

ACÇÃO ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS ETANÓLICO E METANÓLICO DE *Tagetes minuta* L. FRENTE A BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA.

HANIEL MONTEIRO CARVALHO¹; MARCIELE COSTA COLVAR²; SARA DA SILVA SANTIAGO²; LAURA CAROLINA CRISTOFOLI MULLER²; THAIS MARTINS ENGELMANN²; LUIZ FILIPE DAMÉ SCHUCH³

¹Universidade Federal de Pelotas – hani.carvalho@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – lfdschuch@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Uma das principais enfermidades que acometem vacas leiteiras é a mastite, causada por múltiplos fatores e etiologias e responsável por prejuízos econômicos ao produtor (FOGSGAARD et al., 2015). Seu tratamento e prevenção são feitos geralmente com antimicrobianos e desinfetantes convencionais, que pelo seu uso indiscriminado acabam promovendo resistência microbiana e deixando resíduos ambientais (ADEHAN et al., 2016; ANDREOTTI et al., 2011), indicando a necessidade de desenvolver alternativas de controle e prevenção da doença.

O uso de fitoterápicos é viável econômica e ambientalmente. Além de deixar menor resíduo ambiental, as plantas possuem uma matriz complexa de compostos que dificultam o desenvolvimento da resistência microbiana (DILBATO et al., 2019) e também contribuem no desenvolvimento de produtos votados à sistemas de produção orgânico e/ou agroecológico (ALTIERI, 2004; SCHUCH et al., 2008). Alguns estudos relacionados ao uso de fitoterápicos como antimicrobianos e desinfetantes trazem resultados interessantes quanto ao uso de extratos e outros preparos de *Tagetes minuta* L. (BILHALVA, 2015; MOREIRA, 2021).

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano dos extratos metanólico e etanólico de *T. minuta* frente a cepas padrão de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2. METODOLOGIA

Os extratos de *T. minuta* foram produzidos a 10% (m/v) (SCHUCH et al., 2008; MOREIRA 2022) a partir de plantas secas e congeladas, cultivadas para esse fim. Ainda, passaram pelo processo de rotaevaporação e liofilização conforme descrito por MOREIRA (2022), e armazenados em frascos estéreis a -20°C, até sua ressuspensão a 2% (m/v) em água e Tween 80 (1%), para uso nos testes.

A avaliação antimicrobiana foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016) com adaptações, frente à quatro densidades populacionais distintas (10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 UFC/mL), conforme sugerido por MOREIRA (2022), de cepas padrão de *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 15442. Os respectivos inóculos foram preparados em solução salina (0,85%) (MOREIRA 2022) seguidos de diluições de base 10 até atingir as densidades. Para cada placa, foi feito controle positivo e negativo de crescimento.

As microplacas foram incubadas em estufa a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24h. Após, foram retiradas e foi feito o plaqueamento de 3µL de cada um dos 96 poços em placas de Petri contendo ágar TSA (Agar Tryptic Soy), para confirmação da leitura do teste com revelador, seguida de incubação em mesma temperatura e tempo.

Após a retirada dessa alíquota, os orifícios da microplaca foram preenchidos com 25µL do corante revelador Resazurina (0,02%) (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido, Merk®, EUA), e incubados novamente em mesma temperatura por 30 minutos, a fim de verificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), representada pela conversão da cor azul em rosa, feita pelas bactérias que permaneceram metabolicamente viáveis após o contato com os extratos (PALOMINO, 2002). Os testes foram realizados em duplicata e com três repetições por cepa e por extrato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de biocompostos fitoterápicos vem sendo realizada com diferentes técnicas, que podem variar de acordo com o tipo de substância e efeito desejado (ROSA et al., 2017). Os extratos secos produzidos, possibilitam o armazenamento em menores volumes e melhor conservação de suas propriedades (OLIVEIRA et al., 2006). Em vista disso, as extrações metanólica e etanólica se mostram interessantes para produção de soluções com potencial antimicrobiano.

O revelador resazurina se mostrou eficiente na leitura dos testes, indicando a concentração do extrato que apresentou efeito inibitório, confirmada pelo plaqueamento do conteúdo dos orifícios demonstrando crescimento ou inibição (Figura 1).

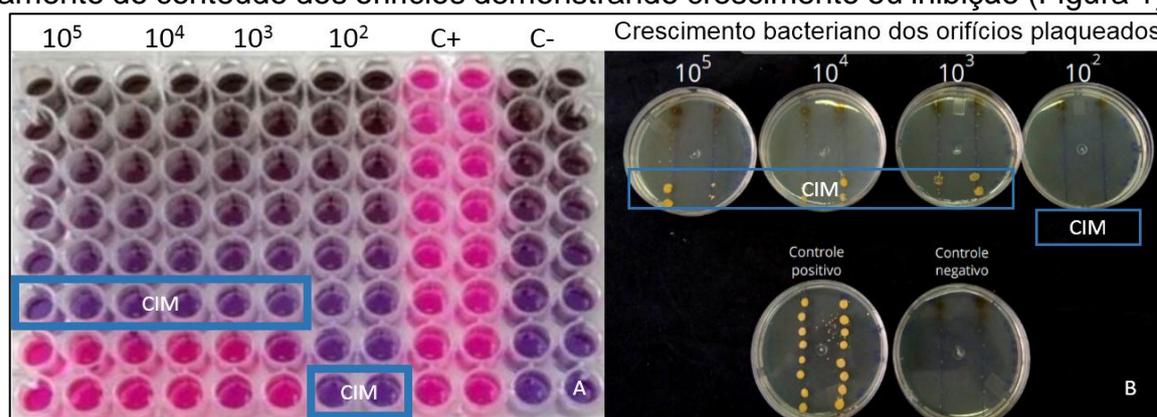


Figura 1. A - Microplaca de teste extrato com etanólico frente a *S. aureus* com revelador resazurina evidenciando a linha da CIM para as diferentes densidades populacionais; B - Confirmação de CIM com plaqueamento dos conteúdos dos orifícios e seus respectivos crescimentos conforme revelado pelo corante.

Os valores das concentrações dos extratos responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano estão demonstrados na Tabela 1, evidenciando que frente a *S. aureus* o extrato etanólico teve uma redução proporcional na concentração necessária para inibição dos inóculos conforme suas densidades foram diminuindo. MOREIRA (2022), com extrato etanólico e SOUZA et al. (2000), com a planta em decocto encontraram essa mesma tendência.

Tabela 1- Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Extratos Etanólico e Metanólico de *T. minuta* frente as cepas testadas e suas respectivas densidades.

Inóculos UFC/mL		10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
<i>S. aureus</i>	CIM (mg/mL) Extrato Etanólico	0,356	0,281	0,234	0,0782
	CIM (mg/mL) Extrato Metanólico	0,459	0,272	0,385	0,146
<i>P. aeruginosa</i>	CIM (mg/mL) Extrato Etanólico	0,374	0,374	0,381	0,450
	CIM (mg/mL) Extrato Metanólico	0,899	0,557	0,385	0,214

*Os valores de CIM estão expressos em médias, calculadas a partir das três repetições realizadas.

Já para *P. aeruginosa*, essa redução não foi observada com extrato etanólico, mas a mesma tendência de redução se deu com extrato metanólico, apesar das concentrações inibitórias não terem sido tão baixas quanto como foram frente a *S. aureus*. MOREIRA, (2021) teve bons resultados em testes desinfetantes frente a bactéria *P. aeruginosa*, utilizando a mesma planta o que nos remete ao seu bom potencial. No entanto, a apresentação da solução em teste era em preparo distinto o que provavelmente diferiu de nosso resultado. Testes utilizando mesma planta e extratos em concentrações menores foram realizados por OLANDA et al. (2019), e demonstraram, assim como nosso trabalho que o extrato em questão não foi efetivo pra *Pseudomonas*.

Outros trabalhos encontraram valores de CIM superiores e mesmo inferiores frente a estas bactérias, o que demonstra provável variação na composição das soluções testadas, seja pelo preparo, conservação ou mesmo da composição da própria planta, a qual há relatos demonstrando que métodos, períodos de colheita e até mesmo ambiente, podem interferir na distribuição de seus compostos (BILHALVA, 2015; SPERANDIO, 2016).

4. CONCLUSÕES

Nas condições do presente trabalho, foi possível observar que as diferentes concentrações dos extratos demonstraram eficácia frente as diferentes densidades de inóculo bacteriano, com tendência a diminuir a CIM proporcionalmente à redução da concentração bacteriana, com exceção do extrato metanólico sobre a *P. aeruginosa*, onde essa tendência não foi observada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEHAN, S. B. et al. Acaricide resistance of Rhipicephalus microplus ticks in Benin. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 14, p. 1199-1208, 2016.

ALTIERI, M. Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável. 4.ed. **Porto Alegre: Editora da UFRGS**, 2004.

ANDREOTTI, R. et al. Acaricide resistance of Rhipicephalus (Boophilus) microplus in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 20, n. 2, p. 127-133, 2011.

BILHALVA, K. **Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos obtidos com diferentes solventes de aroeira (Schinus terebinthifolius Raddi) e chinchilho (Tagetes minuta Linnaeus)**. 2015. 159 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, PPG em Ciências Veterinárias, UFRGS.

DILBATO, T. et al. Reviews on challenges, opportunities and future prospects of antimicrobial activities of medicinal plants: alternative solutions to combat antimicrobial resistance. **Int. J. Herb. Med.** v. 7, n. 4, p. 10-18, 2019.

FOGSGAARD, K. K. et al. Behavioral changes in freestall-housed dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**. v.98, p.1-9, 2015.

MOREIRA, D. A. **Atividade desinfetante in vitro de nanocápsulas do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. para o manejo da ordenha.** Florianópolis. UFSC, 2021. 60p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas), Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina.

MOREIRA, D. A. **Avaliação in vitro da ação antimicrobiana, desinfetante e acaricida dos extratos metanólico e etanólico de *Tagetes minuta* L. frente a agentes de interesse na pecuária.** 2022. Relatório (Residência em Área Profissional da Saúde: Medicina Veterinária-Saúde Coletiva) - Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Federal de Pelotas.

OLANDA, G. B. et al. Extracts of *Tagetes minuta* L. front of bacteria regarding bovine mastitis. **Comunicata Scientiae.** v. 10, n. 1, p. 1-4, 2019.

OLIVEIRA, W.P. et al. Manufacture of standardized dried extracts from medicinal Brazilian plants. **Dry. Technol.**, v.24, n.4, p.523-33, 2006.

PALOMINO, J. C. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

ROSA, N. F. et al. Atividade *in vitro* de óleo essencial de *Tagetes minuta* em carapatos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: MOSTRA NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA INTERDISCIPLINAR, 10, 2017. Camburiú. **III IFCultura.** SC: Instituto Federal Catarinense, 2017. p.1-5.

SCHUCH, L. F. D. et al. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira.** v.9, n.1, p.161-169, 2008.

SOUZA, C. A. S. et al. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. - Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 37, n. 6, p. 1-14, dez. 2000.

SPERANDIO, J. et al. Atividade antimicrobiana e citotoxicidade in vitro do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. visando à aplicação no controle da mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.** v. 71, n. 4, p. 1251-1259, 2019.

The Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** CLSI supplement M100S. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.