

14407 - Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Antibacterial activity of essential oil from Schinus terebinthifolius Raddi

FACCIN, Ângela¹; SCHUBERT, Ryan²; GONÇALVES, Carolina Lambrecht¹; SCHIAVON, Diane Bender Almeida¹; SCHUCH, Luiz Filipe Damé³.

1 Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Programa de Pós Graduação em Veterinária PPGV, angefaccin@gmail.com; 2 Programa de Pós Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar – UFPel, ryannsp@yahoo.com.br; 3 Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Departamento de Veterinária Preventiva, bitoxu@ig.com.br

Resumo: A produção de leite no sistema orgânico tem levado ao interesse dos produtores rurais, porém a mastite é a principal afecção de bovinos leiteiros, para controlá-la as plantas medicinais se tornaram o foco de intenso estudo, com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antibacteriana do óleo essencial das folhas e dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi frente a dez bactérias relacionadas a mastite bovina. O trabalho foi realizado por microdiluição, frente as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Staphylococcus aureus* e cepas de *Staphylococcus* spp coagulase positiva e negativa. Os OEs demonstraram diferentes concentrações bactericida mínima contra as bactérias. Os resultados foram positivos com a ação antibacteriana das folhas e dos frutos verdes contra as bactérias Gram positivas, mais estudos devem ser realizados, em outras concentrações contra bactérias Gram negativas, para determinar a ação contra esses microrganismos.

Palavras-chave: Aroeira vermelha; bactérias; mastite bovina; atividade antibacteriana.

Abstract: Milk production in the organic system has led to the interest of farmers, but mastitis is the main condition of dairy cattle to control it medicinal plants have become the focus of intense study, therefore, the aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of the essential oil of the leaves and fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi forward to ten bacteria related to bovine mastitis. The work was performed by microdilution, ahead bacteria *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus* spp coagulase positive and negative. The OE showed different minimum bactericidal concentrations against bacteria. The results were positive with the antibacterial action of the leaves and unripe fruit against Gram positive bacteria, more studies should be conducted in other concentrations against Gram-negative bacteria, to determine the action against these microorganisms.

Keywords: Brazilian pepper tree; bacteria; bovine mastitis; antibacterial activity

Introdução

A mastite é a principal afecção de bovinos destinados a produção leiteira (LANGONI et. al., 2011). É causada principalmente por agentes bacterianos, dos quais são mais frequentes os que pertencem aos gêneros: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. (OYARZABAL et. al., 2011). Bactérias Gram negativas, como a *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp., também causam mastites, mas com menos frequência (LADEIRA, 2007). É um problema importante nos rebanhos leiteiros, pois acomete a saúde dos animais, reduz a produção e causa alterações na qualidade do leite. A produção de leite orgânico associa baixo custo ao longo do tempo, pois permite independência parcial do produtor em relação aos insumos externos e medicamentos, aumentando a rentabilidade, além de ser um produto

interessante para o consumidor, que conhece os benefícios do alimento orgânico, que é biologicamente superior (LANGONI et. al., 2009).

A utilização de plantas com fins medicinais durante vários séculos constituiu a base terapêutica da prática médica (BRANCO-NETO et. al., 2006). Enquanto o conhecimento da medicina popular brasileira é grande, a maioria das informações nele contidas não foi verificada por um estudo científico rigoroso, e muitas das plantas receberam pouca ou nenhuma atenção (LIMA et. al., 2006). *Schinus terebinthifolius* Raddi é uma pequena árvore conhecida popularmente como aroeira, que é encontrada ao longo da costa brasileira (LEITE et. al., 2011), pode ser encontrada em algumas regiões da Europa e em outras regiões da América (SANTOS et. al., 2007), é uma espécie nativa do Brasil e da América do Sul, pertencente a família Anacardiaceae. Muitas propriedades medicinais tem sido atribuída a essas plantas para além da sua utilização como plantas ornamentais, todas as partes da planta têm sido usadas na medicina popular para o tratamento de diversas patologias (BENDAOUND et. al., 2010).

Recentemente, a aceitação da fitoterapia como uma forma alternativa de cuidados de saúde aumentou entre todos os grupos socioeconômicos da população e tornou-se um setor econômico importante no Brasil (LIMA et. al., 2006), além de ser uma alternativa para o sistema orgânico de produção. Por estas razões, as plantas medicinais se tornaram o foco de intenso estudo em termos de validação de seus usos tradicionais, através da determinação de seus reais efeitos farmacológicos, com isso o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial das folhas e dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi frente a dez bactérias relacionadas a mastite bovina.

Metodologia

A coleta das folhas e dos frutos foi realizada sempre no período da manhã, de árvores localizadas no Campus Universitário Capão do Leão, da Universidade Federal de Pelotas, município Capão do Leão, Rio Grande do Sul. As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia (DVP/FV/UFPel) onde, permaneceram para secagem. Exsiccatas foram enviadas para identificação e conservação no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas. O óleo essencial (OE) das amostras das plantas foi obtidos por hidrodestilação em aparelho Clevenger junto ao Laboratório de Produtos Naturais no Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da UFPel, onde foram identificados seus principais componentes químicos por espectro de Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS). No momento do uso, os OEs foram previamente diluídos a uma concentração de 5% para as bactérias Gram positivas e 20% para as Gram negativas, em água destilada estéril com *Tween* a 1%.

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de microdiluição serial em placas de 96 orifícios em triplicata, a fim de ser determinada a concentração bactericida mínima (CBM). Os microrganismos testados foram bactérias Gram positivas (uma cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e amostras isoladas de leite no Laboratório de Doenças Infecciosas da UFPel, duas de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, duas de *Staphylococcus* spp coagulase negativa, oriundas do leite de uma propriedade localizada em Piratini/RS, uma cepa

de *Streptococcus agalactiae*, uma de *Streptococcus dysgalactiae* e uma de *Streptococcus uberis*, estas oriundas do leite da Embrapa Clima Temperado, localizada em Capão do Leão/RS) e bactérias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Escherichia coli* ATCC 8739). Os inóculos foram preparados a uma concentração de 10^{-6} UFC/ml em meio BHI 2x. A montagem da placa seguiu como descrita pelo documento CLSI M7-A6 (2005) adaptado para fitoterápicos. Foram feitas oito diluições diferentes, iniciando com 50% pois nesse orifício havia extrato e meio de cultura contendo a bactéria, depois sucessivamente 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 e 0,39%. Após a incubação das microplacas por 48h à 37°C, em shaker a 75 RPM, foram transferidas alíquotas de 5µL de cada orifício para Agar sangue e incubadas à 37°C em estufa por mais 24 horas. Como controle positivo, foram realizadas diluições do mesmo modo, com cloro comercial a 5%. E como controle do crescimento bacteriano a partir do inóculo, as bactérias foram colocadas em orifícios contendo apenas água destilada estéril. A interpretação dos resultados foi realizada pela média geométrica das Concentrações Bactericidas Mínimas entendendo esta como, a menor concentração de extrato da planta, capaz de impedir o crescimento bacteriano em Agar sangue. Os óleos essenciais foram avaliados sobre sua composição química por GC/MS.

Resultados e discussões

Os resultados referentes aos valores das CBMs dos óleos essenciais das folhas e dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi frente as 10 bactérias testadas, estão descritos na tabela 1. Onde observamos que os OEs das folhas e dos frutos maduros tiveram bons resultados contra as cepas de bactérias Gram positivas, e que o OE do fruto maduro não apresentou atividade antibacteriana na concentração testada para estas bactérias.

Tabela 1: Valores das Concentrações Bactericidas Mínimas dos extratos hidroalcoólicos e óleos essenciais de *Schinus terebinthifolius* Raddi frente a bactérias causadoras de mastite bovina

Bactérias	Folha	Fruto maduro	Fruto verde	Cloro 2%
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,15	≥10	2,5	1,58
S. spp. coagulase + (26)	0,6	≥10	1,5	0,78
S. spp. coagulase + (8A)	0,3	≥10	1,25	0,5
S. spp. coagulase - (8)	0,19	≥10	1,25	0,78
S. spp. coagulase - (56)	0,95	≥10	≥5	0,3
<i>Streptococcus uberis</i>	0,12	≥10	0,04	0,78
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0,04	≥10	0,04	0,78
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,79	≥5	0,39	0,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≥40	≥40	≥40	0,38
<i>Escherichia coli</i>	≥40	≥40	≥40	0,5

Assim como em nosso estudo outros estudos também avaliaram a atividade antibacteriana desta planta, LIMA et. al. (2006) testaram o extrato com diferentes solventes através da técnica de microdiluição serial em placas frente a cepas padrões e cepas resistentes a antibióticos de *Staphylococcus aureus*. MELO et. al. (2002) verificaram a atividade da aroeira pelo método de difusão em Agar, contra bactérias isoladas de alveolite em ratos, sendo que a planta teve um ótimo resultado. SILVA et. al. (2010) buscaram testar o óleo essencial das folhas de aroeira frente a *Staphylococcus* spp. isolados de otite externa de caninos pelo mesmo

método anterior, neste trabalho também avaliaram a citotoxicidade em animais de laboratório através da administração intraperitoneal do óleo essencial e seguinte avaliação histológica, concluindo que o extrato possui potente ação antimicrobiana e sem evidências de toxicidade. SANTOS et al. (2007) testou a ação do extrato de aroeira com *Staphylococcus aureus*, *Peusodomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Aspergillus flavus* e *A. níger*, os resultados se mostraram positivos para as bactérias e ineficaz contra os fungos.

A falta de atividade dos óleos essenciais, nas concentrações testadas contra *E. coli* e *P. aeruginosa* pode ser justificada segundo EL--MASSRY et. al. (2009), devido a lipopolissacarídeos da membrana externa das bactérias Gram negativas, o que os tornam inerentemente resistente a agentes externos, tais como corantes hidrofílicos, antibióticos, e detergentes.

Em nossa análise de espectro de CG/MS, a identificação foi realizada através da comparação dos espectros de massas obtidos com os registros da biblioteca do aparelho. Por probabilidade foi identificado no OE das folhas principalmente os compostos α - e β -pineno, α -copaeno, cariofileno, alloaromadendreno, α -cubebeno, α -terpenol, já no OE dos frutos maduros α -pineno, α - e β -felandreno, 4-terpenol, α -cubebeno, cariofileno, β -cadineno, e no OE dos frutos verdes foi encontrado α -pineno, 4-terpenol, α -cubebeno, α -gurjuneno, β -elemen, β -cariofileno, alloaromadendreno, α -muroleno. *Schinus terebinthifolius* Raddi é conhecido como uma fonte de triterpenos, fenóis e flavonóis (LIMA et. al., 2006).

Conclusões

No presente estudo obtivemos resultados positivos referentes a ação antibacteriana das folhas e dos frutos verdes de *Schinus terebinthifolius* Raddi, que obtiveram ótimos resultados contra as bactérias Gram positivas, porém, mais estudos devem ser realizados, em concentrações maiores de óleo essencial contra bactérias Gram negativas, a fim de determinar sua ação contra esses microrganismos.

Referências bibliográficas:

- BENDAOUD, H., ROMDHANE, M., SOUCHARD, J. P., CAZAUX, S., BOUAJILA, J. Chemical Composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. 466-472, 2010.
- BRANCO-NETO, M. L. C, RIBAS-FILHO, J. M., MALAFAIA, O., OLIVEIRA-FILHO, M. A., CZECZKO, N. G., AOKI, S., CUNHA, R., FONSECA, V. R., TEIXEIRA, H. M., AGUIAR, L. R. F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em peles de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 17-22, 2006.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically: Approved Standard. M7-A6; 2005.

EL-MASSRY, K. F., EL-GHORAB, A. H., SHAABAN, H. Á., SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared

from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agrochemical and Food Chemistry**. v. 57, n.4, p. 5265-5270, 2009.

LADEIRA, S. R. L. Mastite Bovina. In: RIET-CORREA, F. A., SCHILD, A. L., LEMOS R. A. A., BORGES, J. R. J. Doenças de ruminantes e equídeos. Santa Maria: Pallotti, 2007.

LANGONI, H., PENACHIO, D. S., CITADELLA, J. C. C. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**.v 31, n.12, p. 1059-65, 2011.

LANGONI, H., SAKIYAMA, D. T. P., GUIMARÃES, F. F., MENOZZI, B. D., SILVA, R. C. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n.11, p. 881-886. 2009.

LEITE, S. R. R. F., AMORIM, M. M. R., SERENO, P. F. B., LEITE, T. N. F., FERREIRA, J. A. C., XIMENES, R. A. A. Randomized clinical Trial comparing the efficacy of the vaginal use of metronidazole with a Brazilian pepper tree (*Schinus*) extract for the treatment of bacterial vaginosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 44, n. 3, p. 245-252, 2011.

LIMA, M. R. F., LUNA, J. S., SANTOS, A. F., ANDRADE, M. C. C., SANT'ANA, A. E. G., GENET, J. P., MARQUEZ, B., NEUVILLE, L., MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v.105, n. 14, p. 137-147, 2006.

MELO, E. J. M., RAPOSO, M. J., LISBOA NETO, J. A., DINIZ, M. F. A., MARCELINO, C. A. C., SANT'ANA, A. E. G. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: microbiological and microscopic analysis. **Phytomedicine**. v. 9, n.3, p. 109-116, 2002.

OYARZABAL, M. E., SCHUCH, L. F. D., PRESTES, L. S., SCHIAVON, D. B. A., RODRIGUES, M. R. A., MELLO, J. R. B. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas em leche de bovino. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.16, n. 3, p. 260-266, 2011.

SANTOS, A. C. A., ROSSATO, M., AGOSTINI, F., SANTOS, P. L., SERAFINI, L. A., MOYNA, P., DELLACASA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Brasileira de Biociências**. v.5, n. 2, p. 1011-1013, 2007.

SILVA, A. B., SILVA, T., FRANCO, E. S., RABELO, A. S., LIMA, E. R., MOTA, R. A., DA CÂMARA, C. A. G., PONTES-FILHO, N. T., LIMA-FILHO, J. V. Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n.15, p. 158-163, 2010.