

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM EXTRATO ETANÓLICO DE *Vachellia caven*

VÍTOR PEREIRA KLEIN¹; RAFAELY PICCIONI ROSADO²; MILENA MATTES CERVEIRA³; LUANE PINHEIRO GARCIA⁴; MATHEUS PEREIRA DE ALBUQUERQUE⁵; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER⁶

¹Universidade federal de Pelotas – vitorpereiraklein17@gmail.com

² Universidade federal de Pelotas – rafaelypiccioni@hotmail.com

³ Universidade federal de Pelotas – cerveiramm@gmail.com

⁴ Universidade federal de Pelotas – luanegarcia25@hotmail.com

⁵ Universidade federal de Pelotas – matheusalbuquerque813@gmail.com

⁶ Universidade federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O aumento constante da resistência de agentes infecciosos a antimicrobianos constitui um dos principais desafios da medicina moderna e está diretamente relacionado ao aumento da mortalidade, morbidade, prolongamento no tempo de internação e elevação nos custos do tratamento das infecções (FRIERI, KUMAR e BOUTIN, 2017). Outro fator agravante em infecções que aumenta a resistência dos microrganismos é a formação de biofilmes. Estes consistem em comunidades de microrganismos envoltas em uma matriz autógena de substâncias poliméricas extracelulares que se aderem uma superfície dificultando o contato e ação de antimicrobianos (ALONSO *et al.*, 2019).

Neste contexto, plantas medicinais representam uma importante ferramenta no combate a estas infecções graças a grande variabilidade de mecanismos de ação de compostos delas extraídos, podendo reduzir o desenvolvimento de resistência quando associados à antibioticoterapia (KONGKHAM, PRABAKARAN e PUTTASWAMY, 2020). Por este motivo o presente estudo buscou explorar as possíveis atividades antimicrobiana e antibiofilme da *Vachellia caven*, uma espécie nativa dos pampas e pantanais sul-americanos que, apesar de pouco estudada quanto a suas propriedades bioativas, está muito atrelada a medicina popular dos países em que ocorre (CROVETTO, 1981; RONDINA, BANDONI e COUSSIO, 2008; TOURSARKISSIAN, 1980).

2. METODOLOGIA

A atividade antimicrobiana foi inicialmente avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) pelo método de microdiluição em caldo conforme o protocolo M7-A6 do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (WIKLER, 2006). Os microrganismos escolhidos incluem sete espécies catalogadas na American Type Culture Collection (ATCC): *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1705), *Staphylococcus aureus* (BAA 1026), *Staphylococcus saprophyticus* (BAA 750), *Enterobacter hormaechei* (ATCC 700323), *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC 14028); e dois isolados clínicos de *K. pneumoniae*, um portando o gene da *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) e outro o gene New Delhi metallo-B-lactamase-1 (NDM-1).

Em seguida, seguindo o método de Sandberg *et al.* (2008) com modificações, os valores de CIM, 2xCIM e 4xCIM foram testados quanto a sua capacidade de reversão dos biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* formados após 24h de

incubação em caldo Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com 2% de glicose a 37°C sob constante agitação. Os biofilmes foram lavados com solução salina antes e após as 24h de aplicação do tratamento para a remoção de células planctônicas e em seguida foram fixados com metanol (99,9%) por 30 min e corados com Cristal Violeta (0,1%) por 20min. Os poços foram lavados novamente com salina e o biofilme foi eluído em etanol (99,9%) por 1h. Por fim o conteúdo foi transferido para uma nova placa de 96 poços onde foi realizada a leitura da absorbância em 561 nm usando um leitor automático de microplacas Polaris®. Os testes foram feitos em triplicata, incluindo controles de crescimento não tratados (CP) e controles de esterilidade (CN). A análise estatística foi feita em GraphPad Prism 8.0 (San Diego, CA, USA) usando ANOVA de uma via, com teste *post-hoc* de Dunnett.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme expresso na tabela um **Tabela 1**, exceto por *S. aureus*, *S. typhimurium* e os dois isolados clínicos que apresentaram CIM de 6,25 mg/mL, todas as outras cepas foram inibidas pelo extrato à 3,125 mg/mL. A CIM exerceu um efeito bactericida sobre *K. pneumoniae*, *S. enterica* Typhimurium, *S. aureus* e *S. saprophyticus* e um efeito bacteriostático sobre *E. hormaechei*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Nenhuma bactéria conseguiu sobreviver a 6,25 mg/mL, exceto *K. pneumoniae* (KPC) e (NDM), para as quais nenhuma CBM pôde ser encontrada. Estes resultados vão de encontro aos achados de Martinez *et al.* (2014), o único outro trabalho a avaliar atividade de um extrato de *V. caven* até o momento. que encontrou valores de CIM de 4 mg/mL correspondendo aos valores de CBM para duas das três cepas de *S. aureus* testadas; e CBM de 8 mg/mL para a terceira.

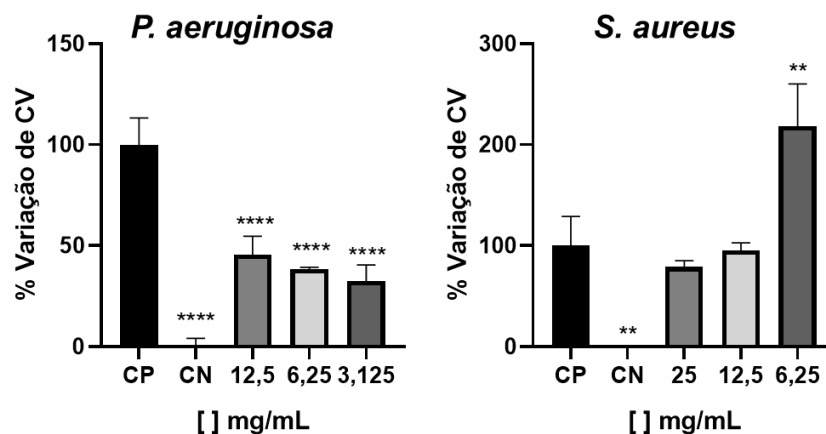
Tabela 1: Valores de CIM e CBM obtidos para cada

Microrganismo	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	3.125	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	3.125	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 1705)	3.125	3.125
<i>Enterobacter hormaechei</i> (ATCC 700323)	3.125	6.25
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	6.25	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> (BAA 1026)	6.25	6.25
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (BAA 750)	3.125	3.125
<i>K. pneumoniae</i> KPC (isolado clínico)	6.25	-
<i>K. pneumoniae</i> NDM (isolado clínico)	6.25	-

A quantificação dos biofilmes por CV está expressa na **Figura 1**. O extrato se mostrou mais eficaz frente à *P. aeruginosa*, revertendo em 54,6, 61, 63 e 67,57% a formação de biofilme nas concentrações de 12,5, 6,25 e 3,12 mg/mL, respectivamente. Infelizmente, para *S. aureus*, nenhuma reversão significativa ($p > 0,05$) pôde ser evidenciada nas concentrações de 25 e 12,5 mg/mL e a coloração

foi dobrada na menor concentração. Não há relatos na literatura atual sobre atividade antibiofilme em formulações obtidas a partir da *V. caven*, dificultando o entendimento e comparação destes resultados.

Figura 1: Quantificação de biofilme por coloração com CV



4. CONCLUSÕES

O presente estudo é um dos pioneiros na bioprospecção de extratos *V. caven*, sendo o primeiro a reportar valores de CIM e CBM para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus*, *E. hormaechei* e *S. enterica* Typhimurium, além de ser o primeiro a reportar a capacidade de reversão do referido extrato sobre biofilmes de *P. aeruginosa*. Estes resultados enaltecem o potencial antimicrobiano da *V. caven* e abre portas para o desenvolvimento de pesquisas futuras a cerca das propriedades bioativas da espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, V.P.P; PALISSARI, R.; COTTA, M.A; CESAR, C.L.; KABUKI, D.Y. Avaliação microscópica de superfícies de aço inoxidável usados em ensaios de biofilmes. **Hig Alim.** p. 2390-2395. 2019.
- CROVETTO, R. Las plantas utilizadas en medicina en el noroeste de Corrientes (Republica Argentina). 1981.
- FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 4, p. 369–378, jul. 2017.
- KONGKHAM, B.; PRABAKARAN, D.; PUTTASWAMY, H. Opportunities and challenges in managing antibiotic resistance in bacteria using plant secondary metabolites. **Fitoterapia**, v. 147, p. 104762, 2020.
- MARTINEZ, M. A. *et al.* Screening phytochemical and antibacterial activity of three San Luis native species belonging at the Fabaceae family. **Pharmacol Online**, v. 3, p. 1-6, 2014.

RONDINA, R.V.D; BANDONI, A.L.; COUSSIO, J.D. Especies medicinales argentinas con potencial actividad analgésica. **Dominguezia**, v. 24, n. 1, p. 47-69, 2008.

SANDBERG, M. *et al.* Automating a 96-well microtitre plate model for Staphylococcus aureus biofilms: an approach to screening of natural antimicrobial compounds. **International journal of antimicrobial agents**, v. 32, n. 3, p. 233-240, 2008.

TOURSARKISSIAN, M. Plantas medicinales de la Argentina sus nombres botanicos, vulgares usos y distribucion geografica. 1980.

WIKLER, M.A. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. CLSI (NCCLS). 2006.