

Universidade Brasil
Campus Descalvado

ALINE ALVES REZENDE

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE COPAÍBA, BURITI
E TUCUMÃ FRENTE AO *Staphylococcus aureus***

IN VITRO EVALUATION OF ESSENTIAL OILS OF COPAÍBA, BURITI AND TUCUMÃ
IN FRONT OF *Staphylococcus aureus*

Descalvado, SP

2017

Aline Alves Rezende

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE COPAÍBA, BURITI E TUCUMÃ
FRENTE AO *Staphylococcus aureus*

Orientadora: Prof^a Dr^a. Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Co-orientador: Prof. Dr. Gabriel Maurício Peruca de Melo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Camilo Castelo Branco, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Descalvado, SP

2017

Ficha Catalográfica

R356a Rezende, Aline Alves
Avaliação in vitro de óleos essenciais de Copaíba, Buriti e Tucumã frente ao *Staphylococcus aureus* / Aline Alves Rezende. -- Descalvado, 2017.
33 f. : il. ; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientadora: Prof^a Dr^a Liandra Maria Abaker Bertipaglia
Co-orientador: Prof^o Dr. Gabriel Maurício Peruca de Melo

1. Fitoterapia. 2. Plantas Medicinais. 3. Antibiograma.
4. Compostos bioativos. I. Título.

CDD 615.321



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da UNICASTELO e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.unicastelo.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "**Avaliação *in vitro* dos óleos essenciais de capaiba, buriti e tucumã frente ao *Staphylococcus aureus***"

Autor(es):

Discente: Aline Alves Rezende

Assinatura: _____

Orientador: Profa. Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Assinatura: _____

Data: 08 de novembro de 2016



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Aline Alves Rezende

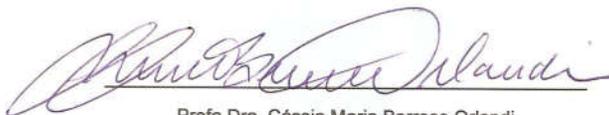
**“Avaliação *in vitro* dos óleos essenciais de capaíba, buriti e
tucumã frente ao *Sthapylococcus aureus*”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Camilo Castelo Branco, pela seguinte banca examinadora:



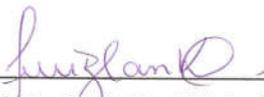
Prof. Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia (Orientador)

Programa de Pós-Graduação em Produção Animal



Prof. Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi

Programa de Pós-Graduação em Produção Animal



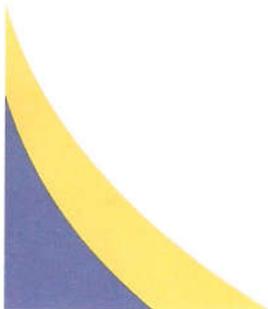
Prof. Dra. Thalita Masoti Blankenheim

UNESP-Jaboticabal

Descalvado, 08 de novembro de 2016

Prof. Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Presidente da Banca



*À Deus, meus queridos e amados pais,
irmão e sobrinhos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Por tudo que tenho, pelas oportunidades proporcionadas a mim, pela minha vida, minha família, minha saúde, por me capacitar, concedendo-me sabedoria em todos os momentos.

Aos meus pais Ailton e Roseli e ao meu irmão Rodrigo,

Por tudo o que me oportunizaram até aqui. Pelo incentivo, o apoio e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, vibrando a cada passo dado e conquista alcançada. Obrigada pelo amor de vocês sobre minha vida.

A minha orientadora Liandra,

Pelos conselhos, pela paciência (muita paciência), pela simpatia. Pelo belo exemplo profissional, pelo total apoio neste trabalho e por todo o conhecimento compartilhado. Querida professora, você é sensacional!

A professora Dora,

Por tão gentilmente ter contribuído com esse trabalho. Nobre atitude de cordialidade.

Aos Professores do Programa de Mestrado da UNICASTELO,

Por todas as contribuições dadas em disciplinas, pesquisa e banca.

A Fabiana Sobral,

Minha amiga, professora e grande incentivadora. Te agradeço pelas orientações tão valiosas, pelos conhecimentos riquíssimos compartilhados e por todo auxílio empregado a minha vida e pesquisa.

A Alexandre Rezende,

Sem seu apoio, certamente tudo seria mais difícil. Serei eternamente grata!

Aos meus familiares,

Que longe ou perto sempre me dirigiram palavras de ânimo. Obrigada por acreditarem e torcerem por minhas conquistas.

Aos meus verdadeiros amigos,

Capazes de vibrar com meu sucesso ou dar força nos momentos de tristeza e desânimo. Sem vocês as lutas seriam muito mais difíceis. Obrigada por todos os momentos!

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, estiveram envolvidos no processo de execução dessa pesquisa, conclusão do mestrado e realização desse sonho. Meus mais sinceros agradecimentos.

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE COPAÍBA, BURITI E TUCUMÃ FRENTE AO *Staphylococcus aureus*

RESUMO

As plantas medicinais estão sendo cada vez mais estudadas para o tratamento de doenças, isso a fim de minimizar os efeitos negativos trazidos pelo uso indiscriminado de antimicrobianos. As propriedades biológicas dos óleos essenciais dessas plantas têm sido amplamente exploradas, em busca de alternativas mais acessíveis e eficazes contra microrganismos multirresistentes. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii*, *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir, *Mauritia flexuosa* e *Astrocaryum vulgare*, sobre cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*. A atividade microbiana foi determinada pelo teste de sensibilidade antimicrobiana (antibiograma) e pela Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para o teste de sensibilidade antimicrobiana foi utilizado a técnica de difusão em ágar Mueller Hinton, de acordo com protocolo proposto pelo NCCLS. Já a CIM foi determinada pela atividade antimicrobiana, com base no diâmetro dos halos de inibição. Quanto aos resultados obtidos, observou-se que a concentração avaliada e suas diluições seriadas não foram capazes de promover a inibição do crescimento microbiano. No teste de sensibilidade antimicrobiana frente ao *S. aureus*, observou-se que o mesmo é sensível ao antibiótico amoxicilina, porém em nenhum dos óleos testados obtivemos resultado satisfatório nas concentrações utilizadas. Conclui-se que óleos essenciais de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e buriti (*Mauritia flexuosa*) e Tucumã, não apresentam capacidade para controlar o crescimento do *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: fitoterapia, plantas medicinais, antibiograma, compostos bioativos.

IN VITRO EVALUATION OF ESSENTIAL OILS OF COPAÍBA, BURITI AND TUCUMÁN IN FRONT OF *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Medicinal plants are increasingly being studied for the treatment of diseases, this in order to minimize the negative effects brought by the indiscriminate use of antibiotics. The biological properties of the essential oils of these plants have been widely explored in search of more affordable and effective alternatives against multiresistant microorganisms. This study aimed to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of essential oils of *Copaifera langsdorffii*, *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir, *Mauritia flexuosa* and *Astrocaryum vulgare* on bacterial strain of *Staphylococcus aureus*. Microbial activity was determined by antimicrobial susceptibility testing (antibiogram) and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). For antimicrobial susceptibility testing was used diffusion technique in Mueller Hinton agar, according to the protocol proposed by the NCCLS. Since the MIC for antimicrobial activity was determined based on the diameter of the inhibition zones. As the results, it was observed that the measured concentration and its serial dilutions were unable to promote inhibition of microbial growth. In the antimicrobial susceptibility testing against *S. aureus* has been observed that it is sensitive to the antibiotic amoxicillin, but in none of the tested oils have obtained satisfactory results at the concentrations used. It follows that essential oils copaíba (*Copaifera langsdorffii*) and buriti (*Mauritia flexuosa*) and Tucumán, have no ability to control the growth of *Staphylococcus aureus*.

Keywords: herbal, medicinal plants, antibiogram, bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Avaliação do antibiograma com o antimicrobiano Amoxicilina (30 µg)
.....22
- Figura 2:** Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de Copaíba, avaliado pelo halo de crescimento da cultura do *Staphylococcus aureus*.....23
- Figura 3:** Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de Buriti, avaliado pelo halo de crescimento da cultura do *Staphylococcus aureus*.....24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da avaliação do teste de sensibilidade ao antibiótico de uso comum na terapia humana e veterinária, segundo NCCLS (2000)21

Tabela 2: Resultados da avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) dos tratamentos avaliados pela média aritmética em halo (mm).....22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC.....	Amoxilina
ATCC.....	American Type Culture Collection
BHA.....	BHI + Ágar
BHI.....	Infuso de Cérebro e Coração
CIM.....	Concentração Inibitória Mínima
CBM.....	Concentração Bactericida Mínima
Kg.....	Kilogramas
Km.....	Kilometros
mg.....	Miligramas
ml.....	Mililitros
MH.....	Mueller Hinton
mm.....	Milímetros
NaCl.....	Cloreto de Sódio
Ph.....	Potencial hidrogeniônico
RO.....	Rondônia
SP.....	São Paulo
UV.....	Radiação Ultravioleta
µL.....	Micro litro
µg.....	Micrograma
h.....	horas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Relevância do tema	14
1.1.2. Copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>).....	15
1.1.3. Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>).....	15
1.1.4. Tucumã (<i>Astrocaryum vulgare</i>)	16
1.1.5. <i>Staphylococcus aureus</i> , agente etiológico da mastite subclínica	16
1.2. Hipótese.....	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1. Local do experimento.....	18
2.2. Formulação dos tratamentos	18
2.3. Exame microbiológico	18
2.3.1. Microrganismo utilizado.....	18
2.3.2. Teste de sensibilidade antimicrobiana (antibiograma)	19
2.3.3. Teste da concentração inibitória mínima.....	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4. CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
RESENHA BIOGRÁFICA DA AUTORA	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. Relevância do tema

O consumo e aplicação de plantas no tratamento e cura de doenças é utilizado desde civilizações antigas. Apesar de nem sempre terem seus componentes químicos conhecidos, as observações populares produzem divulgação dos seus benefícios terapêuticos, relatados frente aos seus efeitos medicinais produzidos [1].

Acredita-se que no Brasil existam cerca de 50.000 espécies de plantas superiores, que produzem madeira, celulose, fibras, alimentos, óleos vegetais e óleos essenciais. Com aproximadamente quatro milhões de Km², a floresta Amazônica teria 30.000 espécies de plantas, desse total, cerca de um terço dessas plantas são medicinais e/ou aromáticas e aproximadamente 70% destas sejam utilizadas como medicamentos pela população local. Porém sabe-se que apenas uma pequena quantidade dessas espécies vegetais foi estudada e avaliada quanto às suas propriedades medicinais [2].

Os óleos essenciais são oriundos do metabolismo secundário das plantas e esses possuem composição química complexa, podemos destacar a presença de terpenos e fenilpropanóides. Estes constituem elementos voláteis presentes em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com funções necessárias à sobrevivência [3]. Os compostos voláteis sintetizados e emitidos pelas plantas têm como finalidade defender ou atrair os polinizadores. Para isso, os óleos essenciais podem ser considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas, principalmente contra microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras [4].

Alguns estudos enfocam a composição dessas substâncias descrevendo a existências de diferenças na composição química entre óleos de espécies distintas ou variedades. A atividade antimicrobiana e a composição estão diretamente ligadas às: propriedades geneticamente determinadas, idade da planta, disponibilidade hídrica, temperatura do ambiente, sazonalidade, local onde a planta se desenvolveu, altitude, nutrientes disponíveis no solo e radiação UV [5].

1.1.2. Copaíba (*Copaifera langsdorffii*)

A *Copaifera langsdorffii*, popularmente conhecida como Copaíba, pertence ao gênero *Copaifera* e à subfamília *Caesalpinoideae*. Gênero esse que apresenta 16 espécies presentes no Brasil, apresentando quatro espécies na região Norte, onde o óleo é amplamente comercializado e utilizado na medicina popular [6].

A Copaíba é uma importante planta utilizada na medicina tradicional, para inúmeras finalidades. Estudos revelam que na composição do óleo de Copaíba encontra-se o beta-cariofileno, este apresenta princípio ativo que tem ação germicida. Na literatura, foi comprovada recentemente, uma significativa redução da formação de placa dental em cães que receberam óleo de Copaíba tratados três vezes ao dia, durante oito dias, com a solução apropriada, aplicada topicamente com o auxílio de pinça hemostática e gaze. Também foram realizados testes *in vitro* avaliando a atividade antimicrobiana do óleo de Copaíba sobre bactérias *Streptococcus pyogenes*, causadora de inflamação de garganta em seres humanos, obtendo resultados satisfatórios na inibição deste microrganismo [7] [8].

O estudo realizado por Mendonça [9], demonstrou uma relação ao efeito antimicrobiano da óleo-resina de Copaíba, com Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) de 0,164mg/mL e Concentração Bactericida Mínima de CBM₉₀ de 1,31mg/mL. O mesmo foi capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

1.1.3. Buriti (*Mauritia flexuosa*)

Mauritia flexuosa, conhecida como Buriti, é uma palmeira, que ocupa regiões alagadas e úmidas. O óleo extraído da polpa dos frutos de Buriti causa interesse devido à sua composição, rico em carotenóides, ácidos graxos e tocoferol podendo ser utilizado na indústria terapêutica e cosmética. Estudos mostram resultados positivos quanto ao poder cicatrizante e antimicrobiano em feridas realizadas em ratos[10].

De acordo com Bezerra [11], a composição química do óleo essencial da casca de *Mauritia flexuosa* vêm sendo muito estudada nos últimos anos, isso acarreta um destaque à espécie a partir de avanços do conhecimento químico-farmacológico. Observou-se uma abundância de taninos e flavonóides detectados em seu extrato que são possíveis responsáveis pela atividade antimicrobiana apresentada pela planta.

1.1.4. Tucumã (*Astrocaryum vulgare*)

O Tucumã é um fruto típico da região Amazônica, pertence à família *Arecaceae*. Apresenta formato elipsóide e coloração alaranjada, é rico em compostos bioativos e sua composição química pode ser caracterizada por carotenoides (125,7µg/mg), fitoesterol (152,6 µg/mg) e tocoferol (6,8µg/mg). Possui elevado teor de lipídios, carotenos, tocoferol e fibras, o que atribui elevado valor nutricional e energético [12,13].

1.1.5. *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* possui forma de cocos Gram-positivos, isolados ou agrupados em cachos. São anaeróbios facultativos, não formadores de esporos. Suas colônias podem variar do amarelo-ouro ao acinzentado e têm formas circulares, lisas elevadas e brilhantes. Apresenta-se subdividido em 40 espécies, sendo a *S. aureus* considerada a mais importante em função da sua maior patogenicidade [14,15].

Sabe-se que o *S. aureus* é relatado como o patógeno mais frequentemente isolado em casos de mastite subclínica. Seu tratamento torna-se difícil devido à elevada resistência aos antibióticos, e isso vem acarretando grande perda econômica na produção do leite [16,17].

A mastite é caracterizada por um processo infeccioso, onde o *S. aureus* se aloja principalmente nos quartos mamários, na pele do úbere e nos tetos. Tais infecções causam grande preocupação, tornando-se até um problema de saúde pública, isso devido a produção de toxinas, uma vez que a contaminação por enterotoxinas termoestáveis podem ser encontradas mesmo

em leite pasteurizado, causando distúrbios como o desencadeamento de alergias em indivíduos propensos a sensibilidade, efeitos tóxicos e carcinogênicos, acarretado por alterações no equilíbrio da microbiota intestinal e também pela seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores [18-21].

Segundo Zafalon [22], programas de controle de mastites por meio da antibioticoterapia realizadas durante a lactação, tem como finalidade a diminuição da duração das infecções intramamárias, que podem ser viáveis economicamente, uma vez que a qualidade do leite é um componente significativo.

1.2. Hipótese

Os óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii*, *Mauritia flexuosa* e *Astrocaryum vulgare* são eficazes em inibir o crescimento do *Staphylococcus aureus*, em mínimas concentrações inibitórias.

1.3. Objetivos Geral e Específico

O presente estudo teve como objetivo estudar a potencialidade dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii*, *Mauritia flexuosa* e *Astrocaryum vulgare* no controle de crescimento do *Staphylococcus aureus*.

De maneira específica, objetivou-se:

- I. Determinar o teste antimicrobiano pela metodologia da difusão em placas;
- II. Determinar a CIM dos óleos essenciais frente ao *Staphylococcus aureus*;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário do Centro Universitário Luterano do Brasil, Ji-Paraná/RO. A instituição disponibilizou todos equipamentos e materiais utilizados nessa pesquisa.

2.2. Formulação dos tratamentos

Os óleos essenciais utilizados foram adquiridos em farmácias de manipulação e suas especificações foram apresentadas pelo fornecedor:

- 1) Copaíba (*Copaifera langsdorffii*) - Óleo 100% puro. Seiva processada por filtração.
- 2) Buriti (*Mauritia flexuosa*) - Óleo 100% puro. Extraído mediante prensagem a frio da polpa do fruto e posterior filtração.
- 3) Tucumã (*Astrocaryum vulgare*) - Óleo 100% puro. Extraído mediante prensagem a frio da polpa do fruto e posterior filtração.

Os óleos essenciais foram manipulados de uma solução composta de uma parte de óleo essencial e uma parte de éter etílico, foram testados outros diluentes como: álcool etílico e clorofórmio, porém não obtivemos uma solução homogênea. Desta solução, óleo essencial e éter etílico, foram elaboradas soluções seriadas 1:2; 1:4; 1:8, 1:16 e 1:32.

2.3. Exame microbiológico

2.3.1. Microrganismo utilizado

Cepa de *Staphylococcus aureus* usada foi a linhagem CCCD S003 CEFAR Diagnóstica – Brasil, que foi submetida aos testes de resistência e

sensibilidade ao antimicrobiano de uso comum (Amoxicilina 30 µg) e às soluções antimicrobianas dos óleos vegetais.

A cepa mantida congelada a -18°C em caldo Brain-Heart-Infusion (BHI) com Glicerol. A recuperação das cepas foi realizada em Agar Nutriente com incubação por 24 horas a 37°C. Após este período foram transferidas duas alçadas da cultura em BHA (BHI + ágar) para solução salina estéril (NaCl 0,85%), até a turvação compatível com o grau 0,5 da escala de Mac Farland. Em seguida, com auxílio de *swab* estéril, as culturas foram inoculadas de forma homogênea em placas Ágar Muller-Hilton (MH).

2.3.2. Teste de sensibilidade antimicrobiana (antibiograma)

O teste comparativo com o antibiótico para avaliar a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos isolados foram realizados utilizando-se a técnica de difusão em ágar Mueller Hinton segundo Quinnet al, [23] de acordo com protocolo proposto pelo NCCLS [24].

Para tanto, o ágar foi preparado de acordo com as indicações do fabricante, ajustando-se o pH (7,2 – 7,4); em cada placa de 150 mm, foi distribuído 50 a 60 mL do meio de incubação para que este apresentasse espessura homogênea de três a quatro milímetros.

O método da difusão em disco de papel foi realizado após a ativação do *S. aureus*. Posteriormente foi semeado em placas com ágar Mueller Hinton com auxílio de um *swab* estéril. A inoculação foi feita em forma de estrias na superfície do ágar em três direções, girando a placa em ângulo de 60° após cada estria. A seguir, sobre a superfície semeada, foram colocados com o auxílio de uma pinça estéril os discos de papel filtro estéreis (previamente cortados no diâmetro padrão de seis milímetros e esterilizados em estufa a 180°C por duas horas) impregnados com os óleos (ficaram no dissecador por 24 horas após serem embebecidos com os óleos). As placas foram incubadas a 36°C por 48 horas. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas três repetições, em milímetros (mm) usando um paquímetro, que foi encostado na parte de trás da placa de petri invertida.

2.3.3. Teste da concentração inibitória mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela atividade antimicrobiana, com base no diâmetro dos halos de inibição, sendo este superior a 11 mm; as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por um período de 24 horas [25].

A determinação da CIM foi feita pelo método da diluição seriada utilizando discos de papel dos óleos essenciais em ágar Mueller-Hinton. Os óleos foram diluídos em éter etílico na proporção de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8, 1:16 e 1:32 para a determinação da atividade antimicrobiana das plantas testadas (óleos) e, para o controle negativo, foi água destilada. Como controle positivo, foi utilizado o disco com o antimicrobiano Amoxicilina (AMC) (30 µg).

A suspensão-inóculo foi preparada em solução salina (NaCl para concentração de 0,85%), a partir de culturas de 18-20 horas em ágar sangue, e a turbidez da suspensão padronizada com o tubo 0,5 da escala de MacFarland. As placas foram inoculadas com alças descartáveis, calibradas de 1µL, dentro de 30 minutos de preparo do inóculo.

A sensibilidade da amostra ao crescimento microbiano foi considerada para medidas superiores a 11 mm do diâmetro de halo formado [25].

2.3.4 Análise dos dados

Para a (CMI), a análise foi do tipo descritiva, com os seguintes parâmetros: resistente, intermediário, sensível e não avaliado.

Os diâmetros dos halos de inibição de crescimento obtidos foram registrados e interpretados de acordo com os padrões estabelecidos pelo NCCLS [26].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para comparar o potencial antimicrobiano entre os óleos essenciais de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), buriti (*Mauritia flexuosa*) e tucumã (*Astrocaryum vulgare*), foram avaliados os efeitos inibitórios destes frente à cultura de *S. aureus* onde halos de inibição bacteriana foram medidos.

Na Tabela 1, pode ser observado o resultado do teste de sensibilidade do *S. aureus* ao antimicrobiano Amoxicilina (AMC) 30 µg. Nota-se que a cepa avaliada apresentou comportamento sensível ao antimicrobiano AMC, segundo NCCLS [26].

Tabela 1: Resultados da avaliação do teste de sensibilidade ao antibiótico de uso comum na terapia humana e veterinária, segundo NCCLS (2000).

Antibiótico (µg)	<i>S. aureus</i> Halo (mm)	Perfil
Amoxicilina (30)	16,5	S
Água	0	R

Legenda: S – Sensível, R - Resistente

Ao ser comparado com os halos formados pelos óleos essenciais avaliados, conforme mostra a Tabela 2, o antimicrobiano Amoxicilina (AMC) 30 µg apresentou efeito inibitório sobre a cultura do *S. aureus* (Figura 1), o que não ocorreu com os óleos essenciais. Ressalta-se na Figura 1 que o controle negativo (água) o crescimento da cultura na placa.



Figura 1: Avaliação do antibiograma com Amoxicilina (30 µg), controle positivo e com água, controle negativo.

Langoni et al. [27], observaram índice de cura de 71,4% para mastite subclínica e 66,7% para mastite clínica em função da presença da *Staphylococcus aureus*, quando realizado o tratamento intramamário de casos de mastites bovinas, com a amoxicilina (62,5 mg). Freitas et al, [21], relataram que os estafilococos mostram elevada resistência a AMC, sendo que observaram menores frequências de sensibilidade para amoxicilina (25%) e penicilina (20%).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), buriti (*Mauritia flexuosa*) e tucumã (*Astrocaryum vulgare*), em relação às concentrações avaliadas (soluções seriadas) no presente estudo, estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados da avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) dos tratamentos avaliados pela média aritmética em halo.

Óleos Essenciais	Diluições					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Copaíba	8,0mm	9,0mm	9,0mm	4,0mm	2,0mm	0,0mm
Buriti	5,0mm	3,0mm	0,0mm	0,0mm	0,0mm	0,0mm
Tucumã	*	*	*	*	*	*

* dados não avaliados.

O óleo de copaíba apresentou halo de inibição inferior aos 11 mm (Figura 2) associado ao comportamento de sensibilidade [26]. Nas diluições 1:1, 1:2 e 1:4, o óleo copaíba, apresentou halo de inibição de 8,0; 9,0 e 9,0 mm, respectivamente. Nas diluições 1:8, 1:16 e 1:32, o halo formado foi diminuindo até zero na maior diluição, podendo-se inferir que os resultados demonstram maior potencial de inibição.

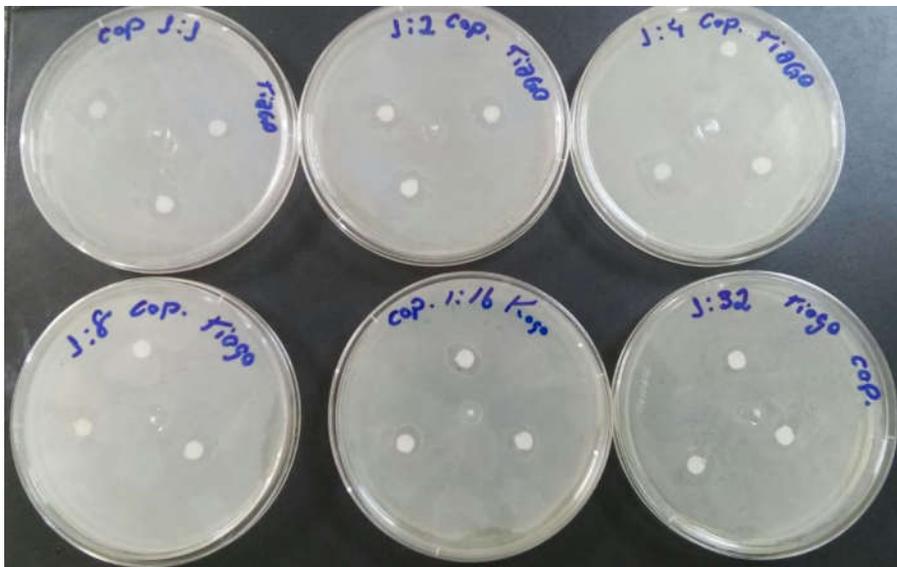


Figura 2: Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de copaíba, avaliado pelo halo de crescimento da cultura do *Staphylococcus aureus*.

A atividade biológica dos óleos resina de copaíba tem sido atribuída aos sesquiterpenos e diterpenos. Estudos têm demonstrado que os efeitos antimicrobianos encontrados na oleorresina de copaíba têm sido capazes de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* [10].

Dentre as pesquisas voltadas ao tratamento fitoterápico da mastite com a copaíba, pode-se citar o estudo realizado por Braga e Silva [29], que avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato da folha da *Copaifera langsdorffii* sobre as bactérias *S. aureus*, neste experimento foram avaliadas três concentrações do extrato em 0,2; 0,1; 0,05 g/mL pelo método de difusão em disco. Outro trabalho de pesquisa PIERI et al,[7], que avaliou o efeito antimicrobiano de óleo de dois tipos copaíba (*Copaifera langsdorffii* e a *Copaifera officinalis*) mediu-se os halos de inibição do crescimento da cultura

com os discos embebidos com os óleos. Constatou-se resultados satisfatórios, ou seja, ambos os óleos de copaíba tiveram ação antibacteriana sobre os *S. aureus*.

Quanto ao óleo essencial do buriti, observou-se halos de inibição do crescimento da cultura de *S. aureus* de cinco milímetros e três milímetros nas diluições 1:1 e 1:3, respectivamente, sendo ambas inferiores ao que se caracteriza como sensível ao crescimento microbiano, que é de 11 mm [26], ou seja, a cultura foi resistente ao efeito antimicrobiano do óleo de buriti (Figura 3).

Por outro lado, contrário aos resultados obtidos no presente estudo, Batista [10] verificou a efetividade do óleo essencial de buriti em reduzir a contagem de *Staphylococcus aureus* em ensaio de atividade antimicrobiana *in vitro*. Baseado no diâmetro dos halos de inibição pode-se constatar que na metodologia empregada o *S. aureus* apresentou sensibilidade inibitória satisfatória.

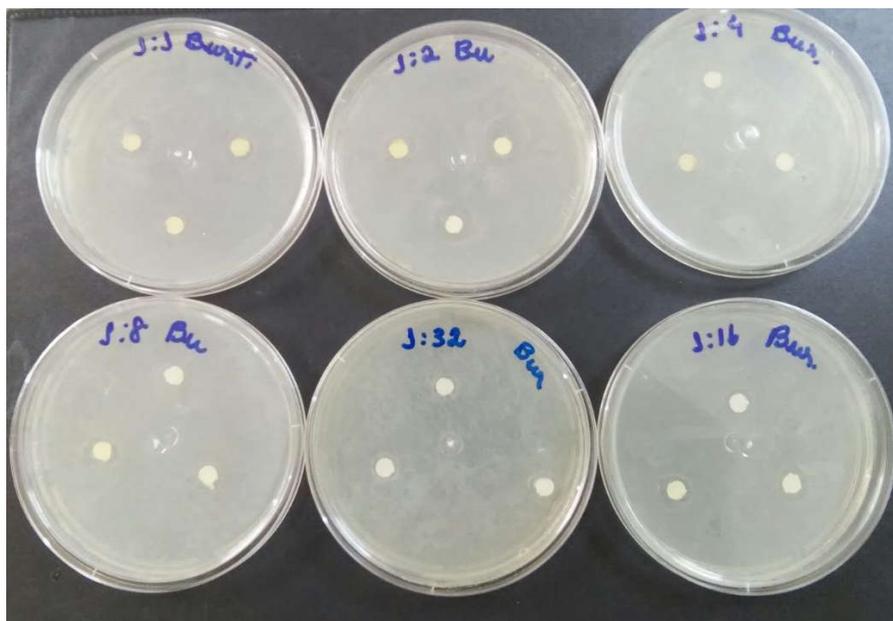


Figura 3: Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de buriti, avaliado pelo halo de crescimento da cultura do *Staphylococcus aureus*.

Silveira et al, [30] avaliaram partições de frutos de buriti, em hexano e em acetato de etila do mesocarpo/endocarpo. Observaram que foram

altamente inibitórias para *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, mas não foram capazes de inibir significativamente a cepa de *E. coli*. O extrato etanólico bruto do epicarpo/mesocarpo de *M. vinifera* inibiu significativamente apenas as cepas Gram negativas, pois, segundo os autores, o que pode ser devido, principalmente, aos constituintes da partição em acetato de etila do epicarpo/mesocarpo. As partições lipofílicas do epicarpo/mesocarpo e do mesocarpo/endocarpo de *M. vinifera* foram as mais inibitórias para a cepa de *S. aureus* e são explicadas pelos ácidos graxos presentes, principalmente, nos extratos lipofílicos que podem ser os responsáveis pela atividade antimicrobiana encontrada nessa planta.

Esses dados sugerem que os métodos de extração e os diferentes componentes da árvore têm sensibilidade diferentes.

Marangon et al, [31], avaliaram atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Copaíba e de Buriti. Observaram que o óleo de copaíba mostrou atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus* com uma CIM de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e comportamento bacteriostático. O óleo de buriti, por sua vez, não apresentou atividade até $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Soares [32], ao avaliar a (CIM) dos sabonetes líquidos com Óleo de baru, buriti e pequi, o microrganismo que apresentou maior resistência, independentemente da formulação, foi a *P. aeruginosa*, apresentando sensibilidade na concentração de $1290,1 \mu\text{g/mL}$ para o sabonete líquido de óleo de baru, $1250,0 \mu\text{g/mL}$ para o sabonete líquido de óleo de buriti e $1350,3 \mu\text{g/mL}$ para o sabonete líquido de óleo de pequi. Comparando com o sabonete líquido padrão ($3000, \mu\text{g/mL}$), o *P. aeruginosa* demonstrou ser a bactéria mais resistente à atividade dos Óleos de baru, buriti e pequi, presente no sabonete líquido.

Os valores de CIM descritos na literatura são heterogêneos, indicando que os diferentes perfis de sensibilidade estão relacionados com as variações nas características químicas, características do solo, região e sazonalidade que afetam a atividade biológica dos óleos.

Quanto aos resultados para o óleo essencial de tucumã, estes não puderam ser obtidos pela dificuldade da sua manipulação. O referido óleo, que é muito espesso e dificilmente diluído, não pode ser embebido nos discos da análise.

Os métodos analíticos usados sobre atividade antimicrobiana podem sofrer interferência de vários fatores como condições de cultivo, meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados Rios e Recio [33], torna-se, desta forma, necessária a utilização de outros testes quantitativos para a confirmação dos resultados sobre a atividade antimicrobiana.

4. CONCLUSÃO

Nas condições do experimento pode-se concluir que os óleos essenciais de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e buriti (*Mauritia flexuosa*), não apresentam potencialidade para controlar o crescimento do *Staphylococcus aureus*.

No teste antimicrobiano pela metodologia da difusão em placas o antimicrobiano usado como padrão Amoxicilina mostrou-se eficiente no controle do crescimento do *S. aureus*, o que não ocorreu com os óleos essenciais de copaíba e buriti.

Na avaliação da (CIM) dos óleos essenciais frente ao *Staphylococcus aureus*, nenhuma das diluições avaliadas controlam o crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MACIEL M. A. M., PINTO A. C., VEIGA JR V. F., GRYNBERG N. F., ECHEVARRIA A. Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. *Quimica Nova*, v.25, p. 429 – 438, 2002.
2. GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C. B.V.; CAVALHEIRO, M. V. S; SANTOS. R. R.; TOMASINI, T. *Fitoterápicos*. Campinas: André Tosello, v.17, 1996.
3. SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.16, p.38-43, 2000.
4. KELSEY, R. G.; REYNOLDS, G.W.; RODRIGUEZ, E. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In: RODRIGUEZ, E.; HEALEY, P.L.; METHA, I. (Eds.). *Biology and chemistry of plant trichomes*. New York: Plenum, p.187-241, 1984.
5. GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundários. *Química Nova*, v.30, p. 374-81, 2007.
6. DEUS, R. J. A.; CARVALHO, A.S.C.; BANNA, D.A.D.S.; ARRUDA, M.S.P.; ALVES, C.N.; SANTOS, A.S.; Efeito fungitóxico *in vitro* do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.11, n.3, p.347-353, 2009.
7. PIERI, F. A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S.; Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.11, n.4, p.465-472, 2009.
8. BLOISE M. I. Óleos vegetais e especialidades da floresta Amazônica. *Cosmetics & Toiletries* v. 15, p. 46-49, 2003.

9. MENDONÇA D. E.; ONOFRE S. B.; Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy. v.19, n. 2B, p577-581, Abr./Jun. 2009.
10. BATISTA, J. S.; OLINDA, R. G.; MEDEIROS, V. B.; RODRIGUES C. M. F. R.; OLIVEIRA, A. F.; PAIVA, E. S.; FREITAS, C. I. A.; MEDEIROS, A. C.; Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. Ciência Rural, Santa Maria, v.42, n.1, p.136-141, jan, 2012
11. BEZERRA, D. A. C.; PEREIRA, A.V.; LÔBO, K.M.S.;RODRIGUES, O.G.; ATHAYDE, A.C.R.; MOTA, R.A.; MEDEIROS, E.S.; RODRIGUES, S.C.. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 19, n. 4, p. 814-817, 2009.
12. FERREIRA, E. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL A. S.; SILVEIRA C. S.; Caracterização Físico-Química Do Fruto E Do Óleo Extraído De Tucumã (*Astrocaryum Vulgare* Mart)*. Alim. Nutr., Araraquara v.19, n.4, p. 427-433, out./dez. 2008.
13. BONY E. 2012
14. VON EIFF, C.; BECKER, K.; MACHKA, K.; STAMMER, H.; PETERS, G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. The New England Journal of Medicine, v. 344, n.1, p. 11-6, 2001.
15. CASSETARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? Brazilian Journal of Infectious Diseases, Salvador, v. 9, n. 1, p. 70-76, Feb. 2005.

16. FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F.; Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em paúde pública. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.4, p.1315-1320, jul-ago, 2004.
17. FERREIRA, L. M. et al. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em Casos de mastite subclínica bovina. *Cienc. Rural* [online], vol.36, n.4, p. 1.228-1.234. 2006
18. LANGONI, H., PENACHIO, D. DA S., CITADELLA, JULIANA C.C., LAURINO F., MARTINS, P. Y. F., LUCHEIS, S. B., MENOZZI, B. D. E SILVA A. V. DA. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino *Pesq. Vet. Bras.* 31(12):1059-1065, dezembro 2011.
19. FONTANA, V. L. D. S.; GIANNINI, M. J. S. M.; LEITE, C. Q. F.; MIRANDA, E. T.; ALMEIDA, A. M. F.; FONTANA, C. A. P.; SOUZA, C. M.; STELLA, A. E. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da Beta-lactamase em *Staphylococcus aureus*. *Veterinária e Zootecnia*, Botucatu, v. 7, n. 4, p. 552-559, 2010.
20. DRESCHER G., MATTIELLO S. P., PEIXOTO R. DE M., VARGAS A. C. DE, et. al. Caracterização Bioquímica e Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos de Agentes Bacterianos Isolados de Mastite Subclínica Ovina na Região Oeste de Santa Catarina. *Ciência Animal Brasileira*, *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, n. 1, 2010.
21. FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, A. S. S.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R. A.; Perfil De Sensibilidade Antimicrobiana *In Vitro* De *Staphylococcus* Coagulase Positivos Isolados De Leite De Vacas Com Mastite No Agreste Do Estado De Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, abr./jun., 2005.

22. ZAFALON L.F., NADER FILHO A., OLIVEIRA J.V., RESENDE F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.59, n.3, p.577-585, 2007.
23. SILVA N., JUNQUEIRA V.C.A. & SILVEIRA N.F.A.. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. Varela, São Paulo, p. 295, 1997.
24. MACFADDIN J.F.. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. Williams and Wilkins, Baltimore. p. 527, 1980
25. QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Ed. Artmed, 1994.
26. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 5th ed. NCCLS document M7-A5. 2000.
27. LANGONI, H.; ARAÚJO, W. N. DE, SILVA A.V. DA, SOUZA, L.C. de Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacin bem como com a sua associação. Arquivos do Instituto Biológico, v.67, n.2, p.177-180, jul./dez., 2000.
28. CATÃO, R. M. R. et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" do extrato etanólico de *Punica granatum* Linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. Revista Brasileira de Análises Clínicas, v. 38 n. 2, p. 111-114, 2006.
29. BRAGA, M. D; SILVA C. C. M. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Copaifera langsdorffii* Desf. sobre *Staphylococcus aureus*. Unimontes científica. Montes Claros MG, v. 9, 2007.

30. SILVEIRA, C.S.; PESSANHA, C.M.; LOURENÇO, M.C.S.; NEVES JUNIOR, I.; MENEZES, F.S.; KAPLAN, M.A.C. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinífera*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 2, p. 143-148, Abr./Jun. 2005.
31. MARANGON, C. A.; LEITE, P. M. F.; RODRIGUES, M. A. V.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G.; NITSCHKE, M. Influência dos óleos de copaíba e buriti em emulsões de quitosana/gelatina sobre *Staphylococcus aureus*. In: *Anais. Foz do Iguaçu*, 2016.
32. SOARES, N. R. Sabonetes líquidos de frutos do Cerrado, atividade antimicrobiana e qualidade físico-química. In: *Avaliação da atividade antimicrobiana e caracterização de sabonete líquido a base de óleo de baru, buriti e pequi*. Cap. 4, p.50-67. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Goiás, GO.
33. RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* v. 100, p. 80-84. 2005.

RESENHA BIOGRÁFICA DA AUTORA

ALINE ALVES REZENDE – Graduada em Biomedicina no ano de 2013 pela Centro Universitário Luterano do Brasil de Ji-Paraná/ RO. Mestrado profissional em andamento em Produção Animal pela Universidade Camilo Castelo Branco, UNICASTELO.

Atualmente é Coordenadora do curso de Biomedicina – Faculdade São Paulo em Rolim de Moura/RO. Tem experiência de 2 anos como coordenadora de laboratórios onde foi contratada pelo Centro Universitário Luterano do Brasil de Ji-Paraná/ RO, de 2014 a 2016.