



ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* (*TEA TREE OIL*) SOBRE AGENTES INFECCIOSOS ISOLADOS DE BOVINOS ACOMETIDOS POR MASTITE

SUELEN FINHLER IC/ITI^{1,2*}, GABRIELA SUTHOVSKI³, DIANA PAULA PERIN⁴, CALINCA SKONIESKI⁵, DALILA MOTER BENVENEGNÚ^{2,6}

1 Introdução

Seguindo a tendência global da inserção do leite de vaca como alimento rico e saudável, o Brasil desponta nesse mercado como um dos maiores produtores mundiais de leite. O mercado do leite é um dos mais desafiadores, em virtude da busca pela manutenção do bem-estar animal e controle das afecções de alta incidência no gado leiteiro, tais como a mastite. Tal enfermidade é definida como um processo inflamatório da glândula mamária, causado por bactérias, fungos ou algas (ACOSTA *et al.*, 2016). A presença da mastite determina uma diminuição do bem-estar animal e acréscimo do custo de produção devido à dificuldade de contenção e tratamento dos casos, além de perda da qualidade do leite.

Um dos principais agentes etiológicos envolvidos na mastite bovina é a bactéria *Staphylococcus aureus*, e o seu controle representa uma grande preocupação, por conta do seu elevado potencial de contágio entre humanos e animais (LI *et al.*, 2017). Também é observada uma alta frequência de resistência desse microrganismo a antimicrobianos, uma vez que o uso exacerbado e indiscriminado de antibióticos determinou o surgimento de cepas multirresistentes. Além disso, essa prática terapêutica frequentemente causa inúmeros efeitos adversos, prejudicando o bem-estar dos bovinos e provocando acumulação de fármacos no meio ambiente (ACOSTA *et al.*, 2016).

Alternativamente aos antibióticos convencionais, substâncias presentes naturalmente em plantas podem apresentar atividade antimicrobiana interessante. Essa atividade é atribuída aos Óleos Essenciais (OE), que são considerados os agentes antimicrobianos mais importantes dos vegetais. Adicionalmente, os OEs possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, entre outras (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

¹Estudante de Nutrição, UFFS, *campus* Realeza, contato: suelenfinhler8@gmail.com

²Grupo de Pesquisa: Sanidade Animal - Sanimal

³Ma. Farmacêutica, UFFS, *campus* Realeza

⁴Bióloga, UFFS, *campus* Realeza

⁵Estudante de Nutrição, UFFS, *campus* Realeza

⁶Dra. Farmacêutica, UFFS, **Orientadora**



Visando a utilização das propriedades antimicrobianas dos OEs, as formulações fitoterápicas são muito utilizadas como terapias alternativas para o tratamento da mastite. Dentre as plantas com tal propriedade destaca-se a *Melaleuca alternifolia*. O óleo essencial de melaleuca (TTO - *tea tree oil*) possui grande importância medicinal por apresentar comprovada ação bactericida e antifúngica contra diversos patógenos (OLIVA *et al.*, 2018).

2 Objetivos

- Verificar o perfil de resistência da bactéria *Staphylococcus aureus* isolada de bovinos acometidos por mastite ao antimicrobiano Penicilina G.
- Pesquisar o efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre agentes infecciosos resistentes a Penicilina G.

3 Metodologia

Vinte e sete cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite persistente doadas pela Universidade de São Paulo foram utilizadas no experimento. As cepas foram inoculadas em 5 mL de caldo Mueller-Hinton (CMH) estéril, e incubadas a 37°C por 24 h. Após esse período, as soluções foram padronizadas adicionando solução salina 0,9% estéril até atingir 0,5 de turbidez na escala McFarland. A padronização foi confirmada no espectrofotômetro a 625nm, obtendo-se absorvâncias de 0,08 a 0,13 Å, o que representa 1 - 2 x 10⁸ UFC/mL (CLSI, 2008).

Para o teste de sensibilidade a antimicrobianos, um swab estéril foi mergulhado em cada tubo contendo inóculo e esfregado de forma suave em toda a superfície de uma placa de Ágar Mueller-Hinton (AMH). Esse procedimento foi efetuado três vezes e, em cada vez, a placa foi girada em 60°. Um disco de penicilina G foi posicionado na superfície central de cada uma das placas de AMH, a qual foi mantida em estufa a 35°C, durante 24 h. Os halos de inibição foram medidos com paquímetro e cada cepa de *S. aureus* classificada como Sensível (S), Intermediária (I) ou Resistente (R) ao antibiótico testado (CLSI, 2008).

Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) foram determinados pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2008). A concentração inicial do OE foi fixada em 10% (20 µL de OE em 180 µL de CMH) e a concentração final na microplaca foi de aproximadamente 0,078% de OE. Para permitir a solubilização de OE em caldo, foi adicionado 1% de polissorbato 80. Pipetou-se uma quantidade de 10 µL de inóculo padronizado a 0,5 McFarland em triplicata para cada poço de uma microplaca, bem como controles negativo, positivo e de OE. A microplaca foi incubada a 37°C por 24 h e a CIM foi determinada pela leitura da densidade óptica (DO) em 625nm no aparelho Elisa Multiskan FC (Thermo Scientific®). Para



confirmação da CIM, 25 μ L de Resazurina a 0,01% foi pipetada em cada poço da placa e, após incubação por 1 h a 37°C, a permanência da cor azul no poço indica a ausência de metabolismo microbiano e uma cor rosa, a presença desse metabolismo.

Após determinar a CIM, as soluções dos poços foram transferidas para uma placa de AMH e incubados a 37° C por 24 h. Assim, foi determinada a concentração bactericida mínima (CBM) - concentração mínima de OE em que houve ausência de crescimento bacteriano. Por fim, os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística descritiva a fim de determinar os dados de frequência, mediana e interquartis.

4 Resultados e Discussão

O teste de perfil de sensibilidade à Penicilina G demonstrou que apenas três cepas testadas apresentaram sensibilidade a esse antimicrobiano, cerca de 11%. Dessa forma, as 24 (89%) cepas de *S. aureus* restantes se mostraram resistentes a esse antibiótico comumente utilizado na terapêutica veterinária.

A partir das cepas resistentes a Penicilina G descritas acima, foi possível determinar que o OE de *Melaleuca alternifolia* demonstrou efeito bacteriostático e/ou bactericida contra essas 24 cepas. A mediana da CIM encontrada foi de 0,635% de OE, com mínimo de 0,312% e máximo de 2,500%. Já para a CBM os valores encontrados foram: 1,25% para mediana, 0,625% concentração mínima e 10% o valor máximo.

Em comparação, Oliva *et al.* (2018) pesquisou cepas de *S. aureus* resistentes a metecilina (antibiótico pertencente ao grupo das penicilinas) e encontrou uma CIM média de 0,5%, também usando OE de *Melaleuca alternifolia*. No mesmo estudo, a CBM encontrada foi de 2% (média). Dessa forma, é possível perceber que os resultados apresentados para CIM são um pouco mais elevados que os apresentados por Oliva *et al.* (2018). Já para a CBM, nesse caso, percebe-se que o OE apresentou maior potencial bactericida em relação a este outro estudo.

5 Conclusão

Confirmou-se que as cepas analisadas realmente demonstraram sensibilidade diminuída ao antimicrobiano penicilina G. Assim, observa-se que o OE de *Melaleuca alternifolia* apresentou efeito bacteriostático e bactericida contra as cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina G no modelo *in vitro*. Portanto, o uso do OE deve ser considerado como uma alternativa à mastite bovina, devido à crescente resistência de bactérias aos antibióticos convencionais. Contudo, seus possíveis efeitos tóxicos no modelo animal devem



ser estudados e ponderados em pesquisas futuras.

Referências

ACOSTA, A. C. *et al.* Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.I.], v. 36, n. 7, p.565-573, jul. 2016.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S.. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils —Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, [S.I.], v. 4, n. 3, p.1-21, 8 ago. 2017.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters for veterinary antimicrobial agents; approved guideline—3rd ed.** CLSI document VET02-A3. v. 28, n. 7, 2008.

OLIVA, A. *et al.* High Potency of Melaleuca alternifolia Essential Oil against Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. **Molecules**, [S.I.], v. 23, n. 10, p. 01-14, 9 out. 2018.

LI, T. *et al.* Molecular Characteristics of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis between 2014 and 2015. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.I.], v. 7, p.1-10, 19 abr. 2017.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; penicilina G; doença infecciosa; *in vitro*.

Financiamento: Fundação Araucária (PIBIS) - Edital N° 739/GR/UFFS/2019