

## ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aloysia gratissima* NO TRATAMENTO DA OTITE CANINA

ANDRESSA BACHER<sup>1,2\*</sup>, ARTHUR BARBOSA NATEL<sup>3</sup>, ANA CLARA MARTINS MARIANO<sup>3</sup>, BRENDA LEONHARDT NESKE<sup>3</sup>, BRUNA ALVES OTTOBELI<sup>4</sup>, ANDRÉ MARCOS DEZAN BIENIEK<sup>4</sup>, ENZO JÚLIO FERRARESI<sup>3</sup>, LETIERE CABREIRA SOARES<sup>5</sup>, DALILA MOTER BENVENÚ<sup>6</sup>, FERNANDA OLIVEIRA LIMA<sup>7</sup>

### 1. Introdução

A otite é um processo caracterizado pela inflamação do conduto auditivo que resulta em alterações do ambiente normal do canal, possuindo caráter doloroso e pruriginoso. De acordo com a localização anatômica, a otite pode ser classificada como externa, quando restrita aos canais vertical e horizontal do ouvido; como média, se abrange as estruturas da bula timpânica e recesso epitimpânico; e como interna, quando há comprometimento da cóclea e sistema vestibular (Magalhães et al. 2017).

Muitos dos microrganismos presentes na otite canina apresentam resistência aos antibióticos, devido ao uso inadequado dos medicamentos e a formação de biofilme por parte das bactérias que aumenta consideravelmente as chances de sobrevivência das bactérias, pois conferem à colônia proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro e de antibióticos (Emeru et al. 2019).

A busca por novos compostos antibacterianos é uma forma alternativa de solucionar esse problema, por isso os produtos fitoterápicos se tornaram alvo de diversos estudos. Diante disso, os representantes da família Verbenaceae, são exemplos do poder bactericida dos fitoterápicos, podendo-se destacar dentro dessa família a espécie *Aloysia gratissima*, que possui como principal descrição etnofarmacobotânica eficácia contra certas infecções, como gastrointestinais e respiratórias. Este arbusto encontra-se distribuído em regiões tropicais e subtropicais, presente no Sul da América, crescendo no Brasil, Argentina e Uruguai (Santos et

---

1 Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, contato: andressa.bacher@estudante.uffs.edu.br

2 Grupo de Pesquisa em Energias renováveis e sustentabilidade – GPERS.

3 Graduando(a) em Medicina Veterinária, UFFS, *campus* Realeza.

4 Mestrando(a) em Saúde Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul, UFFS

5 Doutor em Ciências, UFFS, *campus* Realeza.

6 Doutora em Farmacologia, UFFS, *campus* Realeza.

7 Doutora em Ciências, UFFS, *campus* Realeza. **Orientadora.**

al. 2013).

## 2. Objetivos

Avaliar a susceptibilidade das bactérias ao efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (OEAg) e sua capacidade de reduzir a formação de biofilme por bactérias isoladas dos ouvidos de cães acometidos por otite.

## 3. Metodologia

O estudo foi realizado nas dependências da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS/Campus Realeza. Foram utilizadas cepas bacterianas armazenadas no Laboratório de Microbiologia constituindo o inóculo mãe. Ao todo, foram testadas 10 diferentes espécies de bactérias coletadas a partir do conduto auditivo de cães diagnosticados com otite.

As folhas de *Aloysia gratissima* foram coletadas pelo pesquisador L.C.S em Uruguaiana, no Estado do Rio Grande do Sul (30°06'57.9"S e 56°25'20.4"W) ao final da tarde, no mês de janeiro de 2024. A planta foi seca à sombra e à temperatura ambiente por 1 semana. Após esse tempo, as folhas foram removidas e armazenadas a temperatura de -4 °C, para então serem submetidas ao processo de extração.

A extração do OEAg foi realizada por meio da técnica de hidrodestilação, com base em uma metodologia adaptada a partir de Verginaci et al. (2024). Inicialmente, as folhas de *Aloysia gratissima* foram submetidas ao aquecimento, e o óleo essencial e seu hidrolato foram extraídos por 2 horas em um aparelho de *Clevenger*. Durante o aquecimento, o óleo essencial, juntamente com a água presente no material vegetal foram vaporizados. Em seguida, esses vapores foram condensados e separados, sendo o óleo recolhido e armazenado num reservatório apropriado. O OEAg obtido foi acondicionado em frasco âmbar e armazenado em congelador, garantindo a proteção contra a luz ambiente e preservando suas propriedades.

Para analisar a atividade antimicrobiana, todas as cepas bacterianas foram cultivadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas a 37 °C por 24 horas. No dia seguinte, foram diluídas em solução salina 0,9 % e padronizadas em valores entre 0,08 e 0,13 unidades de absorbância a um comprimento de onda de 625 nm no espectrofotômetro Uv-Vis (Thermo Scientific®).

Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi pipetado na primeira linha (A) de uma microplaca 100 µL de caldo BHI e 100 µL de OEAg. Após homogeneização, 100 µL foram transferidos à segunda linha (B), novamente homogeneizado com 100 µL de

caldo, e assim sucessivamente, até a penúltima linha da microplaca, gerando as seguintes porcentagens de óleo: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 e 0,78%, até a linha (H). Após as diluições, é então acrescentado 10  $\mu\text{L}$  de cada cepa bacteriana em triplicata. Além disso, em duas colunas da placa de 96 poços foram incluídos o controle positivo e o controle negativo. A CIM foi determinada a 605 nm no Elisa Multiskan FC (Thermo Scientific®), comparando as densidades Ópticas (DO) dos poços. Para a confirmação da CIM, foi adicionado 15  $\mu\text{L}$  do revelador resazurina a 0,01 % aos poços e a placa foi incubada por 1 hora a 37 °C.

Posteriormente foi realizado o teste de concentração bactericida mínima (CBM), em que o material proveniente de um poço mais concentrado do que a CIM e dois poços menos concentrados, além do poço da CIM, foram semeados em placas de ágar *Mueller-Hinton* estéril e incubados a 37°C por 24 horas. A CBM foi considerada a partir da concentração em não houve crescimento de colônias bacterianas.

Para verificar a capacidade formadora de biofilme das cepas, a cepa formadora de biofilme ATCC 6538 foi o controle positivo, e a cepa não formadora de biofilme ATCC 1228 foi o controle negativo. Após a incubação, as células foram fixadas e coradas, e a densidade óptica medida a 600 nm no Elisa Multiskan FC (Thermo Scientific®).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 7.01, considerando um valor de  $p < 0,05$  como diferença estatística significativa. Inicialmente, foi realizada análise descritiva dos dados considerando os valores de CIM e CBM, na forma de valores absolutos, percentuais, média, mediana, desvio padrão da média e intervalo interquartil.

#### 4. Resultados e Discussão

Para a determinação da CIM do OEAg foram testadas 10 cepas bacterianas, classificadas como *Staphylococcus* coagulase-negativas que apresentaram diferentes percentuais de inibição. A média dos resultados obtidos foi de 35,7 %, indicando que, em geral, as bactérias foram inibidas nessa concentração de óleo essencial. A menor CIM foi observada em duas cepas, que foram inibidas na menor concentração testada (0,78%). Por outro lado, outras duas cepas só foram inibidas na maior concentração avaliada, correspondente a 100%, evidenciando uma variabilidade na sensibilidade bacteriana ao OEAg testado. Essa variabilidade também foi encontrada por um estudo realizado por Santos et al. (2013), entretanto, o presente trabalho demonstrou resultados ainda mais promissores em relação à atividade inibitória do óleo essencial derivado das folhas de *Aloysia gratissima*.

Posteriormente à determinação da CIM, foi realizado o teste de CBM, no qual o óleo

essencial demonstrou atividade bactericida em 90 % das cepas testadas. As concentrações eficazes variaram entre 6,25 % e 100 %, indicando que o óleo foi capaz de eliminar a maioria das bactérias em diferentes níveis de concentração.

No entanto, uma das cepas apresentou crescimento nas placas de ágar mesmo após exposição ao óleo essencial, sugerindo que, nesse caso, o composto exerceu apenas efeito bacteriostático, e não bactericida. Os achados corroboram com um estudo desenvolvido por Franco et al. (2007), em que foi possível encontrar efeito bacteriostático do óleo em todas as cepas que haviam sido testadas.

O ensaio de formação de biofilme foi realizado utilizando somente três das dez cepas anteriormente testadas por conta da quantidade de óleo essencial disponível para realizar os testes. Foram escolhidas 3 bactérias formadoras de biofilme: uma fraca, uma moderadamente formadora e uma forte formadora. Após análise estatística do teste de biofilme verificou-se que o OEAg apresentou desempenho significativo na inibição da formação de biofilme, em duas das três bactérias com valor de  $p = 0,002$ . No entanto, a bactéria forte formadora apresentou formação de biofilme, mostrando que o OEAg não foi eficaz. Os resultados condizem com a literatura, como foi apresentado por Bersan et al. (2014), em que avaliaram a ação do OEAg e observaram uma inibição do biofilme de *Streptococcus mitis* de forma mais intensa que a clorexidina.

## 5. Conclusão

Diante do exposto, o OEAg apresentou vantagens significativas em relação à inibição e no combate a biofilmes bacterianos, possuindo eficácia antimicrobiana. Esses achados corroboram com estudos anteriores e abrem caminho para futuras investigações sobre o uso deste óleo em aplicações *in vivo*, como uma estratégia promissora.

## Referências Bibliográficas

BERSAN, S. M. F. et al. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 451, 2014.

EMERU, B. A. et al. Characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Central Ethiopia. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, p. 81, 2019.

FRANCO, A. L. P. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos

essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (Alfazema), *Ocimum gratissimum* L. (Alfavaca-Cravo) e *Curcuma longa* L. (Açafrão). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, 2007.

MAGALHÃES, N. R. et al. Frequency of *Malassezia* spp. in dogs presenting external otitis. **Scientific Electronic Archives**, v. 10, n. 6, p. 50-55, 2017.

VERGINACI, G. et al. Estudo da estabilidade de uma loção corporal hidratante com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). **Revista Brasileira Multidisciplinar**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 57-74, 2024. DOI: 10.25061/2527-2675/ReBraM/2024.v27i1.2007. Disponível em: <https://revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/2007>. Acesso em: 15 jul. 2025.

SANTOS, F. M et al. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas e flores de *Aloysia gratissima*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 583-588, 2013. DOI: 10.1590/S1516-05722013000400015.

**Palavras-chave: fitoterapia, dermatopatia, CIM, CBM, resistência bacteriana**

**Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2024-0084**

#### Financiamento

