

## **DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DA *Lippia sidoides* Cham SOBRE *Staphylococcus aureus* DE ORIGEM BOVINA**

*Viviane Araújo da Silva*

Estudantes de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa – PB.  
E-mail: viviane.biologia@hotmail.com

*Andréia Fernanda Ramos de Freitas*

Estudantes de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa – PB.

*José Pinto Siqueira Júnior*

Professores do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba Paraíba – João Pessoa – PB.  
E-mail: jpsiq@uol.com.br

*Maria do Socorro Vieira Pereira*

Professores do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba Paraíba – João Pessoa – PB.

**RESUMO:** *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno nosocomial, sendo descrito como agente etiológico significativo em infecções hospitalares, adquiridas desde 1950; é também o mais freqüente microrganismo associado às mastites caprinas e bovinas. A medicina tem falhado no tratamento de doenças causadas por *Staphylococcus aureus* devido a grande resistência desses microrganismos a vários tipos de antibióticos, o que torna necessário pesquisar novos tratamentos, como o uso de produtos naturais. A *Lippia sidoides* Cham (Alecrim-pimenta) é uma planta bastante utilizada na estética e que possui um grande poder antimicrobiano. Com o objetivo de determinar a atividade antimicrobiana da *L. sidoides* Cham sobre amostras de *Staphylococcus aureus* bovina foi realizada a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) do extrato do Alecrim-pimenta sobre vinte linhagens bacterianas de animais pelo método de difusão em meio sólido. Os resultados demonstraram que todas as amostras ensaiadas são sensíveis ao extrato até a diluição de 1:8. Este estudo demonstra a atividade antimicrobiana da *Lippia sidoides* Cham o que torna possível o uso de tal planta para tratamento de doenças indicando assim a importância de se pesquisar meios alternativo viáveis para o tratamento de animais infectados.

**PALAVRAS CHAVES:** Alecrim-pimenta; *Lippia sidoides* Cham; Mastite bovina.

## **DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY *in vitro* OF *Lippia sidoides* Cham ON *Staphylococcus aureus* FROM ORIGIN BOVINE**

**ABSTRACT:** *Staphylococcus aureus* is a important nosocomial pathogen, described as significant etiological agent in nosocomial infection, acquired since 1950; is also the more frequent microorganism associate to caprine and bovine mastitis. The medicine have failed in the treatment of illness causing by *Staphylococcus aureus* because the large resistance that east microorganism obtained to many kind of antibiotics, that makes necessary to research new treatments, how de use of naturals products. The *Lippia sidoides* Cham (Alecrim-pimenta) is a plant used in asthetics, and have a antimicrobials power. With the purpose of determine the antimicrobial activity of *L.sidoides* Cham in *S.aureus* was realized the determination of Minimum Inhibitory Concentration of the *Lippia sidoides* Cham on 20 bacterial sample of animals to solid medium diffusion technique. The results showed that all sample tested were sensible to *Lippia sidoides* Cham until the diluition of 1:8. This study confirm the antimicrobials activity of *Lippia sidoides* Cham that makes possible the uses of this plant in treatment of illness appoint the importance of research manner alternatives viable to the treatment of animals infectious.

**KEY-WORDS:** Alecrim-pimenta; *Lippia sidoides* Cham; bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*, microorganism resistance, nosocomial infection.

## INTRODUÇÃO

A mastite é definida como uma reação inflamatória da glândula mamária, de evolução aguda ou crônica, caracterizada por alterações físico-químicas do leite, representadas por um aumento das células somáticas e por alterações patológicas na glândula mamária, podendo ser classificada como infecciosa, traumática ou tóxica, de acordo com a causa da inflamação (BARBALHO et al., 2001).

A mastite bovina é atualmente um dos principais problemas que comprometem o gado e que trás sérios problemas para a pecuária leiteira tendo em vista os graves prejuízos acarretados, quer seja pela diminuição da produção de leite quer seja pela perda dos rebanhos afetados. A elevada ocorrência dos casos de mastite bovina e as perdas econômicas decorrente principalmente da diminuição da produção láctea (COSTA et al., 2000) fazem com que esta enfermidade seja considerada a mais dispendiosa nas propriedades leiteiras (ANDRADE et al., 2000).

Embora possa ser causada por inúmeros microrganismos como bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de vários tipos de fungos, os *Staphylococcus aureus* são reconhecidos como agente etiológicos mais observados nos casos de mastite bovina em vários países do mundo (SÁ et al., 2004). Algumas características de virulência que contribuem para a persistência dos *S. aureus* no tecido mamário e o uso inadequado de antibióticos que propicia o aparecimento de cepas multirresistentes, são fatores que comprometem a eficiência do tratamento de mastite bovina causada por este microrganismo (BARBEIRO et al., 2002).

Espécies de *Staphylococcus* spp resistentes a antimicrobianos representam um problema cosmopolita, sendo o controle de sua disseminação um importante desafio. Nos últimos anos, a resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, comumente usados no tratamento de doenças infecciosas. Essa situação vem despertando o interesse dos cientistas na busca de novas drogas. Os vegetais são uma excelente fonte de busca de novas drogas antimicrobianas, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química (NOVAIS et al., 2003).

A *Lippia sidoides* Cham é uma planta do nordeste brasileiro da família Verbenaceae. Seu óleo essencial contém principalmente timol e carvacrol, que confere a esta planta forte ação anti-séptica contra fungos e bactérias (RADUNZ et al., 2001). Os produtos originados da folha da *Lippia sidoides* Cham são aplicados na medicina popular para o tratamento de acnes, doenças da pele e tratamento do couro cabeludo. Ainda são usadas para o tratamento de reinites alérgicas e vaginais, infecções orofaríngeas e bucais (SOUZA et al., 1991; MARTINS et al., 1994).

Devido ao conhecimento existente do poder que essas plantas têm no tratamento de doenças causadas por bactérias é que se torna de fundamental importância avaliar o seu poder antimicrobiano assim como determinar a menor concentração do extrato que inibirá completamente o crescimento dessas bactérias.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Linhagens Bacterianas

Foram utilizadas 20 amostras de *Staphylococcus aureus* de origem bovinas. As amostras animais foram isoladas de bovinos em fase de lactação na região de Patos no sertão paraibano.

### Material Botânico

A matéria prima (folhas) da *Lippia sidoides* Cham., no início da floração, foram coletadas no Horto de plantas medicinais do Laboratório de Tecnologia Farmacêuticas (LTF) da Universidade Federal da Paraíba e foram secas em estufa a 40°C.

### Obtenção Do Extrato

A obtenção do extrato, foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco.

Para a extração do extrato foi empregado o método de lixiviação em fluxo contínuo à temperatura ambiente. A extração ocorreu através da solução extrator de álcool metanol (a 80% v/v) renovado constantemente por um período de 24 horas, pelo qual se obteve um concentrado a 500 ml.

### Determinação da Atividade Antimicrobiana do Extrato da *Lippia sidoides* Cham

A atividade antimicrobiana em placas de Petri do extrato da *Lippia sidoides* Cham foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre as linhagens bacterianas. As linhagens foram cultivadas em caldo nutritivo (BHI – Brain Heart Infusion-DIFCO); incubadas a 37°C por um período de 18-24 horas. Foram realizadas diluições de 10<sup>-2</sup> do crescimento bacteriano em caldo nutritivo e estas foram inoculadas em meio de cultura (Agar Mueller Hinton – DIFCO) por inundação. Foram realizadas perfurações no meio de cultura de aproximadamente 6 mm de diâmetro. Nas perfurações foram colocados um volume de 50µl da solução do extrato diluída em água destilada, variando a diluição de 1:1 até 1:1024. As placas forma incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por um período de 24 horas. Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato

que inibiu completamente o crescimento bacteriano, observada pela presença do halo de inibição.

bovinas foi conduzida avaliando-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), a qual é analisada de acordo com diâmetro dos halos de inibição formados sobre as amostras. Através da tabela 1 podem-se observar os resultados obtidos nos experimentos. A figura 1 representa uma fotografia da ação antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham sobre a linhagem 212 U.

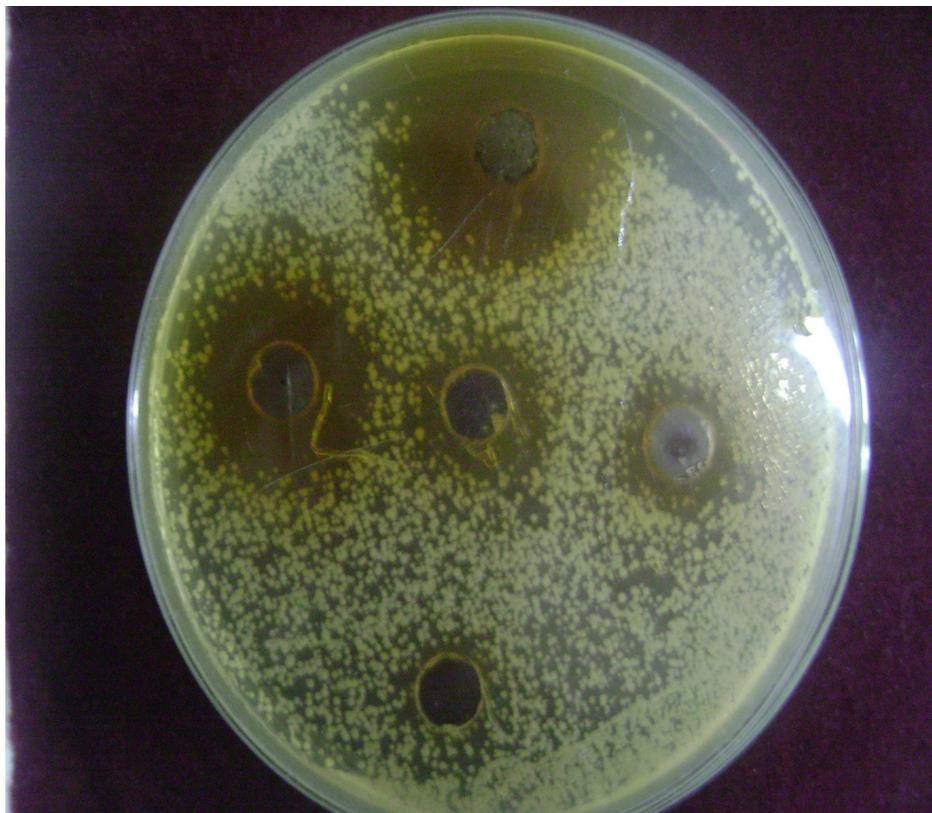
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham sobre as amostras da *S. aureus* de origem

**Tabela 1-** Concentração inibitória mínima do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre 20 amostras de *S.aureus* de origem bovina Onde: E.P- Extrato puro; U- Úbere; FN- Fossa nasal; L- Leite;

Linhagens Bacterianas	Diâmetro do halos de inibição (mm)									
	E.P	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:1024
250 U	21	00	00	00	00	00	00	00	00	00
324 U	16	15	00	00	00	00	00	00	00	00
314 FN	16	15	12	00	00	00	00	00	00	00
303 U	24	19	14	12	00	00	00	00	00	00
311 FN	23	20	00	00	00	00	00	00	00	00
146 L	26	17	13	00	00	00	00	00	00	00
313 FN	25	20	15	00	00	00	00	00	00	00
429 FN	25	23	14	11	00	00	00	00	00	00
319 U	17	14	00	00	00	00	00	00	00	00
319 L	25	19	15	00	00	00	00	00	00	00
322 FN	20	16	13	00	00	00	00	00	00	00
312 U	19	14	00	00	00	00	00	00	00	00
316 U	15	12	00	00	00	00	00	00	00	00
249 FN	19	13	00	00	00	00	00	00	00	00
212 U	25	18	14	13	00	00	00	00	00	00
122 U	23	14	13	12	00	00	00	00	00	00
129 FN	19	15	13	00	00	00	00	00	00	00
313 U	16	13	12	00	00	00	00	00	00	00
311 L	22	16	14	11	00	00	00	00	00	00
302 U	16	14	12	11	00	00	00	00	00	00

**Figura 1-** Figura 1. Concentração Inibitória Mínima do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina – 212 U.



Os resultados foram bastante positivos em relação à eficácia do extrato. Todas as linhagens ensaiadas foram sensíveis ao extrato do *Lippia sidoides* Cham como mostrado na tabela. Observaram-se halos de inibição variando de 26 a 11 mm de diâmetros nas linhagens testadas; sendo considerado ativo o extrato que mostrou halos de inibição superior a 12 mm de diâmetro. A inibição do crescimento mostrou-se homogênea de acordo com o grau de concentração do extrato da planta em estudo.

Das 20 amostras de *S. aureus* ensaiadas, 6 (30%) apresentaram halos de inibição até a diluição de 1:8; 7 (35%) apresentaram diluição até 1:4; 6 (30%) apresentaram halos de inibição até a diluição de 1:2 e apenas 1 amostra (5%) apresentou halo de inibição apenas com o extrato puro.

O extrato da *Lippia sidoides* Cham apresenta um excelente potencial antimicrobiano *in vitro* sobre os isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* de origem bovina, o que sugere um meio alternativo e

economicamente viável na terapêutica veterinária para o controle das infecções causadas por estes microrganismos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, A.C.L. *Efeitos Antimicrobianos dos Extratos da Matricaria recutita Linn. E Lippia sidoides Cham. Sobre Microrganismos do Biofilme Dental*. João Pessoa, 120p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, 2007.

ANDRADE, M.A.; DIAS FILHO, F.C.; MESQUISTA, A.J.; ROCHA, P.T. Sensibilidade “in vitro” de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciência Animal Brasileira*, v.1, n.1, p.53-57, 2000.

- BARBALHO, T. C. F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.2, n.2, p.31-36. 2001.
- BARBERIO, A.; GIETL, H.; DALVIT, P. “In vitro” sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. *Napgama*, v.5, n.1, p.10, 2002.
- COELHO, S.M.O. et al. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécie humanas e animais. **Ciência Rural**, v.37, n.1, p.195-200, 2007.
- COSTA, E. O.; R AIA, M.R. ; WATANABE, E.T.; G ARINO, F.; COELHO,V. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite de quartos sadios. *Napgama*, v.3, n.4, 14-17, 2000.
- FILHO, A.N; FERREIRA, L.M; AMARAL, L.A; ROSSI JUNIOR, O.D; OLIVEIRA, R.P.. SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DOS *Staphylococcus aureus* ISOLADOS NO LEITE DE VACAS COM MASTITE. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.74, n.1, p.1-4, jan./mar., 2007
- MARTINS, E.R; CASTRO, D.M; CASTELLANI, D.C.. 1994. *Plantas medicinais*. Viçosa: Ed. UFPR. *Sousa MP, Matos MEO, Matos FJA*. Constituintes ativos de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza: UFC. 1991.
- NOVAIS, T.S. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v.14, supl., p.08-11, 2003.
- OLIVEIRA, F. P. et al., Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v.16. n.4, p.510-516, Out/Dez. 2006.
- RADUNZ, L.L. et al. Secagem em camada delgada de folhas de *Lippia sidoides* Cham. 1, In *XXX Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola – CONBEA*, Paraná. Anais. Paraná. Jul./ ago.2001.
- REMONATTO, G.; CARDOSO, C. M.; MARQUES, C. G.; SILVA, A. E. B.; GELATTI, L. C.; LEITE, C. F. M. CA.MRSA: Um patógeno emergente. *News Lab*. 80 ed, 2007.
- SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.S.R.S.; E LIAS, A.O.; VICTORIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínica: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, v.41, n.5, p.321-326, 2004.
- SILVA, M.I.G, GONDIM, A.P.S, NUNES, I.F.S, SOUSA, F.C.F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Rev Bras Farmacogn* 16: 455-462, 2006.
- ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D.. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.3, p.577-585, 2007