

## INIBIÇÃO *IN VITRO* DE *Salmonella* spp. ISOLADA DE BEZERROS DO SERTÃO ALAGOANO COM EXTRATOS ETANÓLICOS DE PLANTAS DA MATA ATLÂNTICA

Artur Bibiano de Vasconcelos<sup>1</sup>  
Vitória de Andrade<sup>2</sup>  
Danilo Alves de França<sup>3</sup>  
Alex Alves Dantas<sup>2</sup>  
Thiago Barros Correia da Silva<sup>2</sup>  
Karla Patrícia Chaves da Silva<sup>2</sup>

### RESUMO

O objetivo do estudo foi verificar a inibição *in vitro* de *Salmonella* spp. frente a diferentes extratos de plantas com indicações medicinais em diferentes diluições de etanol. Para isso, foram obtidas 12 partes de plantas, entre folhas e caules, que fazem parte da terapêutica popular de toxinfecções gastrintestinais de Alagoas. Essas plantas foram obtidas através de coletas feitas em áreas de florestas de alguns municípios do Estado e foram submetidas à procedimentos de secagem, trituração, maceração e prensagem, permitindo diferentes concentrações de extrato para os experimentos. Amostras de *Salmonella* spp. isoladas de bezerros de propriedades rurais do sertão alagoano foram utilizadas para verificar o potencial antimicrobiano dos extratos etanólicos. Para isso, foi realizado o teste de Disco Difusão em Placas com três estirpes de *Salmonella* spp., sendo substituídos os discos com antibióticos por discos de extratos etanólicos nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000mg/L. Como resultado, a folha de *Varronia multispicata*, popularmente conhecida como Cavarucaá, apresentou resultado positivo na inibição dos três isolados de *Salmonella* spp. nas concentrações de 500 e 1000mg/L. Os demais extratos não revelaram resultados de sensibilidade *in vitro* com a bactéria, em nenhuma das concentrações. Mais estudos com *Varronia multispicata* precisam ser desenvolvidos, com diferentes métodos de obtenção dos fitoconstituintes e com outras estirpes de *Salmonella* spp. da região.

**Palavras-chave:** fitoconstituintes, salmonelose, saúde pública, resistência antimicrobiana, plantas medicinais.

### *IN VITRO* INHIBITION OF *Salmonella* spp. ISOLATED FROM CALVES OF THE SERTÃO OF ALAGOAS WITH ETHANOLIC EXTRACTS OF PLANTS FROM THE MATA ATLANTICA

### ABSTRACT

The objective of the study was to verify the *in vitro* inhibition of *Salmonella* spp. against different extracts of plants with medicinal indications in different ethanol dilutions. For this, 12 plant parts were obtained, including leaves and stems, which are part of the popular therapeutics for gastrointestinal toxinfecções in Alagoas. These plants were obtained through collections made in forest areas in some municipalities of the state and were submitted to procedures of drying, crushing, maceration and pressing, allowing different concentrations of extract for the experiments. Samples of *Salmonella* spp. isolated from calves from rural

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista (UNESP). artur.bibiano@unesp.br

<sup>2</sup> Universidade Federal de Alagoas. victory\_victory2010@hotmail.com

<sup>3</sup> Universidade Estadual Paulista (UNESP). \*Correspondência: danilo.franca@unesp.br

properties in the sertão of Alagoas were used to verify the antimicrobial potential of the ethanolic extracts. For this purpose, the Disc Diffusion Plates test was performed with three strains of *Salmonella* spp., and the discs with antibiotics were replaced by discs of ethanolic extracts at concentrations of 10, 100, 500 and 1000mg/L. As a result, the leaf of *Varronia multispicata*, popularly known as Cavarucaá, showed positive results in inhibiting the three isolates of *Salmonella* spp. at concentrations of 500 and 1000mg/L. The other extracts did not show *in vitro* sensitivity results with the bacteria in any of the concentrations. Further studies with *Varronia multispicata* need to be developed, with different methods of obtaining phytoconstituents and with other strains of *Salmonella* spp. from the region.

**Keywords:** phytoconstituents, salmonellosis, public health, antimicrobial resistance, medicinal plants.

## INHIBIÇÃO *IN VITRO* DE *Salmonella* spp. AISLADO DE TERNEROS DEL SERTÃO DE ALAGOAS CON EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PLANTAS DEL MATA ATLÂNTICA

### RESUMEN

El objetivo del estudio fue comprobar la inhibición *in vitro* de *Salmonella* spp. frente a diferentes extractos de plantas con indicaciones medicinales en distintas diluciones de etanol. Para ello, se obtuvieron 12 partes de plantas, entre hojas y tallos, que forman parte de la terapéutica popular de las toxinas gastrointestinales en Alagoas. Estas plantas fueron obtenidas a través de colectas realizadas en áreas forestales de algunos municipios del Estado y fueron sometidas a procedimientos de secado, trituración, maceración y prensado, permitiendo diferentes concentraciones de extracto para los experimentos. Para verificar el potencial antimicrobiano de los extractos etanólicos se utilizaron muestras de *Salmonella* spp. aisladas de terneros de granjas del sertão del estado de Alagoas. Para ello, se realizó la prueba de difusión en disco con tres cepas de *Salmonella* spp. y se sustituyeron los discos con antibióticos por discos de extractos etanólicos a concentraciones de 10, 100, 500 y 1000mg/L. Como resultado, la hoja de *Varronia multispicata*, conocida popularmente como Cavarucaá, mostró resultados positivos en la inhibición de los tres aislados de *Salmonella* spp. a concentraciones de 500 y 1000mg/L. Los otros extractos no revelaron resultados de sensibilidad *in vitro* con la bacteria, en ninguna de las concentraciones. Es necesario desarrollar más estudios con *Varronia multispicata*, con diferentes métodos de obtención de fitoconstituyentes y con otras cepas de *Salmonella* spp. de la región.

**Palabras-clave:** fitoconstituyentes, salmonelosis, salud pública, resistencia antimicrobiana, plantas medicinales.

### INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor animal com competitivos rebanhos bovinos. Estes rebanhos superam a marca de 222 milhões de animais e posiciona-se como um dos maiores produtores e exportadores de carne do mundo (1). Dados da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, revela uma receita de mais de US\$ 7 bilhões para o país no ano de 2019 (2).

A salmonelose caracteriza-se por ser uma enfermidade infecciosa causada por bactérias da família das Enterobacteriaceae, pertencentes ao gênero *Salmonella*. Este agente infeccioso tem como principal órgão alvo o intestino, onde costuma ocorrer alterações nas vilosidades

que levam a quadros diarreicos, dores abdominais, entre outros sintomas (3). No Brasil, a salmonelose ganha destaque nos rebanhos bovinos e nas aves domésticas, com grande potencial de afetar seres humanos que consomem os produtos de origem animal (3,4).

Uma preocupação atual é o impacto que o uso indevido do tratamento antimicrobiano tem desencadeado nos rebanhos, criando cepas bacterianas cada vez mais resistentes a medicamentos de uso rotineiro. Em Alagoas, recentemente, foi identificado um surto de Salmonelose em bezerros pertencentes à mesorregião do Estado, no qual o agente mostrou-se resistente aos principais antibióticos utilizados para tratamento dos animais na região, como o cefotaxima, cepalexina, cefoxitina, polimixina and tetraciclina (5).

O uso indiscriminado dos antibióticos no tratamento dos animais pode promover o surgimento de bactérias multirresistentes, ressaltando a gravidade do tema e como a manutenção dessas práticas podem ser deletérias (5). O surgimento de superbactérias consiste em uma questão global e o enfrentamento desses super agentes deve ocorrer, sempre sob a perspectiva de one health, associando a ocorrência nos animais como um risco para a saúde humana (6,7).

Nos últimos anos, pesquisas experimentais utilizando plantas e extratos de plantas para o tratamento de enfermidades infecciosas têm sido aplicadas. Um exemplo disto é o estudo de Naghadi et al. (8), que apresentou uma revisão literária dos principais fitoterápicos – *Teucrium polium*, raízes de berberis, alho, *Scrophularia deserti*, *Alhagi* and *Eucalyptus* – utilizados no tratamento complementar da brucelose canina e seu possível uso na terapêutica humana. Sperotto et al. (9) estudou a eficiência de *Achyrocline satureoides* no tratamento da mastite bovina e Avancini e Wiest (10) estudaram a eficiência de 36 plantas da mata atlântica brasileira na redução de infecções de pele. O desenvolvimento e o uso de fitoterápicos na veterinária e no âmbito da saúde em geral chama atenção, em detrimento da descoberta de novas substâncias no combate à resistência bacteriana, aliadas ao baixo custo e fácil disponibilidade, agregando um novo nicho terapêutico para o tratamento de enfermidades (11,12).

O objetivo deste trabalho foi verificar, a partir de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de bezerros de propriedades familiares de Alagoas, o perfil de sensibilidade *in vitro* frente a fitoconstituintes presentes nos extratos oriundos de fragmentos de plantas com potencial medicinal em diferentes diluições em etanol.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Questões Éticas

Este estudo foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Alagoas (CEUA-UFAL), número de protocolo 65/2017.

### Isolados de *Salmonella*

As cepas de *Salmonella* spp. utilizadas foram obtidas em coletas realizadas pelo grupo de pesquisa em 2018 de bezerros com 10 a 90 dias de idade que apresentavam quadro de diarreia. As amostras foram semeadas, cultivadas e testadas fenotipicamente e genotipicamente para a confirmação do diagnóstico de *Salmonella* spp. As cepas foram armazenadas e mantidas no acervo junto ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Alagoas.

### Obtenção do Material Vegetal

As plantas selecionadas para o estudo foram obtidas da Mata Atlântica, de acordo com a disponibilidade e do interesse fitoterápico existente. A coleta das plantas consistiu em retirar a parte de interesse (Tabela 1), buscando reunir um material íntegro e com o mínimo possível de contaminantes. Elas foram mantidas secas à sombra e em seguida peneiradas em tecido de musselina. Parte dessas plantas eram utilizadas na medicina popular da região, considerando que 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria foram recomendados visando este atributo (13). Na Tabela 1, temos os fragmentos das plantas selecionados para a produção dos extratos e seus respectivos nomes científicos e populares.

Tabela 1. Fragmento de plantas coletadas com suas respectivas nomenclaturas.

Fragmento	Nome científico	Nome popular
Casca de Caule	<i>Tabebuia roseoalba</i>	Ipê Branco
Caule	<i>Xylopia laevigata</i>	Pindaíba
Folha	<i>Varronia multispicata</i>	Cavarucaá
Folha	<i>Xylopia frutescens</i> Aubl	Imbira Vermelha
Casca de Caule	<i>Byrsonima crisper A. juss</i>	Murici da Mata
Folha	<i>Diospyros gaultheriifolia</i>	Árvores de Caqui
Folha	<i>Vismia guianenses</i> Aubl	Pau de Lacre
Folha	<i>Capscum</i>	Pimentão
Caule	<i>Senna phlebadenia</i>	Sena
Caule	<i>Tournefortia bicolor</i>	Niguiba Tinga
Folha	<i>Cocoloba parimensis</i>	Caa Uassu Rana

Fonte: Botanical Research And Herbarium Management System.

Os nomes populares foram encontrados no programa Brahms (Botanical Research And Herbarium Management System) no banco de dados ASE. As plantas utilizadas eram provenientes de áreas de floresta localizadas nos municípios de Murici, Viçosa, União dos Palmares e Jundiá. As amostras foram acondicionadas como exsicatas no Laboratório de Química do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

### Extração e Inibição

Para obtenção dos extratos, as partes das plantas foram submetidas a um processo de extração alcoólica. Essas plantas passaram por secagem durante 1 hora em temperatura ambiente em béqueres acondicionados em local fresco e arejado. Foi pesado 1 kg do material, que após secagem, foi triturado e macerado em etanol a 90%. Após concentração das soluções em evaporador rotativo, obteve-se o extrato bruto em etanol (63,4 g). O material foi então coado e prensado, com o objetivo de recuperar o solvente utilizado na extração e os ativos extraídos por ele. A suspensão foi centrifugada a 4 °C em uma velocidade de 3000 rpm durante 15 minutos, e o sobrenadante obtido foi filtrado com o uso de um papel de filtro Whatman nº 1. O material extraído foi alíquotado em frascos com tampa de rosca a -20 °C e mantidos nesta temperatura até posterior utilização no teste de susceptibilidade (14).

A susceptibilidade *in vitro* das estirpes de *Salmonella* spp. frente aos fitoconstituintes foi avaliada pela técnica de Disco Difusão em Placas contendo meio Ágar Mueller Hinton de acordo com o CLSI (15). Caldos enriquecidos de *Salmonella* spp. foram utilizados na semeadura das placas na concentração de 1.000.000 de unidades formadoras de colônias / ml, e após isso, os extratos foram adicionados na posição dos discos de ação antimicrobiana. As concentrações de extrato utilizadas nos testes foram de 10mg/L, 100 mg/L, 500mg/L e

1000mg/L. As placas foram incubadas a 37°C e analisadas após 24 horas. Os resultados foram interpretados de acordo com o CLSI (15).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De todos os extratos utilizados, apenas foi observada sensibilidade das cepas de *Salmonella* frente às concentrações do extrato de *Varronia multispicata* a partir de 500 e 1000 mg/L, demonstrando um resultado efetivo na inibição microbiana.

Tabela 2. Antibiograma das estirpes de *Salmonella* spp. diante do extrato etanólico da folha de *Varronia multispicata* em diferentes concentrações.

Amostra	Diluições (mg/L)			
	10	100	500	1000
1	R	R	S	S
2	R	R	S	S
3	R	R	S	S

R= Resistente; S= Sensível

A utilização das plantas medicinais tem assumido um papel de grande importância no tratamento de doenças nos últimos anos. Maciel et al. (16) promoveu a inibição de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos através da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Achyrocline satureioides*, ressaltando a importância do estudo de plantas regionais e que fazem parte da cultura popular

A ausência da ação antimicrobiana no extrato da planta *Varronia multispicata* na literatura confirma a grandeza deste trabalho, que trouxe um novo precursor fitoterápico eficaz para a eliminação bacteriana *in vitro* de cepas de *Salmonella* spp. Acredita-se na existência de Triterpenos atuando nas atividades biológicas, tais como as que ocorrem contra *Trypanosoma cruzi*, *Giardia intestinalis* e na inibição da proteína tubulina, que pode ser o modo de ação que justifica a atividade citotóxica e antitumoral (17).

Considerando os aspectos climáticos da mesorregião de Alagoas, que é uma região que enfrenta períodos de seca extrema, redução do aporte hídrico e consequente escassez de alimentos, o comércio de animais é eminente, promovendo um trânsito sanitário pertinente que quando praticado especialmente por vias ilegais é tido como um potencial risco à disseminação de doenças e patógenos, e somente a fiscalização sanitária satisfatória dos órgãos responsáveis e a credibilidade dos serviços veterinários são capazes de minimizar a problemática (18).

Os resultados confirmam a possibilidade da *Varronia multispicata* em futuros estudos aplicados que possam elevar sua importância para além da medicina popular, e os resultados negativos de inibição podem se justificar por alguma ação complementar do organismo vivo ao receber o tratamento a partir dessas plantas ou de fato a ineficiência da terapêutica. Os saberes populares sempre devem ser considerados pela pesquisa científica, principalmente para o combate de microrganismos multirresistentes. É preciso que outros estudos, com diferentes métodos de obtenção dos fitoconstituintes e com outras estirpes de *Salmonella* spp. da região, sejam desenvolvidos a fim de verificar o real potencial da *Varronia multispicata* como um agente antimicrobiano natural.

## CONCLUSÃO

Ocorreu a eficácia do extrato etanólico da *Varronia multispicata* na inativação das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de bezerros nas diluições de 500 a 1000 mg/L.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Diagnóstico situacional do PNCEBT: Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Brasília: MAPA, 2020.
2. Florindo TJ, Medeiros GIB, Costa JS, Ruviano CF. Competitividade dos principais países exportadores de carne bovina no período de 2002 a 2013. *Rev Econ Agroneg.* 2015;12:1-3.
3. Assis-Brasil ND, Marcolongo-Pereira C, Hinnah FL, Ladeira SRL, Sallis ESV, Grecco FB, et al. Enfermidades diagnosticadas em bezerros na região sul do RS. *Pesqui Vet Bras.* 2013;33:423-30.
4. Strockbine NA, Bopp CA, Fields PI. *Escherichia, Shigella, and Salmonella.* In: Jorgensen JH, Pfaller MA, editors. *Manual of clinical microbiology.* 11a ed. Washington: ASM Press; 2015. p. 685-713.
5. Vasconcelos AB, Andrade V, Moraes ACI, Ramos EMOA, Silva ACA, França DA, et al. Ocorrência de *Salmonella* spp. em bezerros e perfil de resistência antimicrobiana na Mesorregião do Sertão de Alagoas, Brasil. *Acta Vet Bras.* 2021;15:36-40.
6. Mota RA, Silva KPC, Freitas MFL, Porto WJN, Silva LBG. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição à multirresistência bacteriana. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2005;42:465-70.
7. Cades M, Silva ZD, Souza HL, Silva JD, Fink AAB, Muniz IM. Perfil de resistência antimicrobiana de mastite bovina em propriedade leiteira no município de Monte Negro/RO. *Braz J Sci Amazon.* 2017;6:15-20.
8. Naghadi N, Assanzad-Azar H, Delpisheh A. The most important medicinal plants for treatment of brucellosis. *J Prev Epidemiol.* 2016;1:543-556.
9. Sperotto VR, Murari AL, Silva DAR. Brasil. Atividade do decocto de *Achyrocline satureioides* D.C. (Lam.) - Asteraceae (“macela”) sobre bactérias padrões e isoladas em mastite bovina. *Acta Sci Vet.* 2012;40:1052.
10. Avancini CAM, Wiest JM. Etnomedicina veterinária, etnosotaxia e Etnoterapêutica de doenças de pele como referência para seleção e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de plantas nativas do Sul do Brasil. *Rev Bras Plantas Med.* 2008;10:70-8.
11. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18:301-7.
12. Baracho NC, Oliveira HC, Magalhães IN, Gil BL, Irulegui RSC. Extrato hidroalcoólico de própolis e cicatrização de feridas no diabetes tipo I: estudo experimental. *Rev Cient Univ.* 2019;2:2.

13. Corrêa Júnior CC, Ming LC, Scheffer MC. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. 2a. ed. Jaboticabal: FUNEP; 1994.
14. Matos FJA, Lorenzi H. Plantas medicinais no Brasil, nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA; 2002.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Pennsylvania: CLSI, 2005. (15<sup>th</sup> Informational Supplement. Document M100-S15).
16. Maciel MJ, Silva MAS, Ethur E, Avancin CAM. Phytochemical indicators and antibacterial activity of the crude hydroalcoholic extract of *Achyrocline satureioides* ("macela") against antibiotic-resistant *Salmonella* spp. isolated from animal products (swine and poultry). Rev Bras Hig Sanid Anim. 2017;11:273-87.
17. Silva FC, Duarte LP, Vieira Filho SA. Celastráceas: fontes de triterpenos pentacíclicos com potencial atividade biológica. Rev Virtual Quim. 2014;6:1205-20.
18. Sá MEP, Melo CB. Disseminação de enfermidades animais por meio do comércio internacional e o papel dos serviços veterinários de fronteira no Brasil. Braz J Vet Med. 2016;38:7-12.

**Recebido em: 14/03/2022**

**Aceito em: 27/06/2022**