J.; LISSEMORE, K.D.; KELTON, D.F.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of Dairy Sciences**, v.89, p.1267-1279, 2006.
- MACDONALD, J. S. Bovine mastitis: introductory remarks. **Journal Dairy Science**. v. 62, p. 117-8, 1979.
- MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **Journal of Food Microbiology**, v.67, n.3, p. 187-195, 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501004470>. Acesso em: 02 de setembro de 2017.
- OLIVEIRA, M.C.S. Manejo sanitário em sistemas intensivos de produção de leite. (Embrapa Pecuária Sudeste. Circular técnica, 18). **São Carlos: EMBRAPA - CPPSE**, 1999. 22p.
- PINHO, L.; SOUZA, P. N.S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Atividade Antimicrobiana de Extratos hidroalcoólicos das Folhas de Alecrim-pimenta, Aroeira, Barbatimão, Erva baleeira e do farelo da casaca de Pequi. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.
- PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **Boletim do Ceppa**, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.
- SABOUR PM, GILL JJ, LEPP D, PACAN JC, AHMED R, DINGWELL R et al. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Journal Clin Microbiology**, v.42, n.8, p. 3449-3455, 2004.
- SANTOS, M.V; FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite. **São Paulo: Editora Manole Ltda**, 2007, 314p.
- SANTOS, J. C.; CARVALHO FILHO, C. D.; BARROS, T. F.; GUIMARÃES, A.G. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. **Semina: Ciências agrárias**, Londrina, v.32, n.4, p.1557-1564, 2011. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/5392/8915>. Acesso em: 03/09/2017.
- TARCITANO, J. A. C.; MESQUITA, E. F. M. Ação dos condimentos alimentares in natura sobre a microbiota patogênica durante o processamento, preparo e/ou consumo do pescado: Uma revisão sistemática de literatura, **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 50, n.1, p. 141-162, 2017.
- TRAJANO, V.N.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; TRAVASSOS, A.E.R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, Campinas, 29 (3): 542-545, Jul.-Set. 2009.

ZAFALON, L.F.; VERÍSSIMO, C. J.; MAMIKUZA, E. M.; MARTINS, K.B.; ALMEIDA, L.M.; VESCHI, J.L.A. Estafilococos resistente à oxacilina isolados em casos de mastites subclínicas em ovinos. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 79, n.1 p.1-7, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/aib/v79n1/a01v79n1.pdf>. Acesso em 03/09/2017.

ZAFALON, L. F. et al. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte**, v. 59, n. 3, p. 577-585, 2007.