

# Sensibilidade de cepas *Staphylococcus aureus* resistentes a beta-lactâmicos ao óleo essencial de Alecrim-pimenta

SAMUEL FERREIRA GONÇALVES<sup>1</sup>, YHAGO PATRYCKY ANTUNES SOUZA ASSIS<sup>2</sup>, KEICY SANDY SILVESTRE DE SOUZA<sup>3</sup>, GEOVANA SAMARA ANDRADE AGUIAR<sup>4</sup>, MICHELLY OLIVEIRA GUIMARÃES<sup>5</sup>, AGDA CAROLINE SILVA PENNA<sup>6</sup>, ALCINEI MISTICO AZEVEDO<sup>7</sup>, ALESSANDRA REJANE ERICSSON DE OLIVEIRA XAVIER<sup>8</sup>

1 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

3 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

4 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

5 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

6 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

7 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

8 - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

**RESUMO** - A pecuária leiteira atualmente é um dos setores que apresentam crescimento contínuo gerando alta rentabilidade ao país, porém hoje a mesma se encontra com dificuldades, uma vez que doenças podem acometer o rebanho tais como a mastite. A mastite se caracteriza pela inflamação da glândula mamária trazendo consigo a queda da produção do animal, além da aplicação sucessiva de antibióticos pode ser um dos fatores a causar multirresistência e não conseguindo sanar a doença. Atualmente estuda-se a utilização de óleos essenciais, como o alecrim pimenta, sendo isto como solução alternativa para o combate de microrganismos multirresistentes, utilizou-se quatorze cepas de *Staphylococcus aureus* frente ao teste de disco-difusão com concentrações diferentes do óleo, sendo estas concentrações 0µl, 30µl, 60µl, 120µl e 240 µl. O óleo de alecrim-pimenta apresentou baixa atividade frente as cepas isoladas sendo a concentração de 240 µl a mais eficiente, a eficiência do óleo foi variável de acordo a cada grupo genético analisado.

Palavras-chave: *Lippia sidoides* Cham, Multirresistente, *Staphylococcus aureus*.



# Sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains resistant to beta-lactams to the essential oil of rosemary pepper

**ABSTRACT** - In present days, dairy farming is one of the sectors that shows continuous growth generating high profitability to the country, but it has difficulties, since the herd can be affected by diseases such as mastitis. Mastitis is characterized by the inflammation of the mammary gland causing the fall of animal's production, and the successive application of antibiotics can be an important reason for multiresistance's increase and most of times it can't cure the disease. Studies have started to find alternative solutions for the control of multiresistant microorganisms and the use of essential oils have obtained recognition, highlighting oil of rosemary pepper, fourteen *Staphylococcus aureus* strains were used in the disc diffusion test with different concentrations of the oil – 0µl, 30µl, 60µl, 120µl and 240µl. The pepper-rosemary oil presented low activity against the isolated strains, being the 240 µl concentration more efficient, the oil efficiency was variable according to each genetic group analyzed.

Keywords: *Lippia sidoides* Cham, Multiresistant, *Staphylococcus aureus*.

---

## Introdução

A bovinocultura de leite atualmente é um dos principais setores da agropecuária que proporciona maior rentabilidade ao Brasil, destacando-se então como um dos mais produtores de leite e derivados em escala mundial (GIRARDINI, 2013). A produção é prejudicada quando o animal é acometido pela mastite, doença que leva a inflamação da glândula mamária e a queda de produção do rebanho (MEDONÇA, 2012). O principal gênero causador da mastite encontra-se o *Staphylococcus* spp., em muitos casos este gênero possui multirresistência aos beta-lactâmicos indicados para o controle e combate da doença quando os principais sinais clínicos aparecerem no animal (COELHO *et al.*, 2009). Atualmente existem alternativas viáveis para o combate da mastite e respectivamente dos microrganismos multirresistentes causadores, tais como a utilização de óleos essenciais a partir de plantas medicinais para a sua fabricação. Os óleos essenciais podem ser obtidos a partir da extração da folha, estes óleos podem conter diversas propriedades químicas tais como o monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides que são substâncias de baixo peso molecular porém estas substâncias podem ter alta atividade antimicrobiana (CRAVEIRO e QUEIROZ, 1992). O presente trabalho tem como objetivo foi avaliar a utilização do óleo de alecrim-pimenta frente a bactérias multirresistentes do gênero *Staphylococcus aureus* provindas de vacas com mastite clínica de rebanhos do norte de Minas Gerais.

---

## Revisão Bibliográfica

Um dos grandes prejuízos relacionados a atividade leiteira é a mastite, uma doença com processo inflamatório na glândula mamária causado principalmente por bactérias do gênero *Staphylococcus* comumente caracterizados como causadoras de doenças purulentas e infecções alimentares devido a produção de enterotoxinas (OME *et al.*, 2002; FREITAS *et al.*, 2005). Apesar das diversas perdas econômicas e redução da produção leiteira a mastite também considerada um problema de saúde pública. Além dos programas sanitários voltados para o controle da redução mastite, a utilização de antibióticos é considerada um método importante na eliminação de fontes de infecção, .

uso incorreto dessas bases no tratamento da mastite pode gerar o surgimento de cepas resistentes ( BARBERIO *et al.*, 2002). A multirresistência do gênero *Staphylococcus* spp., é proveniente de mecanismos específicos, sendo este a produção da enzima extracelular beta-lactamase codificada pelo gene *blaZ* que são encontrados frequentemente nos plasmídeos, a resistência pode ser caracterizada pela presença do antibiótico que é regulado pelos genes *blaI* e *blaR1* que são precursores a produção da PBP2, uma proteína ligante a penicilina que é codificada pelo gene *mecA*. (MEDONÇA, 2012). A utilização inadequada desses produtos gera uma fonte de resíduo no leite, devido a esses fatos têm sido realizadas diversas pesquisas com utilização de óleos essenciais como substituintes a antimicrobianos convencionais em diversos setores da produção animal (POZZO *et al.*, 2011). Óleos essenciais são compostos secundários do metabolismo de plantas, possuem alta diversidade em sua composição química, são voláteis, possuem aromas característicos e compostos farmacologicamente ativos e utilizáveis pelo seu potencial antimicrobiano frente a diversos microrganismos patogênicos (POZZO *et al.*, 2011). A planta *Lippia sidoides* Cham. conhecida popularmente como alecrim-pimenta, é uma planta medicinal nativa da região nordeste e norte de Minas Gerais (MARTINS *et al.*, 2000), possuindo um alto potencial terapêutico, além de ser muito utilizado no combate de diversos microrganismos. O alecrim-pimenta possui cerca de 4% de óleo essencial em suas folhas, sendo os compostos majoritários cravacol e timol, e como complemento o grupo dos flavanóides e quinonas que confere atividade antimicrobiana eficaz (COSTA *et al.*, 2011).

---

## Materiais e Métodos

O óleo de *Lippia sidoides* Cham. foi obtido através da colheita de plantas do no Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, a técnica de extração para a obtenção do óleo por arraste a vapor a destilador piloto, (Linax®, modelo D20) Após a extração foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (4-8°C). As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a gás, Agilent Technologies (GC 7890A), acoplado a espectrômetro de massas (MS 5975C) dotado de coluna capilar DB-5 MS (Agilent Technologies, fase estacionária 5% fenil e 95% metilpolisiloxano, 30 m x 250 µm d.i. x 0,25 µm espessura do filme) e hélio (99,9999% de pureza) como gás de arraste, (1 mL min<sup>-1</sup>). A amostra foi injetada (1 µL) no modo split 1:5 com injetor mantido a 220 °C. A rampa de aquecimento da coluna iniciou a 60 °C com taxa de 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, em seguida, com um gradiente de temperatura de 10°C min.<sup>-1</sup> até 270 °C mantendo constante por 7 min. A interface com o espectrômetro de massas foi mantida a 240 °C e o mesmo operado por impacto de elétrons (70 eV), no modo full scan, monitorando uma faixa de massa (40 a 550 *m/z*). O índice de retenção de todos os compostos foi calculado a partir do tempo de retenção de uma mistura de *n*-alcanos (C8- C32, Sigma USA) 20 ppm, split 1:100. Os dados gerados foram analisados utilizando o software MSD Chemstation juntamente com a biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST, 2002). Foram utilizadas 14 cepas identificadas como *S. aureus* provenientes de tetos de vacas com mastite subclínicas provenientes de 12 fazendas em seis municípios da região norte de Minas Gerais. As cepas foram identificadas em etapa anterior por ensaio de PCR com o marcador genético *femA* foi utilizado para confirmação da espécie *S. aureus* e quanto ao perfil genético por RAPD-PCR (Idil & Bilkay, 2014). Estas foram classificadas genotipicamente como resistentes aos beta-lactâmicos por teste de difusão em disco. Avaliou-se a sensibilidade das cepas ao óleo essencial de alecrim pimenta nas concentrações de 0µl, 30µl, 60µl, 120µl e 240 µl teste de disco-difusão em ágar descrito por CLSI (2015), frente a cepas em estudos padronizada em 0,5 da escala de MacFarland. Após a incubação em estufa de crescimento a 37°C por um período de 24 horas realizou-se a leitura de cada halo de diâmetro em milímetros (mm). Realizou-se a análise de variância e regressão pelo programa R versão 1.1.2 Para a análise de regressão escolheu-se o modelo linear, baseado na significância dos seus coeficientes.

---

## Resultados e Discussão



Os resultados da análise cromatográfica do óleo essencial de alecrim-pimenta mostrou como componentes majoritários o Carvacrol (29,75%), o-Cimeno (15,33%),  $\gamma$ -Terpineno (11,03), esses resultados corroboram com os descritos na literatura (AZEVEDO et al., 2017). Sabe-se que compostos dos óleos essenciais são altamente voláteis, o que prejudica a sua utilização em muitos processos. Os resultados apresentados do óleo de alecrim-pimenta demonstra que a concentração mais eficaz é a de 240 $\mu$ l, onde as cepas isoladas apresentaram mais susceptibilidade. COSTA et al. (2011) evidenciou em seu trabalho que a concentração de 160  $\mu$ l do óleo essencial de alecrim-pimenta se mostrou eficaz as cepas isoladas padrão de *S. aureus*, quando utilizadas cepas de *S. aureus* isoladas de leite a concentração inibitória foi de 320  $\mu$ l sendo mais alta que a cepa padrão, esse resultado varia pelo perfil genético dessas bactérias. Alguns trabalhos como o de PAULA-JÚNIOR et al. (2006) mostrou que extratos alcoólicos de folhas de alecrim-pimenta podem inibir completamente o crescimento de *S. aureus*, quando testado o extrato de alecrim-pimenta no trabalho de PINHO et al. (2011) é verificado uma ineficiência do óleo. A partir dos resultados apresentados na avaliação das diferentes doses do óleo de alecrim-pimenta em relação aos municípios, pode-se verificar que os municípios 1 e 3 apresentaram menor diâmetro dos halos de inibição em relação aos demais municípios, uma vez que são pertencentes ao mesmo grupo genotípico (Gráfico 1). Quando a análise foi feita pela interação das doses com as fazendas, verificou-se que quanto menor o módulo do coeficiente angular da reta, menor a sua inclinação, menor o halo de inibição e maior resistência ao óleo, sendo a Fazenda 1 (município 4) a que apresentou menor módulo, seguida pelas Fazendas 8 (município 1) e 3 (município 2) (Gráfico 2). Na avaliação das doses com os grupos genéticos I e II, verifica-se que no grupo I a cada 01 $\mu$ l do óleo de alecrim pimenta aumenta 1,28 mm ( $y= 0,03x+1,28R^2= 0,43$ ) o diâmetro do halo de inibição já no grupo II aumenta 4,40 mm ( $y=0,034x+4,40R^2= 0,36$ ) (gráfico 03). O perfis genotípicos N, K e T apresentaram menor halo de inibição ao óleo de alecrim-pimenta. Já os perfis V, S e U apresentaram-se mais sensíveis (Gráfico 04). Os resultados apresentados corroboram com trabalhos científicos, demonstrando que o alecrim-pimenta possui atividade farmacológica e antimicrobiana, porém quando testada em diferentes microorganismos essa eficiência pode aumentar ou diminuir devido ao perfil genotípico de cada cepa.

---

## Conclusões

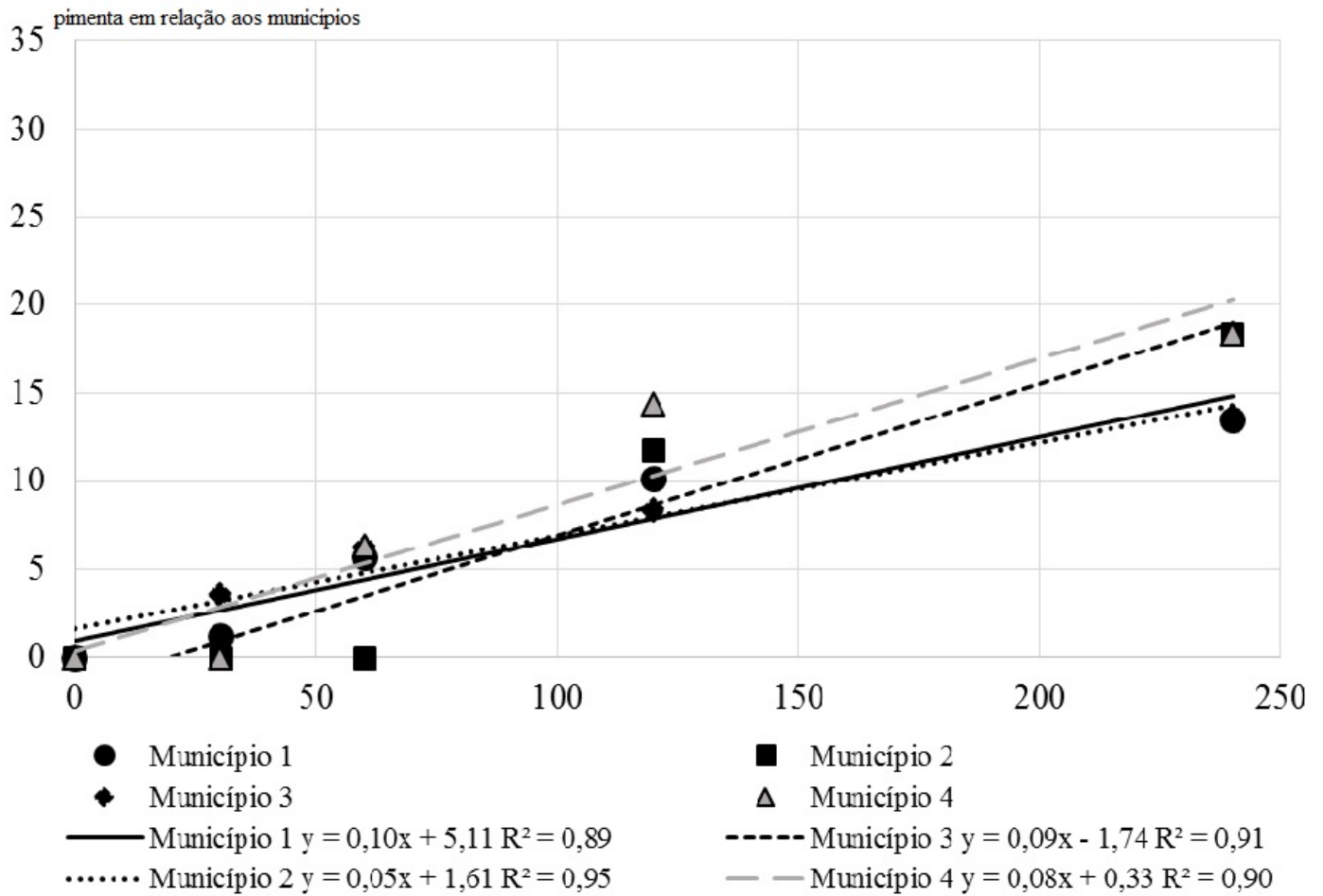
O óleo de alecrim-pimenta se mostrou eficaz apenas nas concentrações de 240 $\mu$ l na maioria das amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a beta-lactâmicos, o efeito do óleo foi variável devido ao perfil genético das cepas estudadas de acordo com os municípios e fazendas.

---

## Gráficos e Tabelas



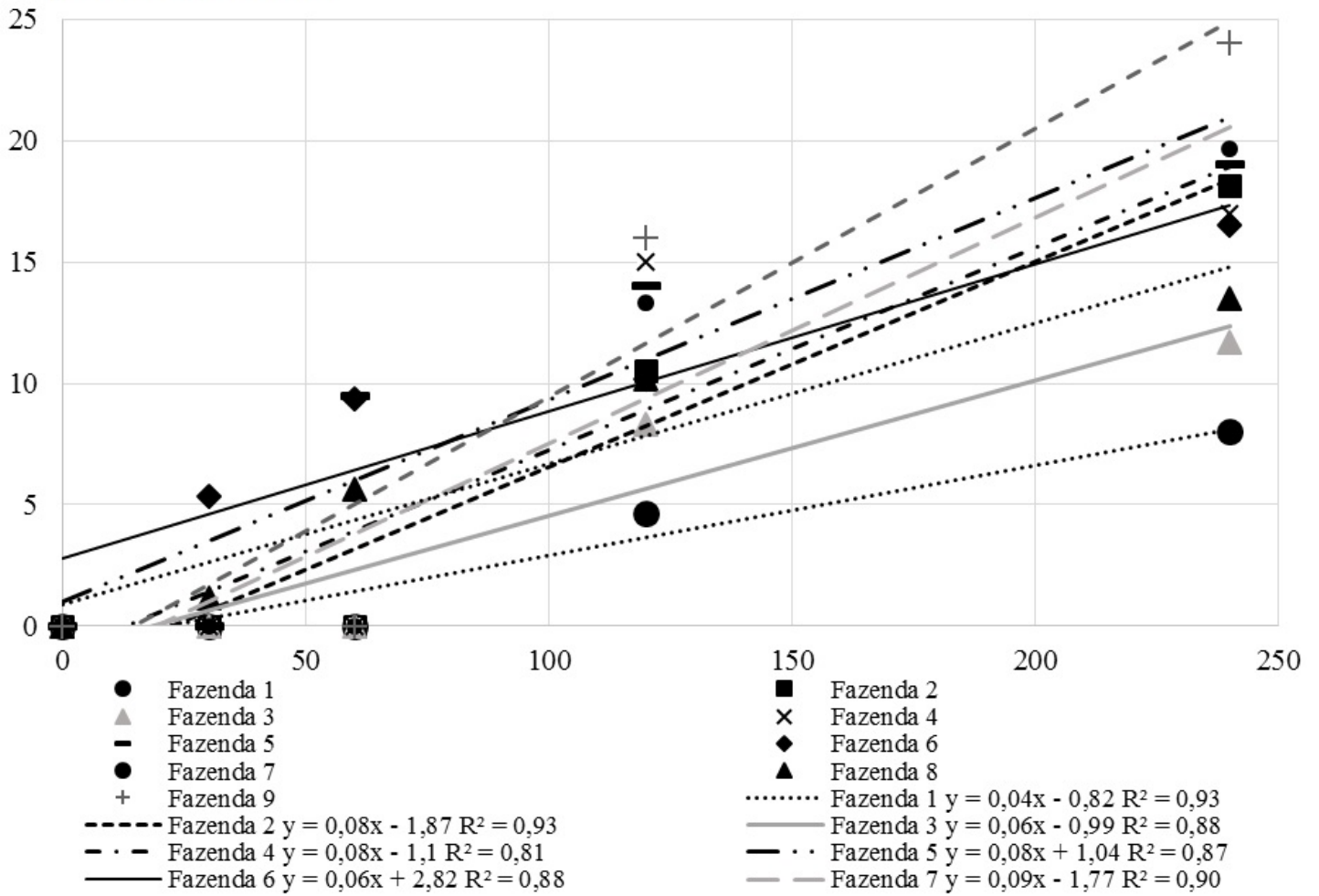
Gráfico 01: Tamanho do halo de inibição de acordo com a interação das doses 0, 30, 60, 120 e 240 µl do óleo de alecrim



(<http://abz.org.br/wp-content/uploads/2017/04/Gráfico-1-Alecrim-Pimenta.jpg>)



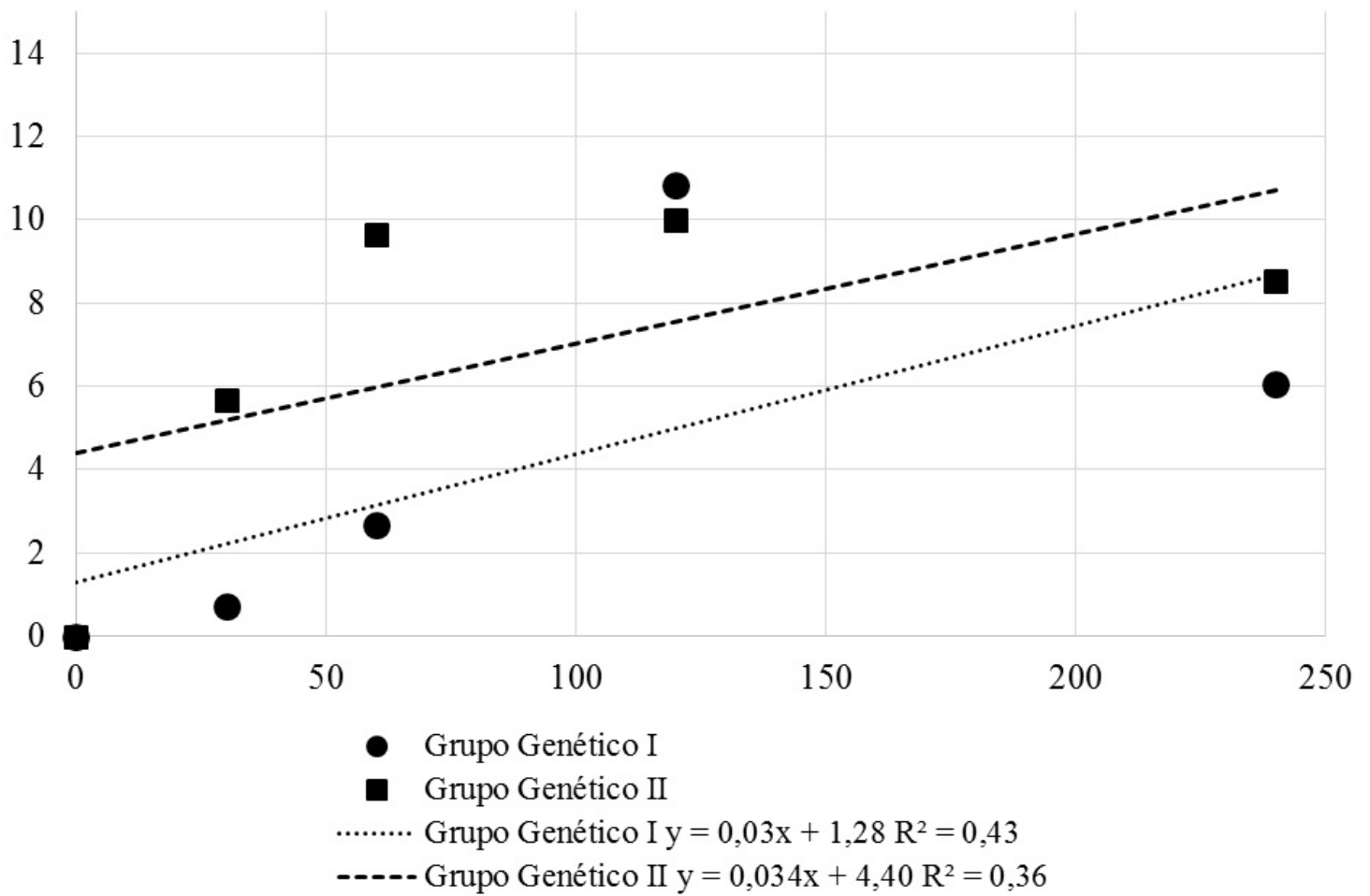
**Gráfico 2:** Tamanho do halo de inibição de acordo com a interação das doses 0, 30, 60, 120 e 240 µl do óleo de alecrim pimenta em relação as Fazendas



(<http://abz.org.br/wp-content/uploads/2017/04/Gráfico-2-Alecrim-Pimenta.jpg>)



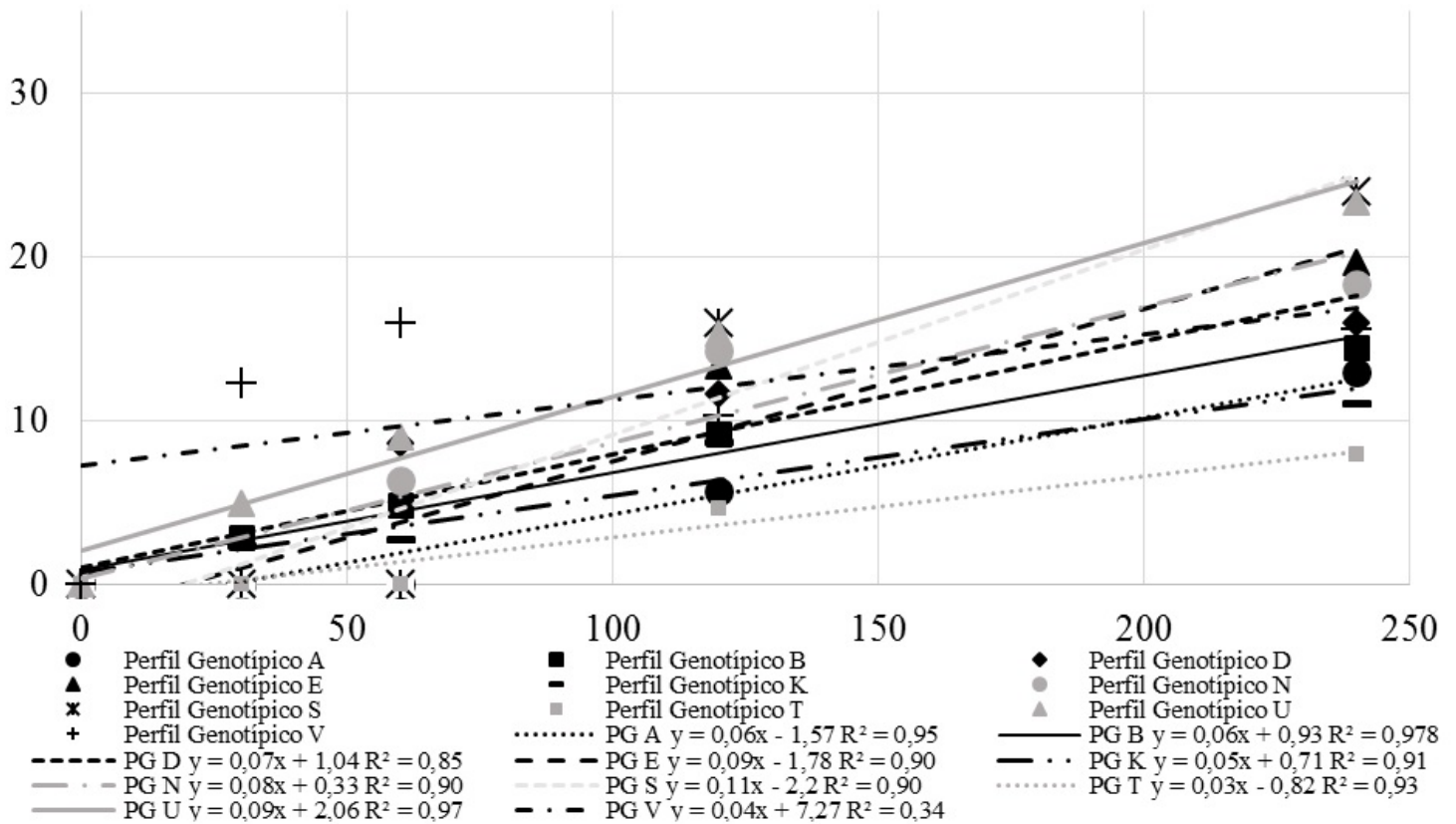
**Gráfico 3:** Tamanho do halo de inibição de acordo com a interação das doses 0, 30, 60, 120 e 240 µl do óleo de alecrim pimenta em relação aos Grupos Genéticos



(<http://abz.org.br/wp-content/uploads/2017/04/Gráfico-3-Alecrim-Pimenta.jpg>)



**Gráfico 4:** Tamanho do halo de inibição de acordo com a interação das doses 0, 30, 60, 120 e 240 µl do óleo de alecrim pimenta em relação aos Perfis Genotípicos



(<http://abz.org.br/wp-content/uploads/2017/04/Gráfico-4-Alecrim-Pimenta.jpg>)

## Referências

AZEVEDO, I. L. et al. Use of *Lippia rotundifolia* and *Cymbopogon flexuosus* essential oils, individually or in combination in broiler diets. *R. Bras. Zootec.* vol.46, n.1, pp.13-19, 2017. BARBERIO, A. et al. 2002. "In vitro" sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, período de 1996-1999. *Revista Napgama*, São Paulo, 5(1):10. CRAVEIRO, A.A.; QUEIROZ, D.C.; Óleos essenciais e química



fina. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1992. CLINICAL LABORATORY STANDAR INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard – Anos 90, n M07- A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. COELHO, S.M.O. et al. 2009. Virulence factors and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastites. Rio de Janeiro. Pesq. Vet. Bras. 29:369-374. COSTA, J. P. R. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. Biotemas. v.24, n.4, p.1-6, 2011. FREITAS, M.F.L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de Staphylococcus Coagulase Positivos isolados do 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. GIRARDINI, L.K.; Identificação de grupos clonais, resistência aos antimicrobianos e presença de genes associados a formação de biofilmes (icaA e icaD) em Sthapylococcus aureus isolados de propriedades produtoras de leite bovino. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013, 92f. MARTINS, E. R. et al. Plantas medicinais. Viçosa: UFV, 2000. 220 p. MENDONÇA, E.C.L. et al. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em Sthapylococcus spp. isolados de mastite bovina. Rio de Janeiro, 2012. OMOE, K. et al.. Detection of seg, she, and sei genes in Staphylococcus aureus isolates and determination of the enterotoxin productivities of Staphylococcus aureus isolates harborin seg, seh, or sei genes. Journal of Clinical Microbiology, v.40, n. 3, p.857-862, 2002. PAULA-JUNIOR, W. et al. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of Caryocar brasiliensis leaves hydroethanolic extract. Revista Brasileira de Farmacognosia v.16, supl., p.625-30, 2006. PINHO, L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. Ciência Rural, 2011. POZZO, M. D. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a Staphylococcus spp isolados de mastite caprina. Ciência rural, 2011.

---

### Associação Brasileira de Zootecnistas

SEPS 709/909, Bloco D - sala 113

Brasília/DF

CEP 70390-089



(<http://fb.com/abzootecnistas>)



(<http://twitter.com/abzootecnistas>)



(<https://www.linkedin.com/company/associa%C3%A7%C3%A3o-brasileira-de-zootecnistas-abz->)



(<https://instagram.com/abzootecnistas/>)

✉ Fale Conosco (<http://abz.org.br/contato/>)



abz@abz.org.br

©2022 Associação Brasileira de Zootecistas

