

INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii* Desf.) PARA INIBIÇÃO DA MASTITE: *Staphylococcus aureus*

Cleber da Silva Torres ¹
Rodrigo Alves Buriti da Costa ²
Leticia dos Reis Darcie ³
Ketolly Natanne da Silva Leal ⁴

RESUMO

A utilização de plantas medicinais como forma de terapia alternativa aos medicamentos sintéticos é cada vez mais estudada e difundida em vários sistemas produtivos. Na pecuária leiteira, o uso indiscriminado de antibacterianos no tratamento de enfermidades, principalmente da mastite, tem levado ao aumento da resistência de muitos microrganismos patogênicos aos principais fármacos disponíveis no mercado. Somando-se a este fato, o incumprimento do período de carência destes fármacos tem promovido o aumento de resíduo destes no leite produzido e disponibilizado ao consumidor, o que configura problema de saúde pública. Diante disso, o presente estudo objetivou avaliar a ação antimicrobiana do óleo de copaíba sobre *Staphylococcus aureus*, isolado do leite de vacas positivas para a presença do microrganismo alvo. A atividade antibacteriana foi determinada pelo teste de disco-difusão, utilizando-se o óleo de copaíba nas concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39% e 0,19%. Após análise dos dados foi possível verificar que o óleo de copaíba apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações de 100% a 3,12%, sendo que o aumento da concentração de óleo provocou um aumento no halo de inibição, concluindo-se que o poder de inibição de desenvolvimento bacteriano do óleo de copaíba sobre o *Staphylococcus aureus*, causador da mastite subclínica em vacas leiteiras, existe e é dependente da diluição.

Palavras-chave: Fitoterápico, leite, disco-difusão, óleo medicinal, terapia alternativa.

INTRODUÇÃO

O Brasil se encontra como um dos países com o maior rebanho bovino do mundo, aproximadamente 200 bilhões de cabeças, onde, esse tipo de criação faz parte das principais

¹ Mestre pelo Curso de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, cstorres@gmail.com;

² Pós-Graduado pelo Curso de Pós-graduação em Gestão de Projetos da Universidade Cândido Mendes - UCAM, rodrigoalves.hellraiser@gmail.com;

³ Mestre pelo Curso de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL, leticia_darcie@hotmail.com;

⁴ Mestre pelo Curso de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL, ketollynatanneq@gmail.com.

atividades do setor agronegócio. Logo, o monitoramento da saúde animal é fundamental para assegurar os níveis de produtividade nos rebanhos com qualidade (GILBERT et al., 2002).

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), entende-se por leite como “O produto oriundo da ordenha completa, e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas” (BRASIL, 1952).

A qualidade do leite possui uma grande importância sob o ponto de vista da Saúde Pública. No Brasil, são comuns casos de doenças relativas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos com leite contaminado com microrganismos patogênicos. Uma das grandes causas é o fato de mais de 44% do leite consumido no país ser originário do mercado informal no qual é comercializado sem condição térmica adequada ou controle laboratorial (COSTA et al., 2017).

São vários fatores que influenciam na qualidade do leite cru tais como: higiene da ordenha e dos utensílios, manejo, alimentação, genética dos rebanhos, obtenção, e também infecções como a da glândula mamária, conhecida como mastite, compõem uma das principais causas que desempenham influência negativa sobre a qualidade e produção do leite (MENEZES et al., 2014).

Segundo Rezer (2010) o leite apresenta qualidade em relação a suas proteínas e uma grande quantidade de cálcio, fósforo, magnésio, vitamina A riboflavina e niacina. As alterações microbianas que ocorrem no leite devem-se, principalmente, pela sua composição química variada.

A contaminação e por consequência as alterações microbiológicas que podem ocorrer no leite, principalmente o destinado a indústria, que se utiliza como matéria prima para diversos produtos, apresenta perigo para o consumidor, uma vez que o leite e os produtos lácteos podem veicular microrganismos associados a surtos de origem alimentar, além de ocasionar prejuízos econômicos (MENEZES et al., 2014). A microbiota que contamina o leite é geralmente composta por bactérias que se multiplicam no leite refrigerado, enquanto que leveduras e fungos são raramente encontrados (REZER, 2010).

Com a busca de maiores índices produtivos coloca em risco a saúde do rebanho, impactando no sistema imunológico dos animais e propiciando o surgimento de doenças de diversas naturezas: infecciosas, metabólicas, parasitárias, imunológicas, comportamentais, dentre outras, exigindo o emprego de medicação sistemática para recuperar a sanidade do rebanho (FLORIÃO, 2013).

Segundo Leira e colaboradores (2018) a mastite é uma doença inflamatória da glândula mamária acometida por bactérias ou microrganismos como os fungos, vírus e até mesmo por lesões físicas e estresse. De acordo com Martins et al. (2010) a mastite é dividida em dois tipos a clínica e a subclínica, onde, a mastite clínica os sintomas de inflamação são mais graves, com notáveis alterações na glândula mamária e no leite. Já a mastite subclínica é reconhecida por não apresentar alterações macroscópicas, havendo apenas modificações químicas e microbiológicas no leite (alta taxa de células imunológicas e células do epitélio descamado), dificultando a identificação e tratamento. Essa doença é uma das mais relevantes no gado leiteiro e ocasiona prejuízos financeiros, devido que reduz a produção do leite, gasto com remédios, descarte do leite contaminado, bem como o descarte dos animais (LEIRA et al., 2018).

A doença é transmitida por microrganismos que são divididos em dois grandes grupos: os patógenos contagiosos e os patógenos ambientais classificando-os conforme sua origem e meio de transmissão. Dentre os microrganismos pertencentes aos grupos patógenos contagiosos estão os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus sp.* Já os patógenos ambientais são presentes no ar, na água, em fezes, na terra, onde, os microrganismos são *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Pseudomonas sp.*, os fungos principalmente leveduras e algas aclorofiladas são do gênero *Prototheca sp.* (COSTA et al., 1999 e MENDONÇA et al., 1999). Esses patógenos contagiosos têm a atividade de colonizar o epitélio dos tetos, especialmente se a pele estiver lesionada, o qual conseguem elevar a contagem de células somáticas (CCS) provocando a inflamação mastite subclínica de longa duração (COSTA et al., 2017).

Logo, devido às infecções que podem afetar a qualidade do leite, o uso de antibióticos é comum tanto para fins terapêuticos, quanto para a cura de mastite. No entanto, os antibióticos geram resíduos, colocando assim, em risco a saúde do consumidor, logo, torna-se um sério problema na área econômica e de saúde pública (MENDONÇA et al., 1999).

Na alopatia, antimicrobianos são as principais substâncias empregadas para tratar a mastite e, associado ao fato do uso indiscriminado, a resistência dos microrganismos é

crescente. Portanto, o emprego isolado ou associado de plantas medicinais no tratamento de doenças pode ser estratégico e, também, para melhorar os resultados clínicos na prática (MASSON et al., 2013).

As plantas medicinais vêm se destacando no tratamento da saúde, especialmente para as populações mais carentes e seus rebanhos. O uso de determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem crescido, principalmente, devido aos grandes problemas associados aos antibióticos, como as reações de hipersensibilidade e a resistência microbiana. Assim, a utilização das plantas medicinais, é cada vez mais estudada como forma de terapia alternativa aos medicamentos sintéticos que são utilizados (LANGE et al., 2017).

Portanto, nos dias atuais buscam-se alternativas para acabar ou minimizar o risco de resíduos de antibióticos utilizados para tratar doenças no rebanho, umas das alternativas é o uso de substâncias com ação microbianas provenientes de plantas. Segundo Leira et al. (2018) pode ser economicamente viável quando a qualidade do leite é um componente significativo do produto ou quando casos clínicos ou a transmissão de micro-organismos podem ser prevenidos.

Estudos farmacológicos utilizando o óleo de copaíba mostram que o seu uso vem demonstrando grande atividade anti-inflamatória, cicatrizante, antitumoral e bactericida (MACIEL et al., 2002). A atividade antimicrobiana do óleo de copaíba, na forma de oleoresina e essencial foram verificadas sobre 55 microrganismos isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica.

O óleo de copaíba é extraído de uma árvore especificamente do tronco, onde, possui até 36 metros de altura com copa densa, casca lisa e produzindo de 2 a 3 kg de sementes, possuindo ativos que são responsáveis pela atividade biológica tais como: sesquiterpenos (mais de 50% da óleo-resina), diterpenos e ácidos terpênicos (PORTO, 2015). Um importante anti-inflamatório de fonte natural da copaíba é o cariofileno, outro composto importante é ácido caurenóico, um diterpeno que possui estudos comprovados nas ações anti-inflamatórias, diurética e efeitos *in vivo* e antimicrobianos, relaxante muscular e ações citotóxicas *in vitro* mostra dois constituintes ativos de sesquiterpenos presentes em óleos de copaíba (PAIVA et al., 2004).

Devido às substâncias presentes na copaíba principalmente o óleo, que é uma solução de ácidos diterpênicos, e que essencialmente constituído por sesquiterpenos, vêm sendo investigado e empregado como alternativas para tratamentos de doenças essencialmente inflamatórias. O óleo é um líquido cuja a coloração é amarelada até marrom, apresenta cheiro forte, sabor acre e amargo (PORTO et al., 2015).

Vários estudos fitoquímico indicam que os óleos de copaíba são misturas de sesquiterpenos e diterpenos, sendo o ácido copálico e os sesquiterpenos β cariofileno e α -copaeno, os principais componentes do óleo, sendo o betacariofileno que apresenta ação anti-inflamatória antibacteriana, antifúngica e antiendêmica, e o beta-bisaboleno, analgésico e anti-inflamatório (VEIGA et al., 2005).

Ao utilizar o óleo de copaíba para efeito antimicrobiano, sabe-se que as substâncias presentes estão relacionadas, principalmente, à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (MASSON et al, 2013). Sendo assim, acredita-se que o efeito antimicrobiano na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas é exercido pela maioria deles. Modificam a permeabilidade da membrana citoplasmática para íons de hidrogênio e potássio, interrompendo os processos vitais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações que dependem de enzimas, resultando na perda do controle quimiosmótico da célula afetada, matando a bactéria (SILVA, 2010). Braga e Silva (2007) afirma que, dentre as ações do óleo de copaíba, a maior pesquisa é feita na atividade antimicrobiana.

Devido ao aumento da resistência de *S. aureus* a diversos antimicrobianos principalmente sintéticos, a busca por alternativas para o tratamento de mastite torna-se fundamental e importante, logo, o presente estudo utilizou óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) como uma alternativa para a inibição ou controle do *S. aureus*. Para isso, foi investigado o efeito da concentração do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) na inibição do desenvolvimento do *Staphylococcus aureus*, importante agente causador da mastite subclínica em bovinos leiteiros em âmbito nacional, através da técnica de difusão em disco.

METODOLOGIA

Amostras

Foram utilizadas 50 vacas leiteiras lactantes de uma propriedade leiteira localizada na cidade de Poços de Caldas-MG, para a detecção da mastite subclínica e coleta de amostras de leite. Na coleta das amostras do leite, os tetos foram higienizados pela imersão em solução antisséptica de álcool iodado (5%), decorridos 30 segundos o excesso de antisséptico foi removido com álcool 70% e seco com papel toalha. Após a higienização seguiu-se o teste da caneca telada e o *California Mastitis Test* (CMT) para a detecção da mastite e dentre as 50 vacas, 10 foram considerados positivos para mastite subclínica e utilizadas na amostragem.

Foram coletados 10 mL de leite dos tetos positivos ao CMT, em frascos estéreis de 25

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

mL, abertos apenas no momento da coleta e fechados em seguida. As amostras foram transportadas sob refrigeração ao laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Alfenas para realização dos testes microbiológicos.

Na análise de identificação e caracterização do *Staphylococcus*, 25mL da amostra foram homogeneizados em 225 mL de solução salina peptonada 0,1%. A partir desta diluição inicial a 10^{-1} , foram preparadas mais duas diluições decimais (10^{-2} e 10^{-3}), utilizando-se o mesmo diluente.

Identificação e caracterização fenotípica de *Staphylococcus*

Na identificação do *Staphylococcus* foi utilizada a metodologia descrita por Lancette e Bennett (2001), onde placas de Petri contendo ágar Baird-Parker (BP) suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo receberam as amostras adequadamente homogeneizadas e diluídas. A partir de cada diluição, um volume de 0,1mL foi colocado sobre o ágar e espalhada com auxílio de uma alça em “L”. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias características, que apresentaram cor negra e halo. Destas, até três colônias foram repassadas para tubos com caldo BHI e incubadas por 24 horas a 35°C para continuação dos testes bioquímicos e confirmação da espécie *Staphylococcus aureus* (catalase, coagulase, DNase, manitol e coloração de gram).

Para realizar a prova da catalase, por meio de uma alça bacteriológica foram coletadas as colônias suspeitas para *Staphylococcus aureus* foram dispersadas em uma lâmina de vidro, colocou-se sobre o esfregaço uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, observou-se a formação de bolhas, confirmando a positividade para *Staphylococcus aureus*.

Após o teste da catalase em lâminas, foram feitas provas da coagulase em tubos. Depositou-se 0,1 mL de caldo BHI, onde havia amostras de colônias suspeitas para *Staphylococcus* em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de plasma humano e incubou-se por 4 horas a 35°C em banho-maria. Após análise, observou-se formação de coágulo, sendo um indicativo para positividade do *Staphylococcus aureus*.

O teste de DNase foi usado para detectar a degradação do ácido desoxirribonucléico (DNA), contido no meio de cultura, isto ocorre apenas por bactérias que possuem uma enzima extracelular, a desoxirribonuclease, responsável por esta reação. Ao meio DNase foi adicionado azul de ortotoluidina na concentração de 0,1%; inoculou-se amostras de caldo BHI contendo colônias suspeitas de *Staphylococcuse* incubou-se as placas a 35°C por 24 horas. Após a incubação observou-se a formação de um halo transparente, identificando a presença de

Staphylococcus aureus.

A confirmação do agente causador isolado foi realizada pelo teste de crescimento em ágar sal manitol, visto que o *Staphylococcus aureus* tem a capacidade de fermentar o MSA em meio contendo 7,5% de cloreto de sódio, produzindo assim colônias grandes e rodeadas de uma zona amarela. Estafilococos patogênicos, como *S. aureus*, crescem bem em ambiente rico em sal, virando o MSA para o amarelo mediante liberação de ácido. Após a incubação por 24 horas a 35°C, observou-se a positividade para bactéria do gênero *Staphylococcus aureus*.

Após análise e confirmação da positividade para *Staphylococcus aureus* das amostras em ágar manitol, utilizou-se a técnica de coloração de Gram para diferenciar bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Teste de sensibilidade antimicrobiana *Staphylococcus aureus* e óleo de *Copaifera langsdorffii* Desf

Após a confirmação microbiológica para bactérias *Staphylococcus aureus*, retiradas das amostras de leite, utilizou-se a cepa da bactéria em questão e aplicou-se a técnica de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo extraído da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.).

O teste disco-difusão foi realizado em Agar Mueller-Hinton, com alíquotas de 10µL do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) puro e de suas diluições consecutivas (1+1) utilizando como diluente dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo as concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39% e 0,19% do óleo (volume/volume). O preparo dos discos de papel absorvente seguiu a técnica descrita pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA, na qual utilizou-se discos de papeis secos e estéreis, medindo 11mm de diâmetro.

As diferentes concentrações preparadas com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) foram impregnadas nos disco por saturação em ágar Mueller-Hinton fundido com a cepa de *Staphylococcus aureus*. Os discos foram colocados nas placas, manualmente com o auxílio de pinças estéreis e incubadas à 35°C por 24 horas. Para cada diluição foram utilizadas 10 placas e em cada placa dois discos saturados totalizando 20 leituras de halo para cada diluição. Como controle positivo utilizou-se o antibiótico cloranfenicol (CLO), 10µg/disco. Após o tempo de incubação os diâmetros dos halos foram medidos com um paquímetro, sendo considerados suscetíveis, os halos com diâmetro igual ou acima de 10 mm.

Análise de Dados

Os dados foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado composto por 8 tratamentos (7 concentrações de óleo de copaíba e um tratamento controle com cloranfenicol) os tratamentos 0,78%, 0,39% e 0,19% foram suprimidos da análise estatística por não promoverem a formação de halo, ou seja, não apresentaram atividade inibitória no crescimento do *Staphylococcus aureus*. Os dados foram analisados inicialmente com relação à distribuição normal dos erros, sendo os dados *outlier* retirados e à homogeneidade de variâncias. Como as variâncias foram heterogêneas os dados foram transformados em \sqrt{X} , procedendo-se à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias entre os tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, com $p < 0,05$.

Como houve efeito de tratamento, os resultados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear entre diâmetro do halo e a concentração de óleo de copaíba sendo as concentrações de 0,78%, 0,39% e 0,19% do óleo de copaíba excluídas do modelo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de identificação de *Staphylococcus*

Na Fig.1 pode-se observar o resultado da presença da bactéria do gênero *Staphylococcus aureus* nas amostras de leite das vacas submetidas ao teste de CMT com correlação positiva com a alta concentração de células somáticas, decorrentes da infecção da glândula mamária (mastite subclínica).

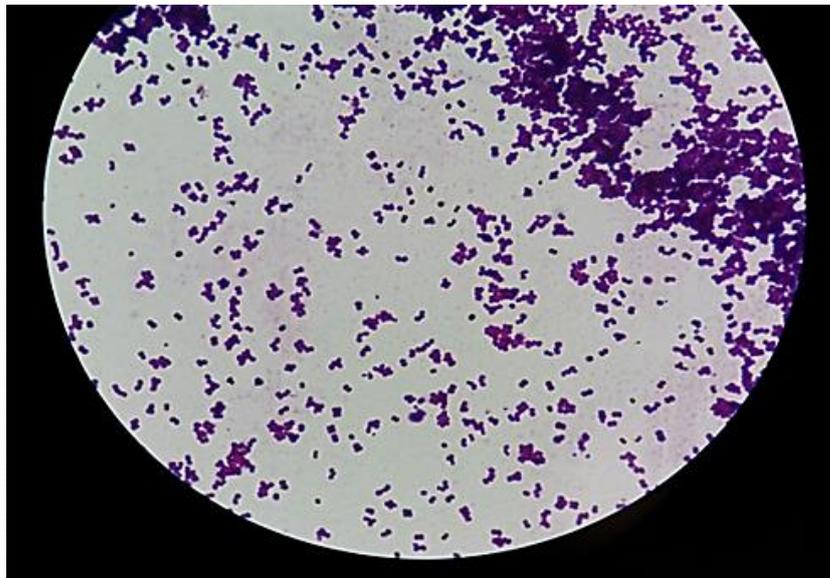
Fig.1 - Resultado do teste do crescimento em ágar manitol.



Fonte: Autor.

De acordo com a ANVISA, as colônias de *S. aureus* podem ter pigmento amarelo ou amarelo-alaranjado, podendo apresentar hemólise. A coloração amarelada no *S. aureus* aparece mais pronunciada após incubação de 72 h em temperatura ambiente. Logo, é possível verificar por meio da Fig.1 que as amostras apresentaram cores amarelo e amarelo-alaranjado confirmando a presença da bactéria.

Fig.2 - Resultado do teste de coloração de Gram (coloração roxa/azulada)



Fonte: Autor.

Sabe-se que o *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva onde possui três tipos de exotoxina que determinam sua patogenicidade: a hemolisina, a enterotoxina e a

leucocidina, a técnica utilizada para corar diferentes microrganismos baseou-se na composição química e integridade da sua parede celular, classificando-as assim em Gram-negativos (vermelho) ou Gram-positivo (roxo) (DANTAS et al., 2010). A Fig.2 mostra o resultado do teste de coloração gram, confirmando que o *Staphylococcus aureus* é de fato uma bactéria Gram positiva devido a coloração roxo apresentada.

Análise do Teste de sensibilidade antimicrobiana *Staphylococcus aureus* ao óleo de *Copaifera langsdorffii* Desf

A aplicação do óleo de copaíba nos discos promoveu inibição do crescimento microbiano, uma vez que foi verificada diferença significativa ($P < 0,05$) entre as médias dos diâmetros dos halos observados para bactéria avaliada (Tab.1). De acordo com os resultados, quanto maior a concentração do óleo, maior foi o halo de inibição obtido, com diferença significativa entre eles. Deve ser ressaltado que nas diluições de 0,78%, 0,39% e 0,19% do óleo não houve inibição do crescimento bacteriano (sem formação aparente do halo). O cloranfenicol, utilizado como controle positivo no teste de disco-difusão é um antibiótico da classe dos anfenicóis, com propriedade bacteriostática, interfere na síntese proteica bacteriana e apresentou maior halo de inibição do crescimento do *S. aureus*, comparado às demais concentrações avaliadas ($P < 0,05$).

Tab.1 - Atividade antimicrobiana pelo método de difusão de placas do óleo de copaíba sobre o *Staphylococcus aureus* em função das concentrações avaliadas.

Tratamentos	Diâmetro do halo de inibição (mm) e desvio padrão
Cloranfenicol *	25,99 ($\pm 0,0243$) ^A
100%	14,55 ($\pm 0,0114$) ^B
50%	12,32 ($\pm 0,0117$) ^C
25%	10,36 ($\pm 0,0150$) ^D
12,5%	9,21 ($\pm 0,0095$) ^E
6,25%	8,71 ($\pm 0,0105$) ^F
3,12%	7,01 ($\pm 0,0111$) ^G
1,56%	6,06 ($\pm 0,0445$) ^H

Médias seguidas pela mesma letra na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) *10 ug/disco (antimicrobiano sintético, controle positivo)

Fonte: Autor

Considerando-se a classificação da ação de extratos e o conseqüente tamanho dos halos, proposta por Alves et al., (2000), considera-se como inativo aquele que produz um halo menor

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

que 9 mm; 9 a 12 mm indicam extratos ativos, e aqueles halos de 13 a 18 mm, ou maiores, correspondem a extratos muito ativos. Desta forma o óleo de copaíba pode ser considerado muito ativo frente à inibição do crescimento microbiano na sua forma pura ou 100%.

Resultado de atividade antimicrobiana semelhante a este estudo foi demonstrado, sendo que à concentração de 25% do óleo de copaíba em dimetilsulfoxido (DMSO) foi observado halo com inibição de crescimento bacteriano em meio de cultura Mueller-Hinton em teste de difusão em discos, com média de 10mm para o mesmo patógeno. De acordo com Mendonça et al., (2009), foi possível verificar que o halo de inibição foi de 13mm com o uso do óleo puro (100%), diminuindo para 11, 10, 9, 7e 7mm, nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12%, respectivamente.

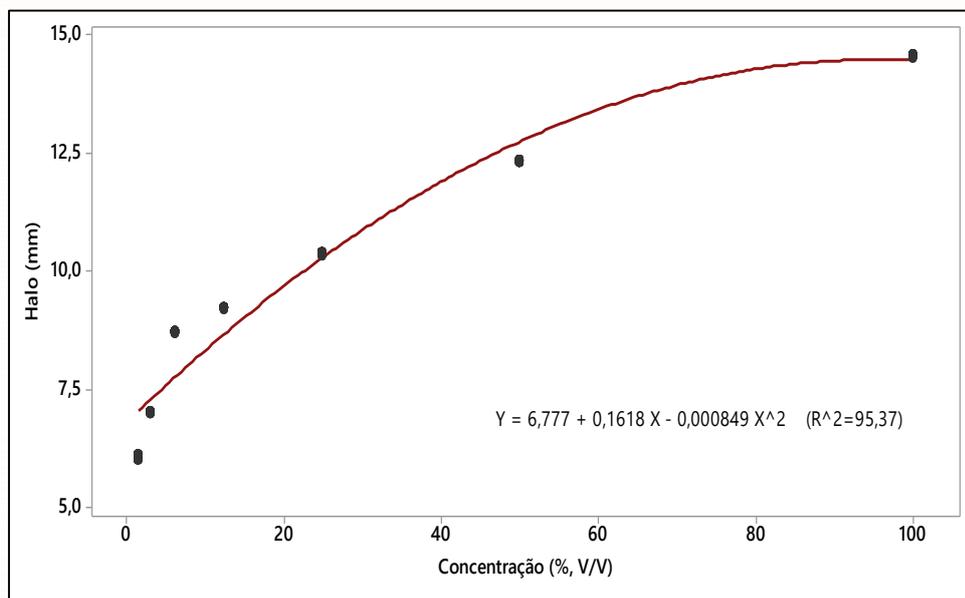
De acordo com estudos antimicrobianos *in vitro* de Gilbert e colaboradores (2002) que utilizaram o óleo de copaíba no combate às bactérias, mostraram atividades antimicrobianas com o óleo de copaíba sobre os microrganismos orais *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. pyogenese* *E. faecalis*. Os halos de inibição foram maiores que os obtidos com o controle positivo a clorexidina, confirmando a ação inibitória microbiana.

Segundo Burt et al., (2018) a atividade antimicrobiana pode ser devido ao efeito do óleo sobre a membrana citoplasmática, especialmente, às proteínas da membrana; alteração no transporte ativo em nível de membrana, interrompendo a força motriz de prótons e do fluxo de elétrons, e, também, pela coagulação dos conteúdos celulares.

Pesquisa de Santos et al., (2008) sobre a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba brasileiro obtido de diferentes espécies do gênero *Copaifera* (*Copaifera martii*, *Copaifera officinalis* e *Copaifera reticulata*) identificou, sob a análise de microscopia eletrônica, que o microrganismo *S. Aureus* tratado com o óleo de copaíba apresentou danos e rompimento da membrana da célula, resultando em alterações morfológicas, liberação de componentes citoplasmáticos e redução no volume celular.

A atividade antimicrobiana do óleo de copaíba de acordo com Leandro et al., (2012) não pode ser atribuída a um único componente, pois as características farmacológicas podem ser atribuídas aos diferentes compostos, que de forma sinérgica atuam na atividade antimicrobiana. O β -cariofileno, que é um dos principais constituintes bioativos encontrados no óleo-resina de copaíba é um sesquiterpeno cuja composição perfaz 99,47% dos componentes do óleo e apresenta propriedades medicinais (anti-inflamatórias e antifúngicas) (GALÚCIO et al., 2016). A Figura 3 mostra a análise de regressão onde foi possível verificar a concentração mais eficiente para inibição da bactéria estudada.

Fig. 3 - Relação quadrática entre os halos de inibição antimicrobiana (mm) e as diluições do óleo de copaíba. R² = coeficiente de determinação.



Fonte: Autor.

No presente estudo foi possível observar por meio da análise de regressão com modelo quadrático, relação entre os níveis crescentes do óleo de Copaíba e o tamanho do halo representativo da inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* ($Y = 6,777 + 0,1618x - 0,000849x^2$), cujo modelo explica 95,37%. Neste caso, quanto maior a concentração do óleo aplicado, maior foi o halo de inibição formado para a inibição do crescimento, até atingir o ponto de inflexão, que foi para 100% do óleo para *S. aureus*. Portanto, é possível estimar a concentração mais eficiente contra a bactéria avaliada (Fig. 3).

Considerando-se a condição descrita por Alves et al., (2002), no presente estudo, as concentrações de 25 e 12,5% do óleo de copaíba representam halos com diâmetro entre 9 a 12 mm indicando extratos ativos, e, as concentrações 100, 50%, halos entre 13 a 18 mm, que correspondem a extratos muito ativos.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, existe a possibilidade de tratamento de infecções subclínicas por *S. aureus* com o óleo de Copaíba e esta deve ser avaliada, inclusive *in vivo*, como uma alternativa aos antimicrobianos sintéticos para o tratamento da mastite, garantindo assim, que não ocorram complicações infecciosas em virtude do crescimento ou proliferação microbiana, e o agravamento do quadro da doença, gerando a diminuição na produção leiteira dos animais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Verificou-se a presença de *Staphylococcus aureus* nas amostras de leite de vacas conformadas com mastite subclínica e a partir disso, constata-se que o óleo de Copaíba apresenta efeito inibidor de crescimento desta bactéria quando testado. O óleo de copaíba nas concentrações de 12,5 e 25% é ativos para inibir a atividade microbiana e as concentrações 50 e 100% são muito ativas.

Constatou-se, através desse estudo, que o halo de inibição antimicrobiana diminui com o aumento da diluição do extrato, podendo ser considerado como alternativa terapêutica potencial para o controle da mastite bovina, necessitando ainda de ensaios biológicos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ANVISA, Agência nacional de vigilância sanitária. **Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf>, Acesso em: 05 de junho de 2019.

ALVES, T. M. A. et al. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, Vol. 95(3): 367-373, May/Jun. 2000.

BRASIL, 1952. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA).** Aprovado pelo decreto nº 30.691, de 20 de março de 1952. Brasília, 1952.

BRAGA, M. D., SILVA, C. C. M. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Copaifera langsdorffii* Desf. sobre *Staphylococcus aureus*. **Unimontes Científica**, Montes Claros, v.9, n.1 – jan./jun. 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology.** V.94. pg. 223–253, 2004.

COSTA, H. N., MOLINA, L. R., LAGE, C. F. A., MALACCO, V. M. R., FACURY FILHO, E. J., CARVALHO, A. Ú. 2017. Estimativa das perdas de produção leiteira em vacas mestiças Holandês x Zebu com mastite subclínica baseada em duas metodologias de análise. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, pg. 579-586, 2017.

COSTA, E., MELVILLE, P., RIBEIRO, A., WATANABE, E. Infecções intramamárias em novilhas primíparas no período pré ao pós-parto e sua importância no controle de mastite. **Revista Napgama**, v.2, pg.16-20, 1999.

DANTAS, S. A. F., SENA, L. V. T., MELO, D. J. A. Avaliação de plantas medicinais no combate a mastite bovina. **Revista Holos.** v.4. pg. 96-101, 2010.

FLORIÃO, M. M. Boas práticas em bovinocultura leiteira com ênfase em sanidade preventiva.

Programa Rio Rural, 2013. [ISSN 1983-5671].

Farmacopeia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

GILBERT B., ALVES, L., FERREIRA, J. L. P. A base científica da fitoterapia. **Revista Ciência & Ambiente**, Santa Maria, v. 13, n. 25, p. 129-135, jul./dez., 2002.

GALÚCIO, C. S. et al. Recuperação de Sesquiterpenos do Óleo-Resina de Copaíba a Partir da Destilação Molecular. *Quimica Nova*, Vol. 39, No. 7, 795-800, 2016.

LEIRA, M. H. et al. Fatores que alteram a produção e a qualidade do leite: Revisão. **Revista Pubvet**. v.12, n.5, a85, p.1-13, maio.,2018.

LANGE, M. J., ZAMBOM, M. A., POZZA, M. S. S. Tipologia de manejo de ordenha: análise de fatores de risco para a mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2017; 37(11):1205-1212.

LANCETTE, G. A., BENNETT R. W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal Enterotoxins*. In: Downes F. P; Ito, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: Apha, p. 387-403, 2001.

LEANDRO, L. M., VARGAS, F. S., BARBOSA, P. C. S., NEVES, J. K. O., SILVA, J. A., VEIGA JUNIOR, V.F. Chemistry and biological activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) **Oleorensis. Molecules**, v.17, pg.3866-3889, 2010.

MARTINS, R. P., SILVA, J. A. G., NAKAZATO, L., DUTRA, V., FILHO, E. S. A. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá-MT. **Ciência Animal Brasileira**, 11, 181-187, 2010.

MENDONÇA, C. L., FIORAVANT, M. C. S., SILVA, J. A. B. A. **Etiologia da mastite bovina**. *Veterinária Notícias*, v.5, pg.107-118, 1999.

MENEZES, M. F. C. et al. Microbiota and coservation of milk. **Revista Eletronica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET**. e-ISSN 2236 1170 - v. 18. Ed. Especial Maio. 2014, p. 76-89.

MENDONÇA D. E., ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana do óleoresina produzido pela copaíba – *Copaifera multijuga Hayne* (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, pg.577-81, 2009.

MASSON, D. S., SALVADOR, S. L., POLIZELLO, A. C. M., Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera langsdorffii*) oleoresin on bacteria of clinical significance in cutaneous wounds. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, 2013; 15(4):664-669.

PORTO, A. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão o/a a base de óleo de copaíba, incorporadas com nanopartículas magnéticas de zinco**. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília. Brasília-DF, 2015.

PAIVA, L. A. F., GURGEL, L. A., SOUSA, E. T., SILVEIRA, E. R., SILVA, R. M., SANTOS, F. A., Protective effect os Copaiferalangsdorffii óleo-resinagainstaceticacidinducedcolitis in rats. **Journal Ethno pharmacolgy**, v.93, 2004.

REZER, A. P. S. **Avaliação da Qualidade Microbiológica e Físico-Química do leite UHT**

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

integral comercializado no Rio Grande do Sul. 2010, 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SILVA, N. C. C. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010.

VEIGA JUNIOR, V. F., PINTO A. C., MACIEL, M. A. M. Medicinal plants; safe cure? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p.519-528, 2005.