

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

AÇÃO DO ÓLEO DE MELALEUCA (*MELALEUCA ALTERNIFOLIA*) CONTRA PATÓGENOS ISOLADOS NO SÊMEN E FOSSA URETRAL DE EQUINO

Bhrenda Magalhães Samora¹, Julia Viana Alves², Giovanna Veggi Bicalho
Canedo¹, Lucas da Silva Schwambach¹, Carla Braga Martins¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo, CCAE/UFES, Alto Universitário, s/n, Alegre - ES, Brasil,
bhrenda.samora@edu.ufes.br, giovanna.canedo@edu.ufes.br, lucasschwambach.vet@outlook.com,
carla.martins@ufes.br

²Médica Veterinária do Haras RH Ranch, BR-101, km 51, Campos dos Goytacazes, RJ - Brasil,
juliav.viana@hotmail.com

Resumo

Tratamentos utilizando óleos essenciais têm sido cada vez mais explorados na tentativa de contornar a resistência bacteriana e suprir essa necessidade emergente. Diante da busca por terapias alternativas e eficazes, este estudo propôs avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), comparando a ação dos antibióticos e antifúngicos contra microrganismos isolados do sêmen e fossa uretral de garanhões. Amostras colhidas da fossa uretral e do sêmen de um garanhão foram utilizadas para cultivo microbiológico. A cultura apontou contaminação fúngica e bacteriana por *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp. Foi realizado antibiograma com os antibióticos ceftiofur, ampicilina e enrofloxacin e antifúngicos ketoconazol e itraconazol. A susceptibilidade aos antimicrobianos e ao óleo essencial de melaleuca foi determinada pelo método qualitativo de concentração inibitória mínima. A eficiência antibacteriana do óleo essencial foi observada nas concentrações superiores a 50% e antifúngica, nas concentrações superiores a 25%.

Palavras-chave: Antibacteriano. Antifúngico. Garanhões. Óleo essencial.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Medicina Veterinária.

Introdução

O avanço das biotecnologias reprodutivas resultou no controle considerável na transmissão de doenças venéreas. Contudo, o sêmen do garanhão com presença de patógenos continua sendo uma fonte de contaminação para a égua podendo ocasionar endometrite (AL-KASS *et al.*, 2019). O tratamento das afecções do trato reprodutivo de garanhões é amplamente realizado com antimicrobianos na rotina veterinária (PYÖRÄLÄ *et al.*, 2014). Nesse contexto, a escolha do antimicrobiano deveria ser baseada nos testes de susceptibilidade dos patógenos isolados por meio de cultura e antibiograma, contudo, na prática a administração é feita de forma indiscriminada e sem assistência veterinária qualificada, acarretando resistência bacteriana.

Frente a essa problemática, tratamentos alternativos utilizando óleos essenciais têm sido cada vez mais explorados na tentativa de contornar a resistência bacteriana e suprir essa necessidade (PAIANO *et al.*, 2019; XIAO *et al.*, 2020).

O óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), é considerado um excelente aliado no controle microbiano devido a ação comprovada em diversos estudos (XIAO *et al.*, 2020; CARREGARO *et al.*, 2022). O terpinen-4-ol compõe aproximadamente 40% do óleo essencial de melaleuca, sendo considerado o principal responsável pela sua ação antimicrobiana (SAGAVE, 2015). Neves *et al.* (2018) atestaram a eficácia do óleo essencial de melaleuca frente a patógenos isolados do sêmen de garanhões.

Diante da busca por terapias alternativas e eficazes, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) nas concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%, comparado a ação dos antibióticos enrofloxacin, ceftiofur e ampicilina e dos antifúngicos ketoconazol e itraconazol contra microrganismos isolados no sêmen e na fossa uretral de garanhões.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Metodologia

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Espírito Santo, sob número 011/2022.

Foi utilizada amostra de sêmen e da fossa uretral de um garanhão da raça Mangalarga Marchador, com 7 anos de idade, hígido, proveniente de um criatório de equinos situado em Alegre, ES.

O sêmen foi colhido com auxílio de vagina artificial específica para equinos, modelo Botucatu. Realizou-se o swab da fossa uretral com auxílio de cotonete estéril para cultivo microbiológico no laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo.

As amostras colhidas foram cultivadas em placas de petri contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI), para isolamento de bactérias e Ágar Sabouraud para fungos, em estufa marca *Ethik Technology*, à 36°C por 24 horas.

Após o tempo de incubação, realizou-se a confecção das lâminas com as cepas que se desenvolveram nos meios. As lâminas foram coradas com coloração de Gram para identificação dos microrganismos no microscópio com aumento de 100x. As colônias identificadas foram reinoculadas em placas de petri com meio de cultura BHI e ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 24 horas a 36°C para obtenção de monoculturas. Foram realizados testes de catalase com água oxigenada e de hemólise com placas ágar sangue.

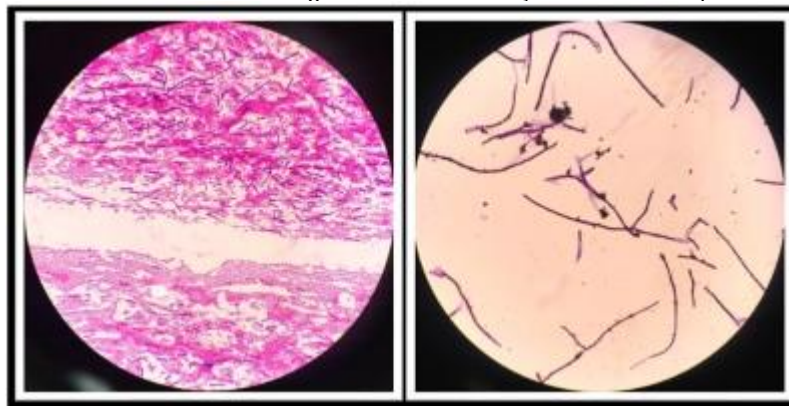
O antibiograma foi realizado em triplicata em meio Mueller Hinton. Para o grupo controle negativo (G1) foi utilizado solução salina e tween 80. No grupo controle positivo (G2) foram utilizados discos-difusores de antibióticos enrofloxacin, ampicilina e cetiforfur e disco-difusores de antifúngicos intraconazol e ketoconazol, do laboratório Diagnóstico Ltda. E no grupo contendo o óleo essencial de melaleuca adquirido comercialmente (Do Terra) (G3), utilizou-se disco-difusores impregnados com 15 µL de óleo essencial nas concentrações de 100%, 50% na diluição 1:1 de óleo essencial e tween 80 e as demais concentrações 25%, 12,5% e 6,25% obtidas através de diluições seriadas.

A susceptibilidade aos antimicrobianos e ao óleo essencial de melaleuca foi determinado pelo método qualitativo de concentração inibitória mínima (ANDREWS, 2001), inversamente proporcional ao diâmetro do halo formado a partir da inibição do crescimento bacteriano. Sendo assim, as cepas dos grupos 1, 2 e 3 foram classificadas em suscetível ou resistente em relação à ação do antibiótico (NCCLS, 2000) e do óleo testado.

Resultados

No exame microbiológico, as culturas isoladas foram classificadas em colônias fúngicas (Figura 1), *Cocobacilos* hemolíticos, *Cocos* hemolítico e *Cocos* (Figura 2).

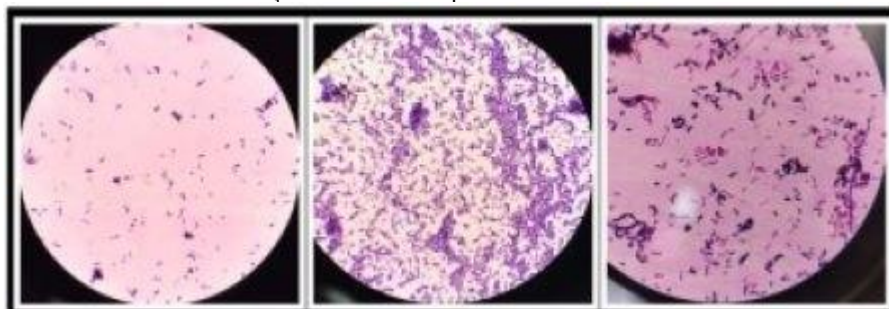
Figura 1 – Imagem de colônias fúngicas coradas com panótico rápido, caracterizadas pela presença de hifas (setas) isoladas do sêmen e fossa uretral de garanhão. Visualização em microscópio em aumento 100 x.



Fonte: Alves (2022).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 2 – Imagem de colônias bacterianas coradas com panótico rápido, isoladas em sêmen de garanhão. Visualização em microscópio em aumento 100 x.



Fonte: Alves (2022).

As colônias fúngicas foram avaliadas pelas características macromorfológicas das colônias e micromorfológicas pela presença de hifas, classificando somente a contaminação fúngica na fossa uretral e no sêmen (ALMEIDA *et al.*, 1988).

Ao isolamento das culturas bacterianas, foram identificadas bactérias, cocos e cocobacilos, todas gram positivo e catalase positiva ao teste de água oxigenada. Com base nas características morfológicas das cepas e nos resultados dos testes, as colônias bacterianas isoladas nesse estudo são sugestivas de *Bacillus cereus* (BATISTA *et al.*, 2018), *Staphylococcus* spp., mais especificamente o *Staphylococcus aureus* (SANTOS *et al.*, 2007) e *Micrococcus* spp (GERMANO *et al.*, 2003), corroborando com os achados de ROTA *et al.*, 2011; RAMIRES, ALVARENGA, PAPA *et al.*, 2015; AL-KASS *et al.*, 2019; AL-KASS *et al.*, 2020).

Conforme apresentado na Tabela 1, o controle negativo com Tween 80® e solução salina não apresentaram halo de inibição, excluindo a ação antimicrobiana proveniente de outro princípio ativo presente nas diluições. O controle positivo mostrou que os antibacterianos ceftiofur e ampicilina resultaram em halos inibitórios corroborando ao padrão estabelecido pela CLSI (2019). Em contrapartida, a enrofloxacin não apresentou halo inibitório, sugerindo resistência das bactérias isoladas em relação ao princípio ativo utilizado no estudo. Do mesmo modo, os antifúngicos no controle positivo não alcançaram o padrão de halo inibitório estabelecido pela CLSI (2019).

Tabela 1- Resultados obtidos frente aos antibióticos enrofloxacin, ceftiofur, ampicilina e antifúngicos itraconazol e ketoconazol.

Antimicrobiano	Controle positivo	Controle negativo	Halo inibitório (CLSI 2019)
Ketoconazol	11mm	-	≥ 20 mm
Itraconazol	-	-	≥ 20 mm
Enrofloxacin	-	-	≥ 18 mm
Ceftiofur	10 mm	-	10 – 18 mm
Ampicilina	17 mm	-	≥ 17 mm

Fonte: produção do autor.

Os halos de inibição decorrentes da ação antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca frente às bactérias e aos fungos isolados nas amostras de sêmen e da fossa uretral estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2- Resultados obtidos frente ao tratamento óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*).

Concentração óleo essencial	Bactérias isoladas no sêmen	Fungos isolados no sêmen	Fungos isolados da fossa uretral
100%	10mm	27mm	16mm
50%	10mm	-	9mm
25%	-	-	8mm
12,5%	-	-	-

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

6,25%

-

-

-

Fonte: produção do autor.

Em relação ao poder bactericida do óleo, nas concentrações de 100% e 50%, o halo inibitório observado foi semelhante ao halo gerado pelo antibiótico ceftiofur, e superiores a ação da enrofloxacin, apresentando efeito satisfatório frente às bactérias isoladas do sêmen do garanhão. As concentrações de 25%, 12,5% e 6,25% não demonstraram ação antimicrobiana pela ausência de formação do halo inibitório.

A ação fungicida do óleo frente aos microrganismos isolados da fossa uretral e sêmen do garanhão obteve o resultado mais satisfatório na concentração de 100%. O halo inibitório de 27 mm foi superior ao halo gerado pelo ketoconazol, de 11 mm. A ação antifúngica do óleo essencial de melaleuca foi mais elevada que a ação do itraconazol, onde não foi observado halo inibitório.

O óleo essencial testado apresentou efeito antifúngico superior ao padrão estabelecido pelo CLSI (2019).

Discussão

Os patógenos isolados no estudo corroboram com os encontrados por Rota *et al.* (2011); Ramires *et al.* (2015); Al-Kass *et al.* (2019); e Al-Kass *et al.* (2020).

Em estudos realizados por Al-Kass *et al.* (2020), o *Staphylococcus* spp. foi o microrganismo de maior prevalência na microbiota seminal de garanhões, presente em todas as amostras avaliadas. No entanto, a presença de bactérias potencialmente patogênicas como *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* spp. beta hemolíticos. *Escherichia coli* e *Taylorella equigenitalis* também foram identificadas, decorrente do desequilíbrio na microbiota da genitália externa resultando na proliferação de microrganismos oportunistas (RAMIRES *et al.*, 2015).

Cruvinel *et al.* (2011) obtiveram resultados positivos com o uso do óleo essencial de melaleuca para inibição do crescimento, *in vitro*, de colônias de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, assim como a ação eficiente contra bactérias produtoras de biofilmes dentais, evidenciada por Leite *et al.* (2017), o que denota grande potencial antibacteriano.

Neves *et al.* (2018), observaram que cães com otites de origem bacteriana e fúngica apresentaram resultados promissores quando tratados com óleo essencial de melaleuca. A ação do óleo foi comprovada principalmente no controle do *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, sustentando os achados do presente estudo.

A adição do óleo essencial deve ser explorada como alternativa no controle microbiológico seminal. Segundo Elmi *et al.* (2019), o uso do óleo essencial de melaleuca como inibidor de crescimento microbiano no sêmen, na concentração de 0,4 mg/mL, foi semelhante à ação da ampicilina quando testado em doses inseminantes de suínos desprovidas de espermatozoides e contaminadas por *Escherichia coli*.

A toxicidade do óleo de melaleuca em contato com os espermatozoides ainda é pouco estudada. Entretanto, pesquisas recentes realizadas por Elmi *et al.* (2019), demonstraram que o óleo não foi tóxico aos espermatozoides de suínos, mesmo em relação a motilidade espermática, parâmetro que se mostrou mais sensível a variações de concentrações do óleo.

Conclusão

O óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) demonstrou ação antibacteriana nas concentrações superiores a 50% e ação antifúngica, acima de 25% frente a bactérias e fungos isolados do sêmen e fossa uretral de garanhão. É necessário mais estudos para elucidar a eficácia e efeitos deletérios dos óleos essenciais, principalmente na reprodução equina.

Referências

AL-KASS, Z. *et al.* Bacteria detected in the genital tract, semen or pre-ejaculatory fluid of Swedish stallions from 2007 to 2017. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 61, n. 1, p. 1-6, 2019.

AL-KASS, Z., *et al.* Metagenomic analysis of bacteria in stallion semen. **Animal Reproduction**

XXVII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XXIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e XIII Encontro de Iniciação à Docência - Universidade do Vale do Paraíba – 2023
DOI: <https://dx.doi.org/10.18066/inic1070.23>

4

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Science, v. 221, p. 106568, 2020.

ALMEIDA, M. E. S. de *et al.* Identificação da microbiota fúngica de ambientes considerados assépticos. **Revista Saúde pública**, v.22, n.3, p. 201 - 206, 1988.

ANDREWS, J. M. "Determination of Minimum Inhibitory Concentrations". **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5 – 16, 2001. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5.

BATISTA, R. D. *et al.* Contaminação por *Bacillus cereus* e os riscos de intoxicação alimentar. **Revista Desafios**, v. 5, n. 2, p. 30-40, 2018.

CARREGARO, V. M. L. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils against *Pasteurella* spp. isolated from the oral cavity of domestic cats. **Ciência Rural**, v. 52, 2022.

CLSI - Clinical and laboratory standards institute. **Manual de Antibiograma**. Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. Rev 16 – 03/2019.

CRUVINEL, A. R.; SILVEIRA, A. R.; SOARES, J. S. Perfil antimicrobiano de *Staphylococcus aureus* isolado de pacientes hospitalizados em UTI no Distrito Federal. **Cenarium farmacêutico**, v. 4, n. 4, p. 1-11, 2011.

ELMI, A. *et al.* Antimicrobial capabilities of non-spermicidal concentrations of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on the liquid phase of refrigerated swine seminal doses. **Research in Veterinary Science**, v. 127, p. 76-81, 2019.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved standards M7-A5. Wayne, PA, 2000.

LEITE, K. L. de F. *et al.* Antibacterial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree essential oil) on bacteria of the dental biofilm. **Pesquisa brasileira em odontopediatria e clínica integrada**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2017.

PAIANO, R. B. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of essential oils against pathogens often related to cattle endometritis. **The journal of infection in developing countries**, v. 14, n. 2, p. 177-183, 2020.

PYÖRÄLÄ, S., TAPONEN, J.; KATILA, T. Use of antimicrobials in the treatment of reproductive diseases in cattle and horses. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 16-26, 2014.

NETO, C. R. *et al.* Control methods and evaluation of bacterial growth on fresh and cooled stallion semen. **Journal of equine veterinary science**, v. 35, n. 4, p. 277-282, 2015.

NEVES R. *et al.* In vitro and in vivo efficacy of tea tree essential oil for bacterial and yeast ear infections in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 1597- 1607, 2018.

RAMIRES *et al.* Control Methods and Evaluation of Bacterial Growth on Fresh and Cooled Stallion Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 4, 2015.

ROTA, A. *et al.* Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of healthy stallions. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 464–470, 2011.

SAGAVE, L., G. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 221-226, 2015.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

XIAO, S. *et al.* Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 20, p. 1-10, 2020.