



Atividade antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro* do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. visando à aplicação no controle da mastite bovina

[*In vitro* antibacterial and cytotoxicity activities of *Tagetes minuta* L. essential oil towards bovine mastitis treatment]

J. Sperandio, B. Veleirinho, L.A. Honorato, L.H. Campestrini, S. Kuhnen*

J. Sperandio
<https://orcid.org/0000-0003-2358-7425>
B. Veleirinho
<https://orcid.org/0000-0003-2820-3443>
L.A. Honorato
<https://orcid.org/0000-0001-8046-6860>
L.H. Campestrini
<https://orcid.org/0000-0002-4522-9541>
S. Kuhnen
<https://orcid.org/0000-0002-1882-5241>

Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis, SC

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e a citotoxicidade sobre células epiteliais da glândula mamária bovina (MAC-T), visando a seu uso no tratamento da mastite bovina. A análise qualitativa do óleo revelou cis-tagetona (24,24%), di-hidrotagetona (16,65%), 1,3,6-octatrieno-3,7-dimetil-E (13,61%), trans-ocimenona (13,52%) e cis-ocimenona (10,06%) como compostos majoritários. Nos ensaios da atividade antimicrobiana, a concentração inibitória mínima (CIM) verificada foi de 1 mg/mL para a cepa padrão (ATCC 25923), cinco isolados de *S. aureus* provenientes de leite de vacas com mastite e a cepa padrão resistente à metilicina (MRSA) (ATCC 33592). Para a cepa padrão de *E. coli* (ATCC 8739) e dois isolados de leite de vacas com mastite, a CIM foi de 3 mg/mL. Elevado efeito citotóxico do óleo sobre as células da linhagem MAC-T foi constatado. Concentrações superiores a 10 µg/mL do óleo resultaram em mais de 90% de morte celular. Tais resultados sugerem que, apesar da atividade antimicrobiana contra agentes causadores da mastite bovina, a utilização intramamária do óleo de *T. minuta* não seria recomendada. É importante destacar a sensibilidade da cepa MRSA ao óleo essencial, o que evidencia seu potencial como antisséptico e sanitizante.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, *Tagetes minuta*, mastite, produtos naturais

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the in vitro antimicrobial activity of Tagetes minuta L. essential oil against Staphylococcus aureus and Escherichia coli, and its cytotoxicity to bovine mammary epithelial cells (MAC-T line), aiming at its use for bovine mastitis treatment. The qualitative analysis of the oil by GC-MS identified cis-tagetone (24.24%), dihydrotagetone (16.65%), 1,3,6-Octatriene 3,7-Dimethyl-E (13.61%); trans-ocimene (13.52%) and cis-ocimene (10.06%) as major compounds. Antimicrobial activity was determined by broth microdilution technique and revealed the minimum inhibitory concentration of 1mg/mL for the standard strain of S. aureus (ATCC 25923) and five bacterias isolated from mastitic milk, including a multiresistant strain (ATCC 33592); and 3mg/ml for the standard strain of E. coli (ATCC 8739) and two bacterias isolated from mastitic milk. However, a strong cytotoxic effect on MAC-T cells was found. Oil concentrations from 10µg/mL resulted in over 90% of cell death. The results suggest that although the antimicrobial activity was identified against the main agents of bovine mastitis, the intramammary use of T. minuta oil may not be recommended. On the other hand, it is important to highlight the sensibility of the MSRA strain to the essential oil, which evidences its potential as an antiseptic or sanitizer.

Keywords: antimicrobial activity, *Tagetes minuta*, mastitis, natural products

Recebido em 4 de abril de 2018

Aceito em 4 de dezembro de 2018

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: shirley.kuhnen@ufsc.br

INTRODUÇÃO

A mastite é a inflamação do parênquima da glândula mamária, responsável por mudanças físicas e químicas no leite, além de alterações histológicas. Essa infecção é causada comumente por bactérias, além de fungos e algas (Divers e Peek, 2008). Os agentes etiológicos podem ser classificados em organismos contagiosos ou causadores de mastite ambiental. Os agentes contagiosos são transmitidos por vacas que apresentam glândulas mamárias infectadas para vacas sadias. Entre esses, a bactéria *Staphylococcus aureus* é a de maior ocorrência (Smith, 2009). Os organismos classificados como ambientais são aqueles presentes no ambiente onde está a vaca, como o solo, a água, o esterco, a cama, etc. Nesse grupo, a bactéria mais patogênica é a *Escherichia coli* (Divers e Peek, 2008).

Por se tratar de uma doença comumente causada por bactérias, a classe medicamentosa mais utilizada para o tratamento da mastite é a dos antimicrobianos (Smith, 2009; Divers e Peek, 2008). No entanto, o uso indiscriminado desses fármacos tem promovido preocupação quanto a sua utilização e ao desenvolvimento da resistência das bactérias aos medicamentos, que pode se perpetuar ao longo da cadeia produtiva do leite até à mesa do consumidor (White e Mcdermott, 2001).

Ao avaliarem a resistência bacteriana diante de antibióticos, Medeiros et al. (2009) reportaram que dos 291 isolados de *Staphylococcus* spp., 181 eram multirresistentes aos diferentes fármacos estudados. Já Vieira et al. (2012) encontraram resíduos de antibióticos em 19% de 79 amostras de leite pasteurizado tipo B coletadas em estabelecimentos comerciais no estado do Paraná. Portanto, embora haja uma legislação regulamentando a presença desses resíduos, não há rigor, por parte dos produtores, em cumpri-la e, tampouco, uma fiscalização eficiente por parte de órgãos fiscalizadores. Em contraponto a esse cenário, há uma fração crescente da população que se preocupa com a origem do produto que está na sua mesa, impulsionando a produção de alimentos orgânicos em todo o mundo, inclusive no Brasil.

No entanto, um dos grandes entraves à produção orgânica leiteira é o manejo sanitário, sobretudo

o da mastite, uma vez que o leite de vacas medicadas deve ser descartado durante duas vezes o período de tempo de carência do medicamento (Brasil, 2011). Sanches e Soares (2012) destacam que alguns estudos têm proposto investigar o uso de plantas medicinais, incluindo seus óleos essenciais, para o tratamento da mastite bovina. Dentre eles, destacam-se o estudo da atividade antibacteriana do óleo de canela-da-china (*Cinnamomum cassia*) e o de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) contra patógenos causadores de mastite (Zhu et al., 2016; Aiemsaard et al., 2011).

A planta *Tagetes minuta* L. é nativa da América do Sul e popularmente conhecida como chinchilho (Holm et al., 1997). É uma planta pouco ramificada, que pode chegar até 2 metros de altura, e se caracteriza pelo forte odor proveniente do óleo produzido por glândulas presentes nas folhas (Lorenzi, 2008). Os extratos e o óleo da *T. minuta* vêm sendo estudados por suas propriedades medicinais (Lorenzi, 2008), bem como por sua atividade inseticida (Cestari et al., 2004), repelente (Gillij et al., 2008), nematicida (Junges et al., 2009), antioxidante, anti-inflamatória (Karimian et al., 2014; Holm et al., 1997) e antimicrobiana (Senatore et al., 2004; Souza et al., 2000). Senatore et al. (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo proveniente de diferentes origens, tendo verificado CIMs que variaram entre 6,25 e 25 µg/mL para bactérias Gram-positivas e entre 25 e 50 µg/mL para as Gram-negativas. Apesar do seu potencial como antimicrobiano, nenhum dos estudos realizados com *T. minuta* incluiu a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato ou do óleo essencial ao tecido da glândula mamária, visando ao seu uso intramamário. Portanto, o objetivo nesta pesquisa foi avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. em relação a duas principais bactérias causadoras de mastite bovina, *i.e.*, *S. aureus* e *E. coli*, assim como a citotoxicidade sobre células epiteliais da glândula mamária bovina da linhagem MAC-T.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *Tagetes minuta* L. foram adquiridas comercialmente, e as mudas obtidas foram transferidas para o solo da Fazenda Experimental da Ressacada, da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, SC). As plantas não

Atividade antimicrobiana...

apresentaram ataques por insetos, tendo sido realizado apenas o manejo preventivo com a pulverização de óleo de neem (três vezes) e a aplicação de biofertilizante (seis vezes) contendo urina de vaca, ao longo da permanência das plantas no campo. A coleta foi realizada em dezembro de 2015, durante a floração das plantas, cerca de oito meses após o transplante das mudas. Logo após a coleta, as plantas foram pesadas e acondicionadas em estufa de ventilação forçada, por um período de 24 h, e depois armazenadas em *freezer* a -80°C para posterior extração do óleo.

A extração do óleo essencial foi feita por hidrodestilação, em aparelho *Clevenger*, pelo período de duas horas (Mechkovski e Akerele, 1992). Foram utilizadas cerca de 70 g de matéria seca da parte aérea da planta e 1000 mL de água em um balão volumétrico. O rendimento de óleo foi determinado pela graduação da bureta do aparelho *Clevenger*, levando em consideração o peso da planta no balão de extração e a quantidade de óleo obtida. O óleo foi armazenado a -20°C até a realização das análises pretendidas.

A determinação da composição química do óleo extraído de *T. minuta* foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu – Japão; modelo GCMS-QP2010), de acordo com a metodologia descrita por EL-Deeb *et al.* (2004). Para isso, foi utilizada uma coluna capilar de sílica RTX[®]-5MS (Restek – Japão; 30m x 0,25mm) e hélio como gás de arraste, em um fluxo de 25 mL/min. A temperatura utilizada variou de 60 a 200°C , com um aumento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A injeção foi realizada em modo split: 1:50, contendo 200 μL da amostra (200 μL + 400 μL de hexano). A identificação dos compostos foi realizada considerando-se os resultados obtidos em bibliotecas de massas, por meio do *software* GCMSolution (EL-Deeb *et al.*, 2004).

Os testes antimicrobianos foram realizados pela técnica de microdiluição em caldo, conforme a metodologia descrita na Norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (Methods..., 2006), para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e cinco isolados de campo provenientes de leite mastítico, uma cepa de *S.*

aureus ATCC 33592 resistente à metilina (MRSA), *Escherichia coli* ATCC 8739 e dois isolados de campo de *E. coli*. Os isolados bacterianos foram semeados por plaqueamento em superfície, em placas de Petri, com meio Agar Muller Hinton, e as placas incubadas a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. A densidade populacional inicial dos inóculos foi padronizada utilizando-se o controle de turbidez da escala McFarland de 0,5, o qual equivale a uma suspensão contendo de 10^7 a 10^8 UFC/mL. Nos testes, foi utilizada a diluição de 10^5 UFC/mL do inóculo em solução salina (0,9%).

O óleo essencial foi preparado por emulsificação, com etanol (8%), em diferentes concentrações, que variaram de 30 a 0,01 mg/mL. Para a realização do ensaio, em cada poço de uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 100 μL da emulsão, 100 μL de caldo Muller Hinton e 10 μL do inóculo (10^5 UFC/mL). A placa foi acondicionada a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, por cerca de 18 a 24 h. Em todos os ensaios, incluíram-se os controles negativos, que consistiram em (a) inóculo + meio Muller Hinton e (b) diferentes concentrações da emulsão + caldo Muller Hinton. O caldo sem bactéria foi utilizado como controle estéril. Além disso, inicialmente o efeito antimicrobiano do etanol 8% (inóculo + meio Muller Hinton + etanol 8%) foi testado, não tendo sido encontrada redução do crescimento bacteriano na concentração utilizada. Após o período de incubação das microplacas, as absorbâncias foram determinadas a 600 nm, em um leitor de microplacas (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc.), e a porcentagem de redução do crescimento bacteriano foi calculada conforme a equação:

$$\text{ICM (\%)} = [1 - (A_c/A_0)] \times 100,$$

em que: ICM representa a inibição do crescimento microbiano, A_c representa a absorbância da concentração de óleo testada subtraída do valor da absorbância da mesma concentração do óleo sem a adição do inóculo e A_0 representa a média das absorbâncias do controle de crescimento microbiano (sem óleo) (Gudiña *et al.*, 2010). O resultado quantifica a porcentagem de células microbianas que foram inibidas pela ação do óleo essencial. Estabeleceu-se que a concentração que apresentasse um percentual de inibição superior a 80% seria considerada a CIM (Methods..., 2006). Para uma confirmação visual, após a leitura dos

valores de absorvância, utilizou-se o revelador resazurina (100 µg/mL). Foram adicionados 50 µL do revelador em cada um dos poços das microplacas. No decorrer de 30 min para *S. aureus* e 2 horas para *E. coli*, foi realizada a leitura, que consistiu na avaliação das cores azul, representando ausência de crescimento bacteriano, e rosa, representando a presença de crescimento bacteriano. Esse processo ocorre por meio de uma reação de redução da resazurina em resarufina (Palomino *et al.*, 2002).

O teste de citotoxicidade foi realizado sobre células epiteliais da glândula mamária bovina da linhagem MAC-T para verificar a concentração inibitória de 50% de crescimento celular (IC50). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) e suplementadas com 20% de soro fetal bovino (SFB), 4 mM de L-glutamina, 4,5 g/L de glicose, 1 mM de piruvato de sódio, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 5 µg/mL de insulina e 1 µg/mL de hidrocortisona. O meio foi trocado a cada 48 h, as células mantidas em cultura a 37°C, e a atmosfera modificada a 5% de CO₂. Quando as células atingiam confluência, foram tratadas com 0,25% de tripsina, lavadas com PBS e contadas em câmara de Neubauer. Os testes foram executados em microplacas de 96 poços e foi utilizada a concentração de 10.000 células por poço. A citotoxicidade do óleo sobre as MAC-T foi realizada pelo método do brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT), com modificações. Para isso, ao meio de cultura contendo as células aderentes, foram acrescidas diferentes concentrações do óleo essencial (0,1 a 1000 µg/mL) emulsificado em DMSO (dimetilsulfóxido; 0,5%) e DMEM (100 µL/poço). Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera modificada contendo 5% de CO₂, os poços foram lavados duas vezes com PBS (100 µL/poço), e o MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado e incubado por mais 2 h. Neste ensaio, quantifica-se quanto do MTT presente no meio é metabolizado a formazan (cristais de cor azul) (Reuter *et al.*, 2008).

Assim, a quantidade de formazan foi medida por espectrofotometria, em leitor de microplacas a 546 nm (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc.), e considerada diretamente proporcional ao número de células viáveis. O controle (*i.e.*, meio fresco contendo 0,5% de DMSO) foi considerado como

100% de células viáveis. Os experimentos foram realizados em triplicata. O cálculo do IC50 foi feito por meio do programa Prism 5 (Graph Pad, San Diego, CA).

Para os ensaios antimicrobianos, a variável % de inibição foi analisada pelo procedimento MIXED do SAS (versão 9.2). Para análise de *E. coli*, o modelo incluiu o efeito fixo do isolado (1 grau de liberdade = GL), a concentração (7 GL) e sua interação (7 GL); para *S. aureus*, os efeitos fixos de isolado (4 GL) e a concentração (7 GL). Comparações pareadas foram determinadas por meio do LSMEANS. Foram utilizadas as médias de dois experimentos independentes, com cinco réplicas cada. Na análise da cepa de *S. aureus* multiresistente, foram testadas oito concentrações (7GL) e foi realizada uma repetição do experimento. Para o teste de citotoxicidade, foram utilizadas as médias de três experimentos independentes, com seis réplicas cada. Neste caso, os dados foram analisados por ANOVA, com P<0,01, mediante a utilização do programa Prism 5 (Graph Pad, San Diego, CA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização química do óleo de *T. minuta* em estudo mostrou que os componentes majoritários foram cis-tagetona (24,24%), di-hidrotagetona (16,65%), 1,3,6-octatrieno-3,7-dimetil-E (13,61%), trans-ocimenona (13,52%) e cis-ocimenona (10,06%) (Tab.1). Tais resultados diferem dos encontrados por Garcia *et al.* (2012), que verificaram, em amostras provenientes da região Centro-Oeste do Brasil, maiores teores de di-hidrotagetona (54,21%), limoneno (6,96%), tagetona (6,73%) e β-ocimeno (5,11%). Por outro lado, Gil *et al.* (2000) constataram, em amostras da Argentina, maiores quantidades de di-hidrotagetona, α-felandrena, limoneno, ocimeno, b-ocimeno, tagetona e tagetenona. Esses resultados demonstram, portanto, que a composição química do óleo varia muito com o local do cultivo. Em relação ao rendimento do óleo essencial das amostras em estudo, encontrou-se 1,57%. Singh *et al.* (2006) encontraram resultados similares quando avaliaram o rendimento do óleo em plantas de *T. minuta* cultivadas em região subtropical do norte da Índia.

Atividade antimicrobiana...

Tabela 1. Composição química do óleo de *T. minuta* em estudo

Pico	Nome	Área relativa (%)	Rt	M ⁺	Pico base
1	Dicloropropilacetileno	0,15	4,441	106	91
2	Curazol-2E4MZ	0,35	5,048	110	95
3	(+)-Sabineno	0,16	5,802	136	93
4	(+)-β-pineno	0,17	5,894	136	93
5	1, 3, 6-octatrieno-3, 7-dimetil-E	13,61	6,611	136	93
6	1, 3, 7-octatrieno-3, 7-Dimetil-E	0,14	6,771	136	93
7	Di-hidrotagetona	19,65	6,882	154	85
8	Neral	0,39	7,186	152	83
9	2-ciclohexen-1-ol	1,19	7,456	152	110
10	β-linalol	0,37	7,516	154	93
11	2,2,4,5-tetrametil-2H imidazol	0,38	7,736	124	83
12	α-linalol-2-penten-4-ona	0,78	7,968	154	81
13	5-isopropil-3,3-dimetil-2-metileno, 2, 3-di-hidrofurano	0,33	8,074	152	137
14	Trans-tagetona	2,04	8,190	152	95
15	Cis-tagetona	24,24	8,346	152	95
16	Trans-tagetona	0,51	8,458	152	95
17	Tetradec-(11E)-en-1-ol	0,31	8,536	212	82
18	Borneol	0,21	8,658	154	95
19	P-ment-1-en-4-ol	0,18	8,783	154	93
20	Biciclo [6.1.0] nonano,9-(1-metiletilideno)	0,64	8,947	164	93
21	Menta-1(+),8-dien-2-ol-trans ocimenona	0,26	9,075	152	109
22	Trans-ocimenona	0,09	9,143	150	150
23	Cis-ocimenona	10,06	9,469	150	135
24	Trans-ocimenona	13,52	9,602	150	135
25	Espiro[4,5]dec-8-en-7-ona, 1,8-dimetil-4(1-metiletil)	0,20	9,717	220	83
26	8-oxabicyclo-[5.1.0]-oct-5-en-2-ol-1, 4, 4-trimetil	0,99	9,838	168	125
27	S-(+)-isopiperitenona	1,76	10,127	150	82
28	α-fenchil acetato	0,17	10,307	196	95
29	Biciclo [6.1.0]-nonano, 9-(1-metiletilideno)	0,15	10,491	164	93
30	(+)-Isodi-hidrocarvona	0,13	10,816	152	95
31	2H-2,4A-etanonaftaleno, 1,3,4,5,6,7-hexa-hidro-2,5,5-trimetil	0,24	10,949	204	175
32	1,1, 4A-trimetil-5, 6-dimetileno-decahidronaftaleno	0,41	11,218	204	122
33	Etanol, 2-(3, 3-dimetil biciclo[2.2.1]-hept-2-ilideno	0,21	11,416	166	166
34	Isoeugenil fenilacetato	2,45	11,780	282	164
35	Biciclo [7.2.0]-undec-4-eno, 4, 11, 11-trimetil-8-metileno	1,22	12,246	204	91
36	α-cis-bergamoteno	0,32	12,313	204	119
37	α-humuleno	0,31	12,682	204	93
38	Sesquisabineno	0,51	12,973	204	93
39	D-gemacreno	0,53	13,008	204	105
40	β-bisaboleno	0,67	13,198	204	93

Na Fig. 1, estão representadas as curvas de inibição do crescimento de *S. aureus* (ATCC 25923 e isolados de campo), *E. coli* (ATCC 8739 e isolados de campo) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (ATCC 33592). Para *S. aureus*, 1 mg/mL do óleo essencial reduziu cerca de 80% do crescimento bacteriano (Fig. 1A). A revelação da placa com o corante resazurina após a leitura em espectrofotômetro confirmou que 1 mg/mL do óleo é a concentração inibitória mínima (CIM) para esse micro-organismo. Esse valor está acima do encontrado por Senatore *et al.* (2004), que testaram o óleo essencial de *T. minuta* proveniente de diferentes países, para essa mesma espécie de bactéria. Os valores de CIM registrados pelos autores foram de 25, 50 e

100 µg/mL, para amostras do Reino Unido, Egito e África do Sul, respectivamente. Enquanto o óleo do Reino Unido apresentava maiores teores de di-hidrotagetona (34,3%), cis-tagetona (23%) e trans-tagetona (17,1%), os óleos essenciais originários do Egito e da África do Sul possuíam maiores teores de cis-β-ocimenona (50,9 e 32,2%, respectivamente). Já Shizari *et al.* (2014), ao avaliarem a atividade do óleo de *T. minuta* cultivado no Irã, verificaram que a CIM para *S. aureus* foi de 67±8 µg/mL, resultado também muito inferior ao encontrado no presente estudo. O óleo testado possuía maiores teores de di-hidrotagetona (33,9%), E-ocimenona (19,9%) e tagetona (16,1%).

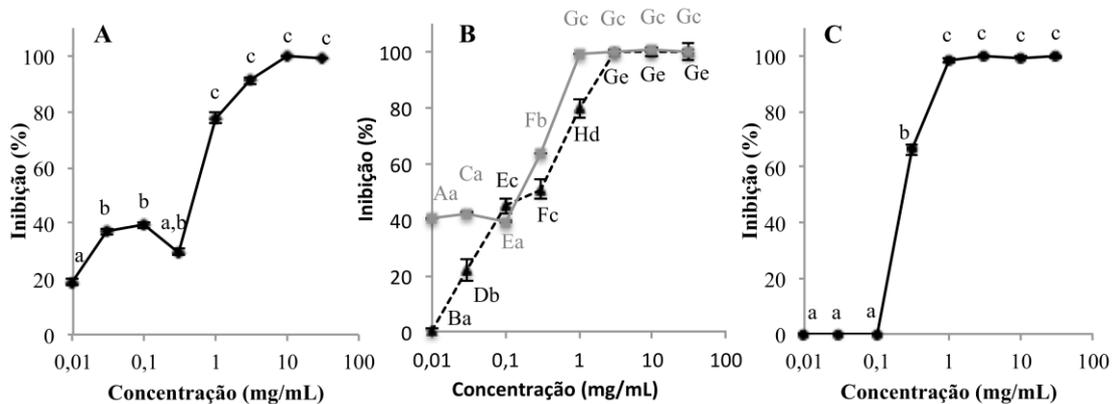


Figura 1. Concentração inibitória mínima (mg/mL) (média \pm erro-padrão da média) do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre (A) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e isolados de campo), (B) *Escherichia coli* (■ ATCC 8739 e ▲ isolados de campo) e (C) *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 33592). (A, C) Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre as concentrações ($P < 0,01$). (B) Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre as concentrações, e letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre as bactérias ($P < 0,001$).

Para *E. coli*, foi observada diferença entre a CIM encontrada para a cepa-padrão ATCC 8739 (1 mg/mL) e para o isolado de campo (3 mg/mL) (Fig. 1B). Tais diferenças podem ser, em parte, explicadas pela diversidade genética entre elas, o que acarreta resistência distinta. Um isolado de campo tende a ser mais agressivo quando comparado a uma cepa de referência. Contudo, tais resultados de CIM se diferenciam dos encontrados também por Senatore *et al.* (2004). Esses autores observaram uma CIM de 100 µg/mL para *E. coli*. Da mesma forma, Shizari *et al.* (2014) registraram 90% de inibição dessas bactérias com 165±9 µg/mL de óleo, valor muito inferior ao encontrado no presente estudo. Esses

valores superiores de CIM, do presente estudo, podem ser decorrentes da variação existente na composição química do óleo. Desse modo, variações na composição química do óleo decorrentes do local de cultivo precisam ser mais investigadas antes de se sugerir o seu uso terapêutico. Os diversos estudos que avaliaram o óleo essencial da *T. minuta* por CG-MS indicaram que os terpenos presentes variam em quantidade e qualidade, de acordo com o estágio de crescimento da planta no momento do corte (Moghaddam *et al.*, 2007), a localização geográfica, os nutrientes presentes no solo (Singh *et al.*, 2006), a parte da planta colhida (Chamorro *et al.*, 2008), entre outros.

Atividade antimicrobiana...

No teste com a cepa de *S. aureus* resistente à meticilina ATCC 33592, a CIM encontrada foi de 1 mg/mL (Fig. 1C), de maneira similar a cepa-padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e os isolados de campo. Esse resultado gera uma expectativa promissora quanto ao desenvolvimento de um produto que possa ser usado no controle de bactérias resistentes à meticilina, uma vez que esta é causa frequente de

morbimortalidade, principalmente em pacientes imunodeprimidos, embora o seu mecanismo de ação precise ser investigado (Luna *et al.*, 2010).

Quanto ao efeito do óleo essencial sobre as células epiteliais da glândula mamária, verificou-se alta citotoxicidade com uma inibição de mais de 90% do crescimento celular a partir de 10 µg/mL (Fig. 2).

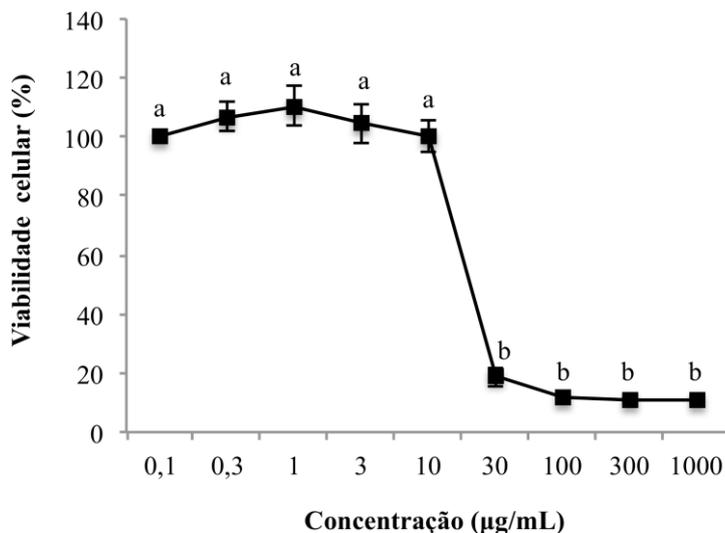


Figura 2. Citotoxicidade (µg/mL) (média +/- erro-padrão da média) do óleo essencial de *Tagetes minuta* em células epiteliais da glândula mamária MAC-T. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as concentrações ($P < 0,01$).

O valor constatado de IC50 do óleo sobre esse tipo celular foi de apenas 26,24 µg/mL. Em outros tipos celulares (células KB e HepG2), as concentrações do óleo de *Tagetes* que reduziram significativamente a viabilidade celular foram 50–200 µg/mL (Shizari *et al.* 2014). Por outro lado, Karimian *et al.* (2014) registraram atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *T. minuta*, originário do Irã, utilizando macrófagos como modelo na concentração de 50 µg/mL. Os principais componentes do óleo de *T. minuta* estudado pelos autores eram dihidrotagetona (33.86%), E-ocimenona (19.92%), tagetona (16.15%), cis-β-ocimenona (7.94%) e Z-ocimenona (5.27%). No presente estudo, o óleo reduziu significativamente a oxidação de NADH, a síntese de óxido nítrico e a expressão do mRNA do TNF-α. Esse resultado indica que o produto possui um potencial de modulação ou

diminuição de respostas imunológicas, sugerindo a possibilidade de uso interno. No entanto, esses efeitos devem estar relacionados a uma composição química distinta da amostra em estudo, devendo-se, portanto, aprofundar o estudo com os compostos do óleo para elucidar quais são os principais terpenos responsáveis pelas atividades observadas.

Sugerem-se estudos futuros envolvendo a encapsulação do óleo visando à elaboração de um possível produto para a utilização externa (i.e., teto do animal) em concentrações intermediárias (entre 0,3 mg/mL e 3 mg/mL) que poderiam impedir a entrada de bactérias no sistema mamário da vaca, ou para desinfecção de insumos utilizados na ordenha, ou ainda para tratar infecções causadas por micro-organismos provocadas por MRSA.

CONCLUSÕES

O óleo essencial de *T. minuta* possui atividade antimicrobiana para as duas principais espécies causadoras de mastite, *E. coli* e *S. aureus*, incluindo uma cepa multirresistente. No entanto, mesmo em concentrações muito baixas, elevado efeito citotóxico foi encontrado sobre as células MAC-T, sugerindo um potencial dano ao tecido se o seu emprego for intramamário.

REFERÊNCIAS

- AIEMSAARD, J.; AIUMLAMAI, S.; AROMDEE, C. *et al.* The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Res. Vet. Sci.*, v.91, p.31-37, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.46, de 06 de outubro de 2011. Estabelece o Regulamento Técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal, bem como as listas de substâncias permitidas para uso nos sistemas orgânicos de produção animal e vegetal, na forma desta Instrução Normativa e dos seus anexos I a VII. *Diário Oficial da União*, Brasília, 7 out., 2011. Seção 1.
- CESTARI, I.M.; SARTI, S.J.; WAIB, C.M.; CASTELLO BRANCO JR, A. Evaluation of the potential inseticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Neotrop. Entomol.*, v.33, n.6, 2004.
- CHAMORRO, E.R.; BALLERINI, G.; SEQUEIRA, A.F.; VELASCO, G.A. *et al.* Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. *J. Argent. Chem. Soc.*, v.96, p.80-86, 2008.
- DIVERS, T.J.; PEEK, S.F. *Rebhun's diseases of dairy cattle*. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 2008. 704p.
- EL-DEEB, K.S.; ABBAS, F.A.; FISHAWY, A.E.; MOSSA, J.S. Chemical composition of the essential oil of *tagetes minuta* growing in Saudi Arabia. *Saudi Pharmacol. J.*, v.12, p.51-53, 2004.
- GARCIA, M.V.; MATIAS, J.; BARROS, J.C. *et al.* Chemical identification of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its acaricidal effect on ticks. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.21, p.405-411, 2012.
- GIL, A.; GHERSA, G.M.; LEICACH, S. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochem. Syst. Ecol.*, v.28, p.261-274, 2000.
- GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresour. Technol.*, v.99, p.2507-2515, 2008.
- GUDIÑA, E.J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.50, p.419-424, 2010.
- HOLM, L.D.J. *et al.* *Tagetes minuta* L. asteraceae (Compositae) aster family. In: _____. *et al.* *World weeds: natural histories and distribution*. New York: John Wiley & Sons, 1997. p.822-827.
- JUNGES, E.; MORENO, M.; LIMA, D.; GOMES, C. Efeito do extrato aquoso e do óleo essencial de *Tagetes minuta* aplicados ao solo sobre a penetração de J2 de *Meloidogyne incognita* em tomateiros. *Rev. Bras. Agroecol.*, v.4, p.1027-1030, 2009.
- KARIMIAN, P.; KAVOOSI, G.; AMIRGHOFAN Z. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, v.4, p.219-227, 2014.
- LORENZI, H. *Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas*. 2.ed. São Paulo: Nova Odessa, 2008. 512p.
- LUNA, C.M.; RODRIGUEZ-NORIEGA, E.; BAVESTRELLO, L.; GOTUZZO, E. Tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.14, Suppl.2, p.S121-S129, 2010.
- MECHKOVSKI, A.; AKERELE, C.O. *Quality control methods for medicinal plant materials*. Switzerland: World Health Organization, 1992. 122p.

Atividade antimicrobiana...

- MEDEIROS, E.S.; MOTA, R.A.; SANTOS, M.V. *et al.* Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus spp.* isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.29, p.569-574, 2009.
- METHODS for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6.ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA: CLSI, 2006.
- MOGHADDAM, M.; OMIDBIAGI, R.; SEFIDKON, F. Changes in content and chemical composition of *Tagetes minuta* oil at various harvest times. *J. Essent. Oil Res.*, v.19, p.18-20, 2007.
- PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M. *et al.* Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.46, p.2720-2722, 2002.
- REUTER, S.; EIFES, S.; DICATO, M. *et al.* Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem. Pharmacol.*, v.76, p.1340-1351, 2008.
- SANCHES, C.R.; SOARES, J.P.G. Certificação da produção orgânica de leite. In: SOARES, J.P.G. (Ed.). *Curso cadeia produtiva do leite orgânico*. Brasília: Embrapa, 2012.
- SENATORE, F.; NAPOLITANO, F.; MOHAMED, M.A.H. *et al.* Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. *Flavour Frag. J.*, v.19, p.574-578, 2004.
- SHIZARI, M.T.; GHOLAMI, H.; KAVOOSI, G. *et al.* Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. *Food Sci. Nut.*, v.2, p.146-155, 2014.
- SINGH, A.; KHANUJA, S.P.S.; ARYA, S.J.K. *et al.* Essential oil quality and yield with respect to harvest index in *Tagetes minuta* cultivated in sub tropical plains of North India. *J. Essent. Oil Res.*, v.18, p.362-365, 2006.
- SMITH, B.P. *Large animal internal medicine*. 4.ed. St. Louis: Mosby, 2009. 1872p.
- SOUZA, C.A.S.; AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L.- *Compositae* (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.37, p.1-9, 2000.
- VIEIRA, T.S.W.J.; RIBEIRO, M.R.; NUNES, M.M. *et al.* Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil. *Semin. Ciênc. Agrár.*, v.33, p.791-796, 2012.
- WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F. Emergence and transfer of antibiotic resistance. *J. Dairy Sci.*, v.84, Suppl., p.E151-E155, 2001.
- ZHU, H.; DU, M.; FOX, L.; ZHU, M.J. Bactericidal effects of *Cinnamon cassia* oil against bovine mastitis bacterial pathogens. *Food Control*, v.66, p.291-299, 2016.