

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

PERFIL MICROBIOLÓGICO DO LEITE BOVINO DA REGIÃO NOROESTE DO RIO GRANDE DO SUL COM OS ANTIMICROBIANOS COMUMENTE UTILIZADOS NAROTINA DO LABORATÓRIO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO ¹

MICROBIOLOGICAL PROFILE OF THE BOVINE MILK OF THE NORTHWEST REGION OF RIO GRANDE DO SUL WITH THE ANTIMICROBIALS USEFULLY USED LABORATORY NAROTINE AND DETERMINATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN VIT

Bruna Carolina Ulsenheimer², Silvana Konageski Dalla Rosa³, Luciana Mori Viero⁴, Larissa Fuchs Pereira⁵, Luciane Ribeiro Viana Martins⁶

¹ Projeto de Pesquisa de iniciação científica, do curso de Medicina Veterinária, desenvolvida no Departamento de estudos agrários da Unijuí, pertencente ao Grupo de Pesquisa em saúde animal;

² Aluna do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da UNIJUI, bolsista PIBIC/UNIJUI;

³ Funcionária do Laboratório de Microbiologia Veterinária da Unijuí, Colaboradora do trabalho;

⁴ Doutora do Departamento em Estudos Agrários, Curso de Medicina Veterinária da UNIJUI, Professora colaboradora;

⁵ Aluna do curso de graduação de Medicina Veterinária da UNIJUI;

⁶ Mestre do Departamento em Estudos Agrários, Curso de Medicina Veterinária da UNIJUI, Professora Orientadora;

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma das principais doenças encontradas na bovinocultura de leite, esta é responsável por causar prejuízos econômicos à cadeia produtiva. Mastite é um processo inflamatório complexo da glândula mamária, que ocorre na maioria das vezes em resposta a infecções, onde 90% são causadas por bactérias e em menor número, por fungos, algas e vírus (TOZZETI et al., 2008).

As doenças infecciosas são uma grande ameaça à saúde humana e animal, sendo responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Por esse motivo, o uso de antimicrobianos tem sido utilizado em larga escala, acarretando uma série de problemas, principalmente a resistência microbiana (ANTUNES, 2009).

Diante desta problemática, a utilização de produtos naturais de plantas bio ativas, tem sido cada vez mais empregada com fins preventivos e curativos (SCHUCH et al 2008), sendo uma estratégia promissora e de baixo custo, no controle de infecções (SHER, 2009).

As plantas com potencialidades medicinais são capazes de produzir substâncias ativas denominadas metabólitos secundários, encontrados em quantidades diminutas, apresentando

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

composições químicas variadas e podendo exercer atividades biológicas e farmacológicas importantes (ALVES, 2005).

Os objetivos deste trabalho são, identificar os gêneros e as espécies bacterianas, e determinar, *in vitro*, o perfil de sensibilidade dos microrganismos. Bem como analisar o potencial antimicrobiano do óleo essencial extraído da flor e da folha da lavanda e do manjeriço frente á bactérias isoladas de leite mastítico, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Veterinária da UNIJUI, após o recebimento das amostras de leite mastítico de bovinos, encaminhadas por produtores e Médicos Veterinários da região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, com amostras de leite mastítico.

Cada amostra foi semeada em meio específico, ágar sangue ovino 5% e ágar McConkey e incubadas a 36°C em estufa bacteriológica por um período de 48 horas. Após este período, realizou-se a observação visual das colônias. Em seguida, sucedeu-se a confecção de esfregaços em lâminas e coloração de Gram, para a primeira identificação morfo-tintorial. A lâmina foi examinada em microscópio óptico, observando as características morfológicas do microrganismo. Então transferimos as amostras para meios contendo substâncias que evidenciam o metabolismo e a presença de enzimas, possibilitando a identificação bacteriana.

Após, foi realizado o perfil de sensibilidade antimicrobiana quanto aos antibióticos, ampicilina, cefalexina, enrofloxacina, eritromicina, gentamicina, norfloxacina, penicilina e sulfazotrim, onde alíquotas da amostra bacteriana isolada foram colocadas em placas com ágar Mueller Hinton, e espalhadas por toda sua superfície, sobre este, foram colocados os discos de antibióticos. Estas placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 36°C por 24 horas. Posteriormente, foram feitas medidas do tamanho dos halos de sensibilidade aos antibióticos, classificando-o em sensível, quando efetivo no combate a bactéria, intermediário, com ação parcial e resistente, quando não inibe o crescimento bacteriano.

Selecionamos duas plantas, a lavanda e o manjeriço, realizamos o plantio das mudas em solo de classificação latossolos, na localização -27.698361,-54.147633. Após três meses, no dia 05 de março de 2018, foi realizada a coleta das plantas, às 6:30 da manhã. Em seguida, estas foram encaminhadas para o Laboratório de Botânica da Unijuí, onde foram identificadas e catalogadas, o manjeriço, espécie *Ocimum basilicum L.*, HUIRB 7796 e a Lavanda, espécie *Lavandula dentata L.*, HUIRB 7797. Na sequência foi realizada a extração dos óleos essenciais da flor e da folha, pelo método de arraste à vapor.

Então, iniciaram-se os testes com os óleos essenciais da flor e da folha da lavanda e do manjeriço. Para avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana sobre bactérias isoladas de amostras de leite, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram utilizados 30 ml de ágar

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

müller hintom em placas de petry estéreis, onde realizou-se uma pequena perfuração no centro da superfície do ágar, de aproximadamente 6 mm.

Semeamos a bactéria *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sobre toda a superfície do ágar, no centro da placa foi colocado 20 µl do óleo essencial e colocados os discos de antibióticos em volta do óleo essencial ciprofloxacino, enrofloxacina, gentamicina, penicilina, sulfazotrim e tetraciclina, então foram mantidas em estufa bacteriológica a 36°C por 24 horas. Posteriormente, foi mensurado com régua milimetrada o tamanho dos halos de inibição do crescimento bacteriano. Esta avaliação foi realizada em triplicata, para a certificação do teste.

Foi realizada a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM). Onde foram utilizadas suspensões bacterianas de *Escherichia coli*, ajustadas a 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/ mL) em caldo BHI. Foi utilizado o óleo puro na primeira coluna, na segunda óleo diluído em 50% com a solução salina, a terceira coluna recebeu 100 µl do óleo e 900 µl de solução salina, fazendo as diluições sucessivas transferindo 100 µl para as colunas seguintes.

Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas, a 36°C. Para leitura, realizada visualmente, sendo adicionado 20 µl do corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (Vetec®). Então foram semeadas as amostras em ágar nutriente com 50 µl de cada amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 909 análises de leite realizadas neste período, constatou-se que o microrganismo mais encontrado foi o *Staphylococcus aureus* presente em 222 das amostras, em seguida aparece o *Streptococcus uberis*, em 117 das análises, e logo após a *Escherichia coli* em 101 análises, sendo estas três bactérias as mais encontradas no leite mastítico em bovinos leiteiros, na região Noroeste do RS.

Os antimicrobianos mais eficazes para as cepas bacterianas analisadas neste estudo, foram consecutivamente a enrofloxacina, gentamicina, norfloxacina, cefalexina e sulfazotrim e os antimicrobianos menos eficazes no combate das mastites foram penicilina, ampicilina e eritromicina. Por haver altos índices de resistência das bactérias encontradas em nossa região, aos antibióticos, demonstra que estas cepas estão se adaptando as condições ambientais regionais, tornando difícil o controle destes agentes microbiológicos.

O teste de sensibilidade da bactéria *Escherichia coli*, com o óleo essencial de lavanda extraído da sua flor apresentou halos de 7 mm nos três testes, já da sua folha, apresentou valores um pouco maiores com 10 mm em duas amostras e 11 mm noutra. Segundo Silveira et al., (2012) o óleo essencial de lavanda apresentou o maior espectro de ação antimicrobiana em seu estudo.

Já com relação a atividade antimicrobiana do óleo essencial do manjeriço, quanto a folha desta

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijui

planta apresentou tamanho de halos de 15 mm nos três testes, considerando a bactéria sensível à ação deste óleo essencial. A flor do manjeriço apresentou valores ainda maiores, apresentando halo de inibição de 15 mm, 16 mm e 19 mm, nas amostras avaliadas.

O perfil de sensibilidade antimicrobiana da *Pseudomonas aeruginosa*, apresentou halos de inibição menores quando comparado à *Escherichia coli*, com relação aos óleos essenciais. O óleo essencial da flor do manjeriço apresentou 7 mm no tamanho do halo de inibição nos três testes. A folha do manjeriço apresentou halos de inibição com 12 mm em duas amostras e 14 mm noutra. O óleo essencial da flor da lavanda apresentou halo de inibição de 6 mm, 7mm e 9 mm. Já o óleo da folha da lavanda apresentou halo de inibição de 6 mm numa amostra e 8 mm nas outras duas amostras avaliadas.

Os constituintes do óleo essencial de uma mesma espécie de lavanda podem variar consideravelmente dependendo da cultivar e do método de extração, e essa variação poderá determinar o valor de mercado e as possíveis aplicações do produto. Diferenças na composição química tornam alguns óleos essenciais mais efetivos contra determinadas espécies de bactérias, direcionando seu uso terapêutico (CAVANAGH e WILKINSON, 2005).

Alguns pesquisadores têm verificado que o óleo de manjeriço contém linalol e têm apresentado atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Aspergillus niger* (HUSSAIN et al., 2008).

Com relação ao CIM dos óleos essenciais sobre a *Escherichia coli*, pôde-se observar que a flor e a folha do manjeriço apresentaram o mesmo resultado, inibindo o crescimento bacteriano até a concentração de 100 µl do óleo essencial pra 900 µl de solução salina, na diluição 1:9. Já o óleo essencial da folha da lavanda apresentou inibição do crescimento bacteriano até a concentração de 50% do óleo essencial e 50% da solução salina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que as bactérias mais encontradas nas amostras de leite mastítico da região Noroeste do estado do RS são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*. Desta forma o antimicrobiano que demonstrou maior eficiência antimicrobiana foi a enrofloxacina e o que apresentou maior resistência bacteriana foi a penicilina.

Com relação à *Pseudomonas aeruginosa*, o óleo essencial que apresentou ação mais efetiva no combate ao microrganismo foi da folha do manjeriço, os demais óleos testados não apresentaram resultados significativos.

A *Escherichia coli* demonstrou-se sensível à ação do óleo essencial do manjeriço, com valores mais significativos quanto ao seu halo de inibição quando confrontado com a flor do manjeriço e após com a folha do manjeriço, não apresentou resultado importante com o óleo essencial extraído da flor e da folha da lavanda. O CIM do óleo essencial da flor e da folha do manjeriço

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

inibiu o crescimento bacteriano até a diluição de 1:9 do óleo essencial.

Com tais resultados, é possível enfatizar a grande importância de se realizar a identificação e os testes de sensibilidade aos antimicrobianos dos agentes etiológicos causadores de mastite, evitando a ampla utilização de princípios ativos de forma errônea e indiscriminada, que favorecem a aquisição de resistência bacteriana. A utilização de alternativas importantes para o combate de bactérias causadores de mastites, com a utilização de óleos essenciais extraídos de partes de plantas, como da flor e da folha, da lavanda e do manjeriço.

Sugere-se que o óleo essencial de manjeriço possa ser uma fonte de compostos com potencial terapêutico no combate a bactérias patogênicas causadoras de mastites.

Palavras-chave: Mastite; bactérias; antibióticos; óleo essencial; plantas.

Key words: Mastitis; bacteria; antibiotics; essential oil; plants.

REFERÊNCIAS

ALVES, L. F.; O laboratório da Flora Medicinal: marco no estudo das plantas medicinais Brasileiras. **Revistas Fitos**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 30-40. 2005.

ANTUNES, R. M. P. et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006. .

CAVANAGH, H.M.A.; WILKINSON, J.M. Lavender essential oil: a review. **Austr Infect Control**, v. 10, n. 1, p. 35-7, 2005.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidante and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*)essential oils depends on seasonal variations. **Food Chem.**, v. 108, p. 986-995, 2008.

SCHUCH, L.F.D. et al. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 161-169, jan./mar. 2008.

SILVEIRA, S. M., et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 471-480, 2012.

SHER, A. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. Gomal. **Journal of Medical Sciences**, v.7, n.1, p.72-79, 2009.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. Prevenção, controle e tratamento das

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijui

mastites bovinas - revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano XI, n. 10, Janeiro de 2008.