

EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *Tagetes minuta* L. COMO POTENCIAL DESINFETANTE E CARRAPATICIDA NA PRODUÇÃO DE BOVINOS

DANIELA APARECIDA MOREIRA¹; JACKELINE VIERIA LIMA²; MARCIELE COSTA COLVAR³; SARA DA SILVA SANTIAGO⁴; MARIA CLARA GOMES BITTENCOURT SANTOS⁵; LUIZ FILIPE DAMÉ SCHUCH⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – danikmoreira.vet@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – jackeline-vieira1@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marcielec@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – sara.santiago.ufpel@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – mariaclarabittn@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – lfdschuch@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Para a produção leiteira e pecuária, a mastite e o ectoparasitismo são as doenças mais comuns e importantes, pois geram impactos à saúde e bem-estar animal e perdas econômicas (OLIVEIRA; RUEGG, 2014). Além disso, o carrapato *Rhipicephalus microplus*, parasita de maior relevância, é responsável pela transmissão dos agentes infecciosos *Anaplasma marginale* e *Babesia sp.*, causadores do Complexo Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (ALVES et al., 2021). A prevenção e o controle dessas infecções são feitos com a utilização de produtos antimicrobianos e carrapaticidas convencionais. No entanto, seu uso inadequado ocasiona desenvolvimento de organismos resistentes (SHARMA et al., 2018).

Nesse contexto, a busca por produtos alternativos eficazes e redução das contaminações, evidenciam a fitoterapia como uma ferramenta promissora, trazendo benefícios ao animal, à produção e também ao meio ambiente. Atualmente o uso de diversas espécies de plantas medicinais tem se destacado também no meio veterinário, como *Tagetes minuta* L., uma planta usada no tratamento de enfermidades respiratórias, digestórias, hepáticas, e conhecida por suas propriedades antifúngicas, anti-inflamatórias e antiparasitárias (BRASIL, 2015) na medicina humana. Assim, o presente estudo teve como objetivo testar extratos hidroalcoólicos de *T. minuta* L. como desinfetante e acaricida para contribuir na busca por alternativas sustentáveis de controle e tratamento das enfermidades.

2. METODOLOGIA

Os extratos foram preparados à 10% (m/v) de planta em soluções hidroralcoólicas com etanol e metanol a 80% (v/v) e filtrados (SCHUCH et al., 2008). Após, rotaevaporados (Evaporador Rotativo Microprocessado Q344M2) à 50°C e pressão negativa de 600 mm/Hg, liofilizados (Liofilizador L101 LiOTOP®) por 48 horas e armazenados à -20°C. Para uso nos testes, foram ressuspendidos à 2% (m/v) em água destilada e Tween 80 à 1% (m/v), e autoclavados. Amostras autoclavadas e não autoclavadas, foram encaminhadas ao Laboratório de Bioquímica e Produtos Naturais-LABINAT/UFSC, para análise da composição geral de fenólicos e flavonóides.

Os extratos nas concentrações entre 10mg/mL a 0.078mg/mL foram testados para Concentração Inibitória Mínima (CIM), realizada em microplacas de 96 poços por microdiluição em caldo (CLSI, 2016), frente às cepas padrão *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *E. coli* ATCC 25922, e um isolado

de campo de *S. aureus* resistente à meticilina (SARM). Para leitura, após 24 horas de incubação à 37°C, foi feito o plaqueamento de 3µL de cada orifício em placas de Petri com Ágar Triptona de Soja (TSA) incubadas por 24h. As microplacas ainda receberam 50 µL do revelador resazurina a 0,01% (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido, Merk®, EUA) (100 µg/mL) e foram novamente incubadas por 30 min, para verificação da CIM.

O teste desinfetante foi realizado conforme a Norma Padrão Europeia (BSEN1040, 2005), com modificações, com tempos de contato de 15 e 30 minutos e cada teste teve um controle negativo de crescimento utilizando hipoclorito de sódio à 2% (v/v) e três repetições. Os microrganismos testados foram as cepas padrão de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, considerando eficácia ao atingir redução de cinco logs do inóculo inicial (10⁸ UFC/mL).

O biocarrapaticidograma, foi realizado com o Teste de Drummond e avaliou mortalidade e índice de eficácia dos extratos à 2% e 1% (m/v) através do Teste de Imersão para Adultos (TIA). O tempo de contato foi de cinco minutos, e teve controle positivo com produto comercial a base de cipermetrina fenthion e clorpirifós, e controle negativo com água, também em três repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentro dos compostos fenólicos, os flavonóides formaram sua maior parte nas análises dos dois extratos, no entanto, o uso de calor e pressão sobre produtos de origem natural causam danos à composição e até à eficácia dos mesmos, principalmente em compostos de alta volatilidade como estes (SIMÕES et al., 2003). Tais alterações ficaram evidenciadas pois houve redução de compostos nas amostras autoclavadas analisadas em comparação às não autoclavadas.

No teste de atividade antimicrobiana, os dois extratos apresentaram efetividade (Tabela 1), variando sua CIM entre 0,208 mg/mL frente a *S. aureus* ATCC com extrato etanólico e 2,5 mg/mL frente a *E. coli* com os dois extratos.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos metanólico e etanólico de *T. minuta* frente às cepas bacterianas testadas.

Cepas Bacterianas	CIM (mg/mL) extrato metanólico	CIM (mg/mL) extrato etanólico
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,625	0,208
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15422	1,666	1,25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,5	2,5
<i>S. aureus</i> (SARM) isolado de campo	0,625	0,312

*Os valores de CIM estão expressos em médias, calculadas a partir das três repetições realizadas nos testes para cada bactéria e cada extrato.

O extrato etanólico teve médias de CIM menores em comparação ao metanólico, exceto frente a *E. coli*. Vale ressaltar que o processo de armazenamento pós liofilização se deu de maneira distinta entre os extratos, sendo o extrato etanólico liofilizado já em frascos alíquotados e o extrato metanólico seco em bandejas e depois, homogeneizado e fracionado em tubos para armazenamento. Tal processo pode ter sido responsável pela absorção de umidade, aumentando o peso bruto do conteúdo seco, reduzindo proporcionalmente seus compostos.

A leitura da CIM com revelador resazurina (Figura 1) evidenciou as bactérias que permaneceram viáveis através da conversão da resazurina em resorufina pelas bactérias, alterando sua coloração para rosa, indicando a presença de atividade

metabólica (PALOMINO et al., 2002), também confirmada pelo crescimento das alíquotas plaqueadas nas placas de Petri e incubadas.

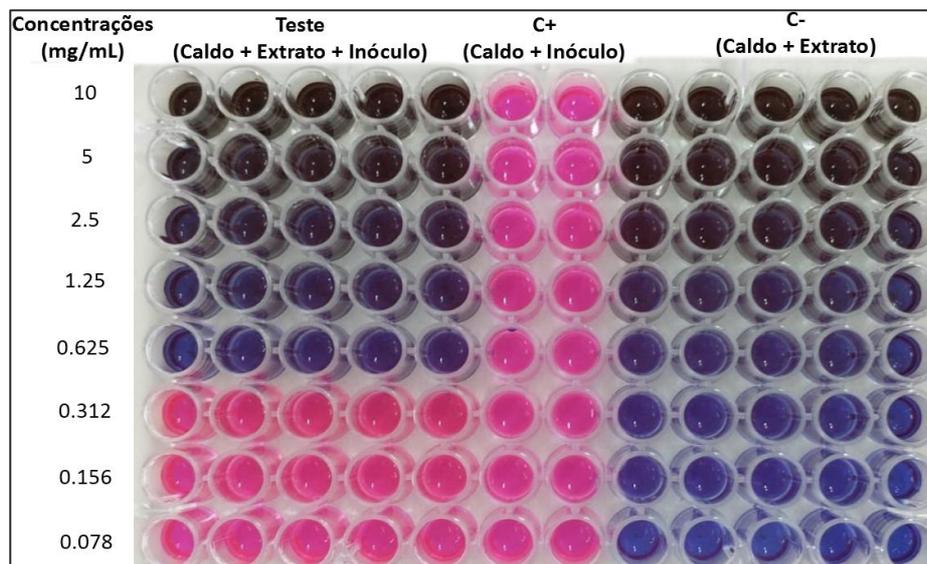


Figura 1. Imagem da microplaca com revelador resazurina, evidenciando a CIM na última linha azul e viabilidade metabólica das bactérias na coloração rosa.

Estudos testando a mesma cepa padrão *S. aureus* e produtos mais elaborados da planta encontraram CIM elevadas à deste trabalho (SPERANDIO et al., 2019; BOLZAN, 2018). Testes com extratos hidroalcoólicos desta planta também demonstraram eficácia, no entanto, as concentrações dos extratos eram preparadas a partir de uma base líquida (OLANDA et al., 2019). Os extratos utilizados neste estudo foram secos e liofilizados para conservar as propriedades extraídas, facilitar o armazenamento e determinar com maior precisão as concentrações das soluções em percentual de matéria seca (g/100mL) (SIMÕES et al., 2003).

No teste de atividade desinfetante, os extratos não atingiram a redução de 5 logs necessária para serem considerados como eficazes. Outros produtos de *T. minuta* foram testados como desinfetantes, com um requinte maior de elaboração, como nanopartículas ou óleos essenciais e atingiram a redução de 5 logs do inóculo inicial frente às bactérias (BOLZAN, 2018; MOREIRA, 2021). No entanto, essa complexidade de preparo das soluções é um fator limitante na obtenção e acesso a estas apresentações. Ainda, a ação carrapaticida também ficou abaixo do referido como adequado, não sendo atingidos os níveis de ao menos 80% de eficácia carrapaticida (BRASIL, 2020). Outros testes com óleo essencial de *T. minuta*, foram descritos eficazes, porém em concentrações bem acima das estudadas aqui, cerca de 20 a 25% (BARROS et al., 2019).

4. CONCLUSÕES

Os extratos de *Tagetes minuta* testados tem ação antibacteriana em concentrações inferiores a 2,5 mg/mL, inclusive sobre bactérias Gram negativas, remetendo a um produto promissor para utilização na bovinocultura. Porém, nas concentrações testadas, os efeitos desinfetante e carrapaticida foram insuficientes para uso. Mais trabalhos, utilizando outras concentrações e/ou formulações dos extratos, devem ser realizados para comprovar sua eficácia para esses fins.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, K. C. S. et al. Alternative methods for the control of ticks: bibliometric analysis. **Brazilian Journal of Development**. v. 7, n. 4, p. 37905-37920, 2021.

BARROS, J. C. et al. Óleo essencial de *Tagetes minuta* como fitoterápico no controle dos carrapatos. In: **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Capítulo 13. p. 169-180, 2019.

BOLZAN, K. P. **Desenvolvimento de suspensões nanoparticuladas com óleo essencial de *Tagetes Minuta* I. e sua aplicação no controle da mastite bovina**. Florianópolis. UFSC, 2018. 83p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas), Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Monografia da Espécie *Tagetes minuta* L. (Cravo-de-defunto)**. Brasília, DF. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Avaliação seletiva de bovinos para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus***. Secretaria de Inovação, Desenvolvimento Rural e Irrigação. – Brasília: MAPA, 2020.

MOREIRA, D. A. Atividade desinfetante in vitro de nanocápsulas do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. para o manejo da ordenha. Florianópolis. UFSC, 2021. 60p. **Dissertação** (Mestrado em Agroecossistemas), Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2021.

OLANDA, G. B.; BEVILAQUA, G. A. P.; SCHUCH, L. F. D.; et al. Extracts of *Tagetes minuta* L. front of bacteria regarding bovine mastitis. **Comunicata Scientiae**. v. 10, n. 1, p. 1-4, 2019.

OLIVEIRA, L.; RUEGG, P.L. Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51 large dairy herds in Wisconsin. **American Dairy Science Association**. 2014.

PALOMINO, J. C. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

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

SHARMA, C. et al. Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. **Front. Vet. Sci**. v. 4, 2018.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 2003.

SPERANDIO, J. et al. Atividade antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro* do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. visando à aplicação no controle da mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoo**. v. 71, n. 4, p. 1251-1259, 2019.