

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

EFEITO FITOTERÁPICO *IN VITRO* DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIA* FRENTE À *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Karina Gerhardt Pereira, Poliana da Silva Rocha, Ana Luisa Alves Viana, Lidia Novais da Silva, Ana Carolini Montebeller, Dirlei Molinari Donatele, Felipe Berbari Neto

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N - Guararema, Alegre - ES, 29500-000, Brasil, karina.ufes@hotmail.com, poliana.s.rocha@edu.ufes.br, anna.viana@edu.ufes.br, Lidia.novais.vet@gmail.com, vetcarolini@gmail.com, dirlei.donatele@ufes.br, berbarineto@hotmail.com

Resumo

A descoberta da penicilina no século XX foi revolucionária na medicina devido ao seu efeito contra microrganismos bacterianos. Com isso, na época, a penicilina passou a ser produzida em larga escala e logo surgiram novos medicamentos com efeitos semelhantes. Os antibióticos são eficazes no tratamento das infecções bacterianas, porém seu uso indiscriminado tornou-se uma problemática na atualidade devido a seleção de cepas resistentes. Isto exposto, a procura por tratamentos mais naturais, que causam menos efeitos colaterais e geram menos resíduo é crescente pelos consumidores. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito fitoterápico *in vitro* de *Schinus terebinthifolia* (pimenta rosa) frente à *Streptococcus agalactiae*. Tal microrganismo é um dos responsáveis por causar mastite subclínica em bovinos. Neste experimento foram realizados antibiogramas em triplicata com *Streptococcus agalactiae* diante de diferentes concentrações do óleo essencial (100, 50, 25, 12,5 e 6,25%). As leituras foram realizadas após 48h, percebeu-se que o óleo essencial de *S. terebinthifolia* não demonstrou efeitos inibitórios significativos sobre a *S. agalactiae*.

Palavras-chave: Óleo essencial. *Schinus terebinthifolia*. Antibiogramas. *Streptococcus agalactiae*. Mastite.

Área do Conhecimento: Ciências da saúde, Medicina Veterinária.

Introdução

Mastite é a denominação para a inflamação da glândula mamária, e é a principal doença que acomete este órgão. Além de ser responsável por causar prejuízos para a bovinocultura de leite, provocando alterações físico-químicas no leite e no parênquima glandular, tendo como consequência, a diminuição da qualidade do leite, com o aumento da contagem de células somáticas (CCS), diminuição dos níveis de produção, alto custo com tratamentos e perda precoce de animais que poderiam ainda estar produzindo (FONSECA E SANTOS, 2000; DIAS, 2007). A mastite pode ser causada por estresse, injúria mecânica ou infecção microbiológica, sendo esta última mais comum. Portanto, dentre os principais agentes causadores desta patologia encontra-se a *Streptococcus agalactiae*, sendo transmitida, fundamentalmente, nos períodos de ordenha pela falta de higienização.

A *Streptococcus agalactiae*, são cocos gram-positivos do grupo B, considerado um patógeno com elevado potencial de contaminação. Este agente, juntamente com *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis* são responsáveis pela mastite subclínica (LANGONI, 2000). Dito isto, a infecção pode se apresentar de duas formas: mastite clínica, quando as alterações são visíveis macroscopicamente e mastite subclínica, quando as alterações não são visíveis a olho nu (FONSECA E SANTOS, 2000; DIAS, 2007). A subclínica, por ser de difícil identificação acaba funcionando como reservatório de microrganismos patogênicos, tendo em vista que o úbere bovino é reconhecido como um meio de crescimento para a proliferação da *S. agalactiae* (KEEFE, 2012).

Existe uma dificuldade no tratamento de mastites subclínicas, sendo justificado por uma grande diversidade dos agentes infecciosos e variada resistência a diferentes antibióticos utilizados no mercado: Eritromicina (19,5%), tetraciclina (35,6%), gentamicina (9,3%), clindamicina (20,3%),

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

penicilina (3,4%), amicacina (38,1%) (DA SILVA et al., 2017). Diante disso, os antimicrobianos sintéticos são utilizados indiscriminadamente desde a década de 1970 e causou seleção de microrganismos resistentes. Portanto, outras formas de combate estão sendo pesquisadas, como os fitoterápicos, que não causam reações de hipersensibilidade no animal e diminuem os índices de descarte (BARDAL 2011).

Os óleos essenciais são definidos como produto obtido por destilação a vapor de partes de plantas (folhas, flores, galhos), por prensagem a frio de epicarpós (casca) de citrinos ou por destilação a seco, após separação da fase aquosa (se existir) por processos físicos (SILVESTRE et al., 2019). Logo, para a realização do presente trabalho, foi utilizado o óleo essencial dos frutos maduros de pimenta rosa, tendo em sua composição os principais terpenos: limoneno (31,28%), delta3careno (28,71%) e alfa-pineno (15,01%) (FONSECA et al., 2021). Esses compostos são amplamente estudados e utilizados por suas diversas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antifúngicas e antibacterianas (GEROMINI et al., 2012; MILLEZI et al., 2013; SILVA et al., 2021).

Metodologia

O presente experimento foi realizado no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) do Hospital Veterinário-UFES, em Alegre, ES. O óleo essencial dos frutos da *Schinus terebinthifolius*, foi extraído no Laboratório de Plantas Medicinais da Epamig Sudeste, em Viçosa-MG. Foi usado a cepa ATCC 13813 de *Streptococcus agalactiae* oriunda de doação da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro – PESAGRO-RJ que já está sob posse do LIPOA.

O método utilizado para determinar a atividade bacteriana da *S. agalactiae* em diferentes diluições (100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%) foi o teste de difusão em disco no meio ágar BHI- Brain Heart Infusion. Realizado em triplicata, acompanhados de controle positivo com o antibiótico Enrofloxacin (ENO 05) e controle negativo com solução hidroalcoólica 1:1.

Inicialmente, as linhagens *Streptococcus agalactiae* foram cultivadas em caldo nutritivo (BHI- Brain Heart Infusion – DIFCO), incubadas a 37° C por 48h. Após o cultivo foram realizadas duas replicações da *S. agalactiae* em meio BHI. No dia do experimento, para a realização do preparo do inóculo bacteriano, uma colônia foi coletada e transferida para tubos com solução salina estéril NaCl 0,85%, (p/v) até atingir turbidez equivalente a escala McFarland 0,5 (aproximadamente 1×10^8 UFC/mL). Consecutivamente, o preparo do inóculo foi espalhado na superfície de ágar BHI. Em seguida, com o auxílio de uma pinça flambada, os discos de papel esterilizados de 6mm foram alocados sobre o “tapete” bacteriano. Em sequência, com uma pipeta, foi adicionado 20 µl tanto das diluições e do óleo 100%, quanto da solução hidroalcoólica para o controle negativo sobre cada disco de papel correspondente, e por fim foi alocado o disco de ENO 05 para o controle positivo. Após, as placas foram encubadas em estufa a 37°C por 48 horas.

A análise dos resultados foi quantitativa, pela observação de halo de inibição mensurado com paquímetro, e qualitativa, pela observação de sensibilidade ou resistência. Com isso, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta rosa foi determinada pelo tamanho dos halos de inibição formados sob o disco, usando como referência a classificação de sensibilidade das cepas bacterianas segundo Bezerra et al (2009): Sensível (S) para halos $\geq$ 12mm, Intermediários (I) entre 8mm e 11mm e Resistente (R) halo menor que 8mm.

Resultados

Os resultados dos efeitos da ação de *Schinus terebinthifolia* frente a *Streptococcus agalactiae* estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Resultados da ação antibacteriana do óleo essencial de *Schinus terebinthifolia* em diferentes concentrações frente a *Streptococcus agalactiae*. Medidas dos halos de inibição em milímetros (mm) e descrição de sensibilidade ou resistência.

	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	C+	C-
Placa 1	16 mm (S)	10 mm (I)	8 mm (I)	0 mm (R)	8 mm (I)	25 mm	0 mm (R)
Placa 2	11 mm (I)	9 mm (I)	9 mm (I)	8 mm (I)	0 mm (R)	22 mm	0 mm (R)

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Placa 3 10 mm (I) 11 mm (I) 10 mm (I) 7 mm (I) 8 mm (I) 22 mm 0 mm (R)

C+: Controle positivo, C-: Controle Negativo, (S): Sensível (I): Intermediário, (R): Resistente.

Fonte: o autor.

A cepa bacteriana testada no presente experimento, não mostrou-se sensível ao óleo essencial dos frutos de pimenta rosa, tendo em vista que a média de todas as cinco diluições, nas três placas foram < 10mm. Dessa forma, o óleo essencial não apresentou atividade antimicrobiana avaliada pelo método de difusão em disco.

Discussão

Os halos observados em *S.agalactiae* para o óleo essencial extraído do fruto de *S. terebinthifolia* diferiu significativamente do halo formado pelo antibiótico, apresentando valores menores. Entretanto, vale ressaltar que, mesmo com um halo relativamente pequeno, o óleo essencial ainda assim apresentou atividade antimicrobiana contra a bactéria, o que representa um importante achado. A concentração majoritária de limoneno, delta3careno e alfa-pineno em sua composição podem justificar essa atividade antimicrobiana.

Uma hipótese acerca do resultado obtido segundo Melo et al. (2014), poderia estar relacionado a composição química do meio de cultura, de natureza hidrofóbica ou lipofílica, que pode não permitir a difusão uniforme do óleo essencial através do ágar. Além disso, Ross et al. (2001) diz que o teste de difusão em disco sobre ágar permite que haja volatilização dos compostos presentes no óleo essencial reduzindo sua ação. Mesmo na concentração de 100% do óleo essencial, na média, alcançou um halo de 11 mm. Isso pode ser explicado, pelo fato de que a composição química e o teor de óleo essencial na planta estão relacionados a fatores como temperatura, luminosidade, sazonalidade, estágio de desenvolvimento da planta, horário da colheita e nutrição da planta (CARVALHO, 2017), influenciando diretamente em seu poder de ação. Outrossim, a metodologia utilizando como diluente a solução hidroalcolica pode ter comprometido a ação do óleo essencial, visto que é uma substância oleosa e volátil, impedindo sua solubilização e homogeneização total.

Conclusão

O óleo essencial de *Schinus terebinthifolia* na metodologia testada demonstrou resistência sobre *Streptococcus agalactiae*. Apesar de ter formado halo, foi pequeno se comparado ao controle positivo que mostrou-se sensível, apresentando halo com o dobro de tamanho. Portanto, é preciso o aprimoramento das metodologias, observando as intercorrências que podem influenciar, como a possibilidade de má absorção dos óleos essenciais pelos meios de cultura e volatilização dos compostos pela técnica de difusão em discos. Logo, de acordo com os resultados e discussão deste estudo, novas avaliações e metodologias podem ser feitas e testadas para melhor compreensão dos efeitos do óleo essencial de *S. terebinthifolia* sobre os microrganismos.

Referências

BARDAL, Diego. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BARBATIMÃO *Stryphnodendron adstringens* (MARTIUS) COVILLE EM AGENTES CAUSADORES DA MASTITE. 2011. 181 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2011. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/NCAP-8SDNVD/1/diego_bardal.pdf. Acesso em: 5 jun. 2022.

CARVALHO, J. A. M. ; PINHEIRO, P. F. ; MARQUES, C. S. ; BASTOS, L. R. ; BERNARDES, P. C. . Composição Química e Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Óleo de Pimenta Rosa (*Schinus terebinthifolius*). In: V SEQUFES ? V Semana da Engenharia Química da Universidade Federal do Espírito Santo, 2017, Alegre-ES. V SEQUFES. São Paulo: Blucher Chemical Engineering Proceedings, 2017. v. 4. p. 59-63.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

DA SILVA, J. R. et al. In vitro antimicrobial susceptibility and genetic resistance determinants of *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitic cows Revista da Universidade Vale do Rio Verde | v. 16 | nº. 3 | Edição Especial, 2018 | p. 10 in Brazilian dairy herds. Semina: Ciências Agrárias, v. 38, n. 4, 2017.

DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. Acta Veterinária Brasília, Mossoró, v.1, n.1, p.23-27, 2007.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do leite e controle da mastite. São Paulo: Lemos, 2000. 314p.

FONSECA, M. C. M. ; PICCOLO, M. P. ; SARTORATTO, A. ; ALMEIDA, B. L. ; ARRUDA, T. R. ; MARADINI FILHO, A. M. ; BERNARDES, P. C. ; SARAIVA, S. H. . Composition and in vitro antimicrobial activity of pink pepper fruit essential oils. Brazilian Journal of Development , v. 7, p. 70580, 2021.

GEROMINI, K. V. N.; RORATTO, F. B.; FERREIRA, F. G.; POLIDO, P. B.; SOUZA, S. G. H.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, v. 15, n. 2, p. 127-131, 2012.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. v. 28. n. 2. p. 203-216. 2012.

LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. Revista de Educação Continuada do CRMV-SP, São Paulo, v.3, p.57-64, 2000.

MELO, ANTONIO DIEGO BRANDÃO; GOIS, FRANZ DIAS; ANDRADE, CARLA DE; ROSTAGNO, MARCOS HORÁCIO; COSTA, LEANDRO BATISTA. Composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com vistas ao uso como antimicrobiano para leitões desmamados. Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais (PUCPR. Impresso), v. 12, p. 227-232, 2014.

MILLEZI, A. F.; BAPTISTA, N. N.; CAIXETA, D. S.; ROSSONI, D. F.; CARDOSO, M. G.; PICCOLI, R. H. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 15, n. 3, p. 373-379, 2013.

ROSS, Z. et al. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. Applied and Environmental Microbiology, v. 67, n. 1, p. 475-480, 2001. doi:10.1128/AEM.67.1.475-480.2001.

SILVA, BD da; BERNARDES, PC; PINHEIRO, PF; FANTUZZI E.; ROBERTO, CD Composição química, fontes de extração e mecanismos de ação de óleos essenciais: Conservante natural e limitações de uso em produtos cárneos. Meat Science, v. 176, junho de 2021, Disponível 2021: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108463>.

Silvestre, W. P., Livinalli, N. F., Baldasso, C., & Tessaro, I. C. (2019). Pervaporation in the separation of essential oil components: A review. Trends in Food Science & Technology, 93, 42-52.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo fomento à pesquisa, à Universidade Federal do Espírito Santo, ao Hospital Veterinário da Ufes, ao laboratório de Plantas Medicinais da EPAMIG Sudeste.