

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Atividade de diferentes formulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Lauren Sagave**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**Atividade de diferentes formulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens**

por

**Lauren Sagave**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

**Orientador: Sônia de Avila Botton**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**Universidade Federal de Santa Maria**  
**Centro de Ciências Rurais**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**  
**Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**Atividade de diferentes formulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol  
em isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens**

elaborada por

**Lauren Sagave**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**Comissão Examinadora:**

---

**Sônia de Avila Botton, PhD.** (UFSM)  
(Presidente)

---

**Valéria Dutra, Dr<sup>a</sup>.** (UFMT)

---

**Sydney Hartz Alves, Dr.** (UFSM)

Santa Maria, 12 de fevereiro de 2014.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me abençoar com toda a sorte possível.

A toda minha família, incluindo meu João, pelo amor incondicional, compreensão e, em especial, ao apoio de minha irmã Vivian.

A minha orientadora, Sônia de Avila Botton, pela oportunidade da concretização deste estudo.

A professora Maristela Lovato e ao professor Luis Antônio Sangioni e a professora Agueda Vargas, por todos os conhecimentos, momentos de alegria e incentivo.

À equipe do Laboratório de Bacteriologia e ao Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias. Trabalho nenhum se faz sozinho! Em especial, a Letícia Trevisan Gressler pelos auxílios sempre prestados.

Sem esquecer, é claro, da querida Valdete e da Maria José pela amizade presente.

Ao Departamento de Farmácia Industrial da UFSM, em especial a doutoranda Fernanda Cramer Flores e a professora Cristiane de Bona da Silva, que auxiliaram valiosamente na realização desta pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), em especial a secretária Maria.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **Atividade de diferentes formulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens**

AUTOR: LAUREN SAGAVE  
ORIENTADOR: SÔNIA DE AVILA BOTTON  
Santa Maria, 12 de fevereiro de 2014.

O objetivo deste estudo foi determinar a atividade bactericida e bacteriostática da planta medicinal *Melaleuca alternifolia* em diferentes formulações: óleo livre; óleo essencial associado aos nanocarreadores (nanoemulsão e nanocápsula); além das associações entre o óleo livre e as nanoformulações; bem como, a atividade antimicrobiana do seu composto majoritário, o terpinen-4-ol, em isolados de *Rhodococcus equi* (n=24) oriundos de diferentes origens. Empregou-se o método de microdiluição em caldo Müeller-Hinton para a determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM). Obteve-se CIM e CBM entre as concentrações 312,5µg/mL até 2.500µg/mL. Verificou-se que o óleo essencial de *M. alternifolia* possui baixa atividade quando em óleo livre; porém, quando associado aos nanocarreadores, sua atividade antimicrobiana foi potencializada, mostrando atividade bacteriostática. Evidenciou-se que frente aos isolados de *R. equi*, tanto as associações quanto o composto majoritário testados, demonstraram atividade bactericida e bacteriostática. Sugere-se que *M. alternifolia* em associação aos sistemas nanocarreadores, bem como o terpinen-4-ol, apresentam potencial para futuras pesquisas envolvendo o tratamento da rodococose equina.

**Palavras-chave:** óleos essenciais, nanocarreadores, rodococose, resistência

## ABSTRACT

Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **Activity of different formulations of *Melaleuca alternifolia* and terpinen -4- ol *Rhodococcus equi* isolates from different sources**

AUTHOR: LAUREN SAGAVE  
ADVISER: SÔNIA DE AVILA BOTTON  
Santa Maria, February, 12<sup>th</sup>, 2014.

The aim of this study was to determine the bactericidal and bacteriostatic activity of a medicinal plant, *Melaleuca alternifolia*, in different formulation: oil free , essential oil associated with nanocarriers (nanoemulsion and nanocapsule), besides the associations between free oil and nanoformulations, as well as the antimicrobial activity of its major compound, terpinen - 4 - ol , in *Rhodococcus equi* isolates (n = 24 ) from different sources. In order to determine the minimal inhibitory (MIC) and the minimum bactericidal (MBC) concentrations the microdilution method in Mueller-Hinton broth was employed in this study. The values of MIC and MBC ranged from 312.5 mg/mL to 2.500µg/mL. The results obtained with essential oil of *M. alternifolia* demonstrated low activity in oil free presentation; however, when it was associated with nanocarriers, its antimicrobial activity was enhanced, showing bacteriostatic activity. It was possible to verify that against *R. equi* isolates, both associations as well the major compound tested, showed both bactericidal and bacteriostatic activities. It is suggested that *M. alternifolia*, in association with nanocarriers systems, as well as terpinen -4-ol, presents potential for future studies concerning the equine rodococosis therapy.

**Keywords:** Essential oils, nanocarriers, rodococosis, resistance

## LISTA DE APÊNDICES

**APÊNDICE A** – Concentração inibitória mínima (CIM- $\mu\text{g/ml}$ ) da planta medicinal *Melaleuca alternifolia* frente aos isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens nas formulações de óleo livre, nanoemulsão e nanocápsula contendo óleo essencial, além do seu composto majoritário terpinen-4-ol, incorporado ao óleo essencial e usado isoladamente, em uma formulação comercial. ....37

**APÊNDICE B** – Concentração bactericida mínima (CBM- $\mu\text{g/ml}$ ) da planta medicinal *Melaleuca alternifolia* frente aos isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens nas formulações de óleo livre, nanoemulsão e nanocápsula contendo óleo essencial, além do seu composto majoritário terpinen-4-ol, incorporado ao óleo essencial e usado isoladamente, em uma formulação comercial. ....38

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	9
2.1. <i>Rhodococcus equi</i> e rodococose .....	9
2.2. Plantas medicinais .....	12
2.2.1. <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	13
2.3. Nanotecnologia em microbiologia veterinária .....	14
<b>3. ARTIGO I: Atividade de nanocápsula, nanoemulsão e do óleo livre de <i>Melaleuca alternifolia</i> em isolados de <i>Rhodococcus equi</i> de diferentes origens</b> .....	17
Resumo .....	18
Abstract.....	19
Introdução.....	19
Material e métodos .....	21
Resultados e Discussão.....	22
Conclusão .....	24
Referências .....	24
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	27
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	28
<b>APÊNDICES</b> .....	36



## 1. INTRODUÇÃO

A rodococose é relatada como uma das doenças respiratórias mais importantes em potros com idade inferior a seis meses (RIBEIRO et al., 2005; MONEGO et al. 2009). O seu agente, *Rhodococcus equi*, destaca-se pela versatilidade e a ampla capacidade de adaptação a ambientes diversos incluindo o solo e o organismo de mamíferos (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2009). Potros infectados são a principal fonte de infecção em locais com histórico da doença (TAKAI et al., 2001), sendo a principal porta de entrada no hospedeiro, a inalação de partículas de poeira contaminadas com a bactéria (MUSCATELLO et al., 2007). O tratamento indicado constitui a associação de antimicrobianos macrolídeos com a rifampicina; porém, é crescente o número de isolados que apresentam resistência a esses fármacos (GIGUÉRE et al., 2010).

A busca por alternativas de tratamento tem impulsionado estudos empregando-se plantas medicinais com potencial antimicrobiano. Neste sentido, *Melaleuca alternifolia*, planta nativa da Austrália vem sendo estudada por apresentar comprovadas propriedades antimicrobianas contra diversos micro-organismos (CARSON et al., 2002; TAKARADA et al., 2004; FARIA, 2012). O seu componente majoritário, o terpinen-4-ol (VIEIRA et al., 2004) também foi avaliado apresentando atividade contra diferentes patógenos (OLIVA et al., 2003; COX et al., 2000).

Pesquisas envolvendo o uso da nanotecnologia no desenvolvimento de formulações que permitam a liberação controlada de fármacos, visando à diminuição de efeitos tóxicos e/ou aumento do índice terapêutico, tem sido alvo de muitos estudos (BARROS & VILLAESCUSA, 2011). Desta forma, nanocápsulas e nanoemulsões são sistemas submicrométricos carreadores de fármacos, apresentando diâmetro na ordem de nanômetros (cerca de 10 a 1000 nm) (SOPPIMATH et al., 2001). A melhora da atividade antimicrobiana de *M. alternifolia* foi relatada por FLORES et al. (2013), em testes *in vitro*, contra isolados de

*Trichophyton rubrum*, demonstrando que a associação do óleo essencial com as nanoformulações aumentaram a atividade antimicrobiana da planta.

Em virtude das infecções causadas por *R. equi* na medicina veterinária, especialmente nas criações de equinos, aliado ao aumento do número de relatos sobre a resistência deste micro-organismo, este estudo teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana da planta medicinal *M. alternifolia* em apresentações de óleo livre e em nanoemulsões e nanocápsulas, bem como o seu composto majoritário terpinen-4-ol, frente a isolados do sul do Brasil.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Rhodococcus equi* e rodococose

*Rhodococcus equi* é um cocobacilo Gram-positivo, intracelular facultativo, classificado na ordem dos Actinomycetales (LINDER, 1997). Esta bactéria possui distribuição mundial, sendo considerada um dos mais importantes agentes patogênicos de equinos (TAKAI et al., 1995). A rodococose equina pode manifestar-se como uma doença crônica, caracterizada por broncopneumonia piogranulomatosa, podendo estar associada com linfadenite supurativa (ZINK et al., 1987). A transmissão do agente está relacionada à formação de aerossóis, assim como sugerido no estudo de MUSCATELLO et al. (2002) que detectou isolados virulentos do agente no ar exalado dos potros.

A bactéria foi isolada pela primeira vez em 1923, na Suécia, à partir de pulmões de potros. Desde então, identificou-se *R. equi* numa variedade de ambientes, incluindo solo e água e também em diversas espécies animais, além dos equinos, como em bovinos, caprinos, suínos, búfalos, ovinos, cães e gatos (WALSH et al., 1993). Normalmente, os potros afetados pela doença clínica possuem entre um e seis meses de idade, pois nessa faixa etária o sistema imunológico ainda está em desenvolvimento (DARRAH et al., 2004).

A rodococose também tem importância na saúde pública, por ser uma zoonose (PRESCOTT, 1991). No homem, as infecções por *R. equi* têm sido mais comumente descritas em indivíduos transplantados, pacientes oncológicos, ou acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida (MOSSER & HONDALUS, 1996); todavia, a enfermidade também é relatada em indivíduos saudáveis (MACGOWAN & MANGANO, 1991).

A virulência depende da capacidade de *R. equi* em replicar dentro dos macrófagos (TOYOOKA et al., 2005). Eventualmente, a proliferação intracelular do patógeno leva à morte necrótica do macrófago, acompanhada por danos ao tecido pulmonar caracterizado por cavitação e formação de granuloma (MEIJER & PRESCOTT, 2004).

Os fatores de virulência, também ligados à patogenicidade de *R. equi*, estão contido nas ilhas de patogenicidade, formada pelos *vap* (*virulence associated protein*) incluindo: *vapA*, *vapB*, *vapC*, *vapD*, *vapE*, *vapF*, *vapG*, *vapH*, *vapI*, *vapX*, *vapJ*, além dos genes *K1*, *K2*, *L*, e *M* (RUSSELL et al., 2004; LETEK et al., 2008). O principal antígeno de virulência relacionado à infecção em equinos melhor caracterizado até o momento é a proteína de superfície *VapA*, codificada pelo gene *vapA* (BYRNE et al., 2001). Este gene está presente em praticamente 100% dos isolados de *R. equi* oriundos de casos de broncopneumonia grave (GIGUERE et al., 1999). Isolados de *R. equi* que não contém esse plasmídeo de virulência, são incapazes de sobreviver e replicar no interior de macrófagos, sendo classificadas como avirulentas (JAIN et al., 2003).

O aumento da prevalência e incidência da doença normalmente é associado a diversos fatores como: maior densidade de potros, tamanho da população equina, lotes de animais de idades diferentes, permanência de potros por um longo período no mesmo local, pobre cobertura de pasto e ausência de monitoramento dos animais após o nascimento (MUSCATELLO et al., 2006). MARTENS (2000) demonstrou que a prevalência de *R. equi* virulentos na pastagem não se relaciona com o número de casos clínicos vistos em potros.

TAKAI et al. (2001) relataram que potros infectados são a principal fonte de infecção, pois conseguem disseminar grandes quantidades de *R. equi* virulento em suas fezes até a sétima semana de vida.

O agente é considerado um habitante normal do trato digestório de herbívoros, desta forma *R. equi* está presente no meio ambiente, além das secreções respiratórias (LEADON & KLAY, 2006). GIGUÉRE et al. (2004) afirmaram que o diagnóstico precoce é de fundamental importância para a sobrevivência dos animais, sendo que o monitoramento de fazendas endêmicas deve ser realizado empregando-se a correlação dos dados clínico-epidemiológicos com o isolamento da bactéria. Isoladamente, a presença do agente no ambiente e no trato digestório e respiratório dos animais, não confirma o diagnóstico, havendo necessidade de correlacionar com histórico da propriedade e a presença de sinais clínicos.

A imunização oral empregando cepas virulentas de *R. equi* demonstrou uma resposta imunitária protetora em potros com idade de 3 semanas (HOOPER-MCGREY et al., 2003). Vacinas com o agente inativo, não produzem imunidade e não houve comprovação que vacinas contendo o antígeno de superfície *VapA*, possam ser eficazes na proteção contra a pneumonia em potros (CAUCHARD et al, 2004; HAGHIGHI & PRESCOTT, 2005).

A mortalidade de animais foi reduzida com a introdução do uso da eritromicina combinada com a rifampicina no tratamento (HILLIDGE, 1987). Porém, no estudo realizado por STRATTON-PHELPS et al. (2000) foi demonstrado que a eritromicina apresenta absorção variável quando administrada pela via oral em potros. Além disso, este fármaco apresenta o limitante de desencadear inúmeros efeitos colaterais. Como alternativa, a eritromicina, a azitromicina e a claritromicina estão sendo utilizadas em associação à rifampicina no tratamento da rodococose (GIGUÉRE et al., 2004). Todavia, isolados resistentes a estes fármacos estão sendo relatados nos últimos anos, especialmente

demonstrados pelos estudos de susceptibilidade aos antimicrobianos *in vitro* frente aos isolados de *R. equi* (GIGUÉRE et al., 2010; GIRARDINI et al., 2013).

## 2.2. Plantas medicinais

Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) os vegetais medicinais são a melhor fonte para a obtenção de uma variedade de novos fármacos (BERTINI et al., 2005). Aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais (BALUNAS & KINGHORN, 2005).

Neste sentido, a OMS vem oferecendo novos incentivos e investimentos em estudos envolvendo a aplicação das plantas medicinais. Somando-se a isso, tem-se evidenciado crescente aceitação das plantas medicinais pelos profissionais de saúde, como os médicos, além do aumento de seu uso pela população (HOMAR, 2005).

As pesquisas científicas tem demonstrado que as plantas medicinais possuem atividade antimicrobiana de amplo espectro contra diversos patógenos (HULIN et al., 1998). A maioria dos produtos do metabolismo secundário, tais como os terpenóides e os compostos fenólicos, usadas isoladamente, também demonstrou atividade inibitória frente a diferentes agentes biológicos (ADAM et al., 1998).

O Brasil possui uma diversa flora, com mais de 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 20% do total mundial (BRASIL, 2013). Essa rica biodiversidade indica um mercado em potencial expansão, acompanhado pelo crescente uso de plantas medicinais, aliados ao conhecimento empírico advindo da medicina popular (RODRIGUES, 2006) e da investigação científica destas plantas medicinais (PEDROSA et al., 2001). No país, a regulamentação sobre o uso das plantas medicinais e seus derivados, é realizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autarquia do Ministério da Saúde que tem como

papel proteger e promover a saúde da população, bem como garantir a segurança sanitária de produtos e serviços e participar da construção de seu acesso (BRASIL, 1999).

O valor despendido no Brasil neste mercado é pequeno se confrontado com os valores gastos na Europa e nos Estados Unidos no ano de 2000, o equivalente a 8,5 e 6,3 bilhões de dólares, respectivamente (SIMÕES & SHENKEL, 2002), exemplificando tal fato, em nosso país, apenas 1% do mercado de fitoterápicos é voltado ao segmento veterinário (OZAKI & DUARTE, 2006).

### 2.2.1. *Melaleuca alternifolia*

*Melaleuca alternifolia* é uma planta medicinal comumente conhecida como “árvore de chá”, sendo nativa da Austrália e pertencente à família das Mirtáceas (*Myrtaceae*) (VIEIRA et al., 2004). O seu principal produto é o óleo essencial, de grande importância medicinal, pois possui comprovada ação antimicrobiana contra diferentes patógenos (CASTRO et al., 2005).

Embora ocorra alguma variação natural da planta, a composição do óleo de *M. alternifolia* que é vendido comercialmente é padronizado, caracterizando-se como componentes principais, o terpinen-4-ol (40%),  $\gamma$ -terpinen (23%),  $\alpha$ -terpinen (4 à 10%) e 1,8-cineol (1 à 5%) (BROPHY et al., 1989; HOMER et al., 2000).

A maioria dos componentes demonstraram atividade inibitória contra bactérias (HAMMER et al., 2003) e, entre eles, terpinen-4-ol mostra-se com maior atividade (OLIVA et al., 2003; VIEIRA et al., 2004). Quando isolado, o terpinen-4-ol apresenta maior atividade antimicrobiana do que quando utilizado presente na composição do óleo essencial da planta (COX et al., 2000; MANN et al., 2000).

*M. alternifolia* tem uma longa história de uso tópico como agente antimicrobiano em farmacologia humana (CARSON et al., 2006) e tem sido muito estudada como alternativa aos antimicrobianos (ALLEN, 2001).

O mecanismo de ação deste óleo, estudado em bactérias e fungos, envolve tanto a perda da integridade da membrana como a inibição da respiração celular, tendo como consequência, a incapacidade de manter a homeostase e produzir alterações na morfologia celular (CARSON et al., 2006).

Adicionalmente, propriedades antimicrobianas desta planta foram comprovadas em diversos micro-organismos, tanto os Gram-positivos, a exemplo de *Bacillus cereus* como os Gram-negativos, como *Escherichia coli* (COX et al., 2000; MANN et al., 2000; CARSON et al., 2002; GROppo et al., 2002; TAKARADA et al., 2004; FARIA, 2012). Os resultados apresentados em testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) variaram entre 0,003% e 2% (CARSON et al., 2006; COX et al., 2000).

### 2.3. Nanotecnologia em microbiologia veterinária

SCOTT (2005) diz que a nanotecnologia tem o potencial de transformar a prática da medicina veterinária. Em duas décadas, o autor diz, que existiram dispositivos em nanoescala que terão a capacidade de detectar e tratar enfermidades, deficiência de nutrientes da alimentação, fornecer parâmetros fisiológicos como pressão arterial, temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória. Vantagens essas, que poderão ser empregadas tanto na clínica veterinária como na identificação e rastreamento de animais para abate.

A nanotecnologia é integrante de uma ciência multidisciplinar que possui variadas aplicabilidades. Neste contexto, as ciências farmacêuticas a empregam em sistemas nanocarreadores, tais como: nanoemulsões e as nanocápsulas, empregados para a liberação controlada de fármacos em diversas aplicações e pesquisas (SANDHIYA et al., 2009). As

nanoemulsões são dispersões de óleo em água, com suas gotículas de óleo estabilizadas por tensoativos (ANTON et al., 2008). As nanocápsulas possuem na sua composição a presença de um núcleo oleoso, circundado por um fino invólucro polimérico, estando o fármaco dissolvido no núcleo, adsorvido ou disperso na parede polimérica (VAUTHIER & BOUCHEMAL, 2009).

Sistemas nanoestruturados (lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas e nanopartículas poliméricas) apresentam vantagens como: a melhoria da eficácia e da biodisponibilidade da droga, a redução dos efeitos adversos (toxicidade e irritação) e o aumento da estabilidade do fármaco (MISHRA et al., 2010). Devido ao seu pequeno tamanho, as nanoestruturas podem depositar um maior número de partículas sobre a superfície, sendo capazes de disponibilizar uma maior quantidade de fármaco (SCHAFFAZICK et al., 2003; PADMAVATHY & VIJAYARAGHAVAN, 2008). Além disso, os sistemas nanoestruturados são capazes de melhorar a biodisponibilidade e reduzir a frequência de administração de medicamentos (RANJITA, et al., 2011).

Na medicina veterinária, a nanotecnologia vem sendo empregada em diferentes áreas, incluindo a microbiologia veterinária (TRONCARELLI et al. 2013). SHEPHARD et al. (2003) conseguiram prolongar a estimulação do sistema imunitário de ratos, com a incorporação de nanopartículas poliméricas às proteínas virais do vírus da parainfluenza bovina tipo 3. Os autores relataram que os animais imunizados com a vacina que continha a nanopartícula, desenvolveram níveis mais elevados de anticorpos, em relação aos animais imunizados com a vacina convencional.

SELLEM et al. (2009) associaram estreptomicina e doxiciclina a nanocarreadores e demonstraram em estudo *in vivo* frente a isolados de *Brucella melitensis* que os fármacos na forma livre foram menos eficazes na redução da bactéria no fígado e no baço de camundongos infectados do que na forma de nanocápsulas. RAMYADEVI et al. (2011) demonstraram a



atividade de nanopartículas de cobre metálico em *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* e em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. SANTHOSHKUMAR (2012) verificaram efeito adulticida e larvicida das nanopartículas de prata contra *Hippobosca maculata* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, respectivamente.

No Brasil, atividades realizadas por MOSQUERA et al. (2010) desenvolveram uma formulação nanocarreada do iodo de uso intramamário para tratamento da mastite; porém ainda em fase de estudo clínico. TRONCARELLI et al. (2013) estão pesquisando a eficácia da própolis nanoestruturada para o tratamento da mastite bovina.

Recentemente, FLORES et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de nanoemulsão, nanocápsula e óleo livre do óleo essencial de *M. alternifolia* contra *Trichophyton rubrum*, demonstrando que o advento da nanotecnologia aumentou a atividade antimicrobiana da planta, sendo que a associação de *M. alternifolia* com as nanocápsulas, obtiveram os melhores resultados de concentração inibitória mínima.

### 3. ARTIGO I

**Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de  
*Rhodococcus equi***

Lauren Sagave , Letícia Trevisan Gressler, Fernanda Cramer Flores, Cristiane de Bona da  
Silva, Agueda Palmira Castagna de Vargas, Maristela Lovato, Luis Antônio Sangioni, Sônia

A. Botton

Artigo a ser submetido ao periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

(ISSN 0102-0935)

**Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi***

***Melaleuca alternifolia* activity in nanoformulations and terpinen-4-ol against *Rhodococcus equi* isolates**

**Lauren Sagave<sup>I</sup>, Leticia Trevisan Gressler<sup>I</sup>, Fernanda Cramer Flores<sup>I</sup>, Cristiane de Bona da Silva<sup>I</sup>, Agueda Palmira Castagna de Vargas<sup>I</sup>, Maristela Lovato<sup>I</sup>, Luis Antônio Sangioni<sup>I</sup>, Sônia A. Botton<sup>I\*</sup>**

<sup>I</sup>Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, 1000, Campus UFSM, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900. E-mail: sabott20@gmail.com. \*Autor para correspondência.

## **RESUMO**

*Rhodococcus equi* é o agente etiológico da rodococose equina, importante doença respiratório de potros. Especialmente na última década, a emergência de cepas resistentes aos antimicrobianos empregados no tratamento da rodococose tem sido relatada. Neste sentido, salientamos e importância de estudos envolvendo terapias alternativas e novas tecnologias, incluindo, o uso de plantas medicinais e nanotecnologia. Neste trabalho, utilizou-se *Melaleuca alternifolia* nas seguintes formulações: óleo livre, nanocápsula, nanoemulsão e a combinação de: óleo livre com nanocápsula e com nanoemulsão; além do seu composto majoritário, terpinen-4-ol; a fim de verificar a atividade antimicrobiana frente a isolados de *R. equi* de diferentes origens. Utilizou-se o método de microdiluição em caldo na determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) das diferentes formulações frente aos isolados (n=24). Verificou-se baixa atividade antibacteriana de *M. alternifolia* na formulação de óleo livre. Todavia, esta atividade foi potencializada quando se incorporou o óleo essencial às nanoformulações. O composto terpinen-4-ol demonstrou atividade bacteriostática quando incorporado ao óleo essencial e demonstrou-se bactericida e bacteriostático, quando utilizado isoladamente. Verificou-se que tanto *M. alternifolia* quanto o terpinen-4-ol testados possuem atividade antimicrobiana contra isolados de *R. equi*. Sugere-se que *M. alternifolia* possui potencial para o tratamento da rodococose.

**Palavras-chave:** planta medicinal, nanotecnologia, rodococose, teste de susceptibilidade.

## ABSTRACT

*Rhodococcus equi* causes rodococose in horses, characterized by bronchopneumonia in foals. Due to reports of antimicrobial resistance, it is important to develop studies involving alternative therapies and new technologies, including the use of medicinal plants and nanotechnology. In this work, the plant *Melaleuca alternifolia* in oil free formulations, nanocapsule, nanoemulsion and the combination of free and nanocapsule oil nanoemulsion, besides its major compound, terpinen-4-ol, were used in order to verify antimicrobial activity against isolates of *R. equi*. The broth microdilution method was employed to determinate the minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal (MBC) concentrations of different formulations against 24 isolates. There was low antibacterial activity of *M. alternifolia* in oil free formulation; however, it was observed that the activity was enhanced when incorporated as essential oil the nanoformulations. The major compound, terpinen-4-ol, showed bactericidal and bacteriostatic activity when used alone. It is suggested that *M. alternifolia*, in association with nanocarriers systems, as well as terpinen -4-ol, presents potential for future studies concerning the equine rodococosis therapy.

**Key words:** medicinal plant, nanotechnology, rodococosis, susceptibility test.

## INTRODUÇÃO

A rodococose equina é uma enfermidade infecciosa, cosmopolita, e no Brasil, é relatada como uma das mais importantes enfermidades respiratórias em potros (Ribeiro *et al.*, 2005). O agente etiológico é a bactéria intracelular facultativa *Rhodococcus equi*, habitante do solo e saprófita do trato intestinal de herbívoros (Meijer e Prescott, 2004). A principal manifestação clínica da doença é a broncopneumonia piogranulomatosa, uma vez que, a maioria dos animais contamina-se pela inalação de partículas de poeira contendo *R. equi* (Muscatello *et al.*, 2007).

O tratamento com antimicrobianos macrolídeos em associação com a rifampicina, é a principal forma de controle da doença, no entanto, a existência de isolados de *R. equi* resistentes a estes compostos vem sendo relatada (Giguère *et al.*, 2002). Devido à crescente preocupação com a resistência antimicrobiana observada, tanto na medicina humana quanto na veterinária, pesquisas envolvendo terapias alternativas, com plantas medicinais e seus compostos, vêm sendo realizadas, a fim de obter-se uma maior variedade de fármacos com ação antimicrobiana (Bertini *et al.*, 2005). Devido aos inúmeros mecanismos de ação, em diferentes alvos da célula microbiana, manifestações de resistência ou adaptação microbiana aos vegetais medicinais e seus derivados raramente são relatadas (Bakkali *et al.*, 2008).

Apesar de todo este potencial, no Brasil, somente cerca de 1% dos compostos fitoterápicos disponíveis comercialmente são desenvolvidos para uso em medicina veterinária (Ozaki e Duarte, 2006).

*Melaleuca alternifolia* também conhecida como “árvore do chá”, é uma planta nativa da Austrália e o seu óleo essencial (extraído das folhas por hidrodestilação) possui comprovada ação antibacteriana, antifúngica e antiviral (Silva *et al.*, 2002). Na composição do óleo de *M. alternifolia* estão presentes monoterpenos, sesquiterpenos e seus alcoóis correspondentes (Carson *et al.*, 2006), sendo os seus principais constituintes: terpinen-4-ol (40%), seguido do  $\gamma$ -terpineno (23%) e  $\alpha$ -terpineno (10%) (Oliva *et al.*, 2003). A maioria desses compostos é ativa contra bactérias e, entre eles, destaca-se o terpinen-4-ol (Oliva *et al.*, 2003).

Estratégias visando aperfeiçoar as características físico-químicas de substâncias bioativas envolvem, também, inovações tecnológicas como a nanotecnologia. Atualmente, sistemas coloidais incluindo as nanocápsulas, as nanoesferas, as nanoemulsões e outros sistemas nanoestruturados são alvos de pesquisas sobre novas formas de carrear fármacos para locais específicos e a liberação controlada destas substâncias (Schaffazick *et al.*, 2003). Nas áreas de produção e sanidade animal, relatos da utilização de nanoestruturas são escassos (Troncarelli *et al.*, 2013). Como exemplo, um estudo experimental em microbiologia veterinária demonstrou a maior eficácia de estreptomicina e doxiciclina quando estes fármacos foram incorporados às nanoestruturas e testados frente a isolados de *Brucella melitensis*. Os autores concluíram que os fármacos livres foram menos eficazes na redução da carga bacteriana presente no fígado e no baço de *Mus musculus* infectados do que na forma de nanocápsulas (Sellem *et al.*, 2009). Mosqueira *et al.* (2010) patentearam nanocarreadores poliméricos do iodo para aplicação intramamária em ruminantes, como uma alternativa para o tratamento de mastite, porém ainda em fase de estudos.

As nanoemulsões são dispersões de óleo em água, com as gotículas do óleo estabilizadas por tensoativos (Anton *et al.*, 2008). As nanocápsulas possuem na sua composição a presença de um núcleo oleoso circundado por um fino invólucro polimérico, e o fármaco encontra-se dissolvido no núcleo, adsorvido ou disperso na parede polimérica (Vauthier e Bouchemal, 2009). Estes sistemas submicrométricos são capazes de promover a diminuição de efeitos tóxicos e aumentar o índice terapêutico de fármacos (Schaffazick *et al.*, 2003).

Devido aos crescentes relatos de resistência antimicrobiana de isolados de *R. equi*, o potencial antimicrobiano das plantas medicinais, especialmente, em associação à

nanotecnologia, este estudo teve como objetivo verificar a atividade antibacteriana de *M. alternifolia*, na forma de óleo livre e em sistemas nanoestruturados, bem como do seu composto majoritário, terpinen-4-ol, contra isolados de *R. equi* de diferentes origens.

## MATERIAL E MÉTODOS

O óleo essencial de *M. alternifolia* e o seu componente majoritário terpinen-4-ol foram obtidos comercialmente (Laszlo Aromaterapia, Belo Horizonte, Brasil e Sigma Aldrich São Paulo, Brasil, respectivamente). As nanoemulsões e nanocápsulas contendo *M. alternifolia* a 1% (10mg/mL) (Flores *et al.* 2011) foram preparados pelos métodos de emulsificação espontânea (Bouchemal *et al.*, 2004) e deposição interfacial do polímero pré-formado de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (Fessi *et al.*, 1989), respectivamente, apresentando tamanho na faixa nanométrica (cerca de 200 nm), potencial zeta negativo e índice de polidispersão abaixo de 0,25.

Foram utilizados 24 isolados de *R. equi*, obtidos entre os anos de 1991 e 2012, provenientes de amostras de solo (n=8), fezes de animais hígidos (n=8) e de animais com manifestações clínicas (n=8) coletadas de 10 estabelecimentos de criação equina localizados na região sul do Brasil. Todos os isolados foram previamente identificados fenotípica e genotipicamente, quanto ao gênero e espécie (Monego *et al.*, 2009).

O perfil de susceptibilidade dos isolados de *R. equi* frente às diferentes formulações contendo óleo essencial de *M. alternifolia* foram avaliados pelo método de microdiluição em caldo Müeller-Hinton (MHC) (Himedia<sup>®</sup> Laboratories). Todos os isolados foram cultivados em Müeller-Hinton Agar (MHA) (Himedia<sup>®</sup> Laboratories) em aerobiose a 37°C durante 24 h. Para cada isolado preparou-se um inóculo em solução salina 0,9%, ajustado para a escala 0,5 de McFarland, posteriormente diluído em MHC e testado na concentração  $1 \times 10^5$  UFC/mL. As formulações testadas e suas combinações foram: i. óleo em dispersão grosseira ou óleo livre (OL), ii. Nanocápsula (NC), iii. Nanoemulsão (NE), iv. OL+NC (na combinação de 50% de óleo livre e 50% de nanocápsula) e v. OL+NE (na combinação de 50% de óleo livre e 50% de nanoemulsão). Adicionalmente, a atividade antimicrobiana do terpinen-4-ol foi avaliada frente aos isolados de *R. equi*. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas em conformidade com as diretrizes da Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). As concentrações das formulações de *M. alternifolia* testadas foram de 2.500  $\mu$ g/mL a 1,2  $\mu$ g/mL, na razão 1:2. As concentrações do terpinen-4-ol variaram de 44.360  $\mu$ g/mL a

21,660µg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata, incluindo os controles positivos e negativos.

Os valores de CIM e CBM para *R. equi* frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* nas diferentes formulações foram avaliados com auxílio do teste de *Kruskal-Wallis*. Quando identificadas diferenças entre os tratamentos aplicou-se o teste de *Bonferroni* para comparar as médias. Para avaliação dos resultados dos isolados frente ao terpinen-4-ol utilizou-se o teste do qui-quadrado. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS, versão 9.2 (SAS, 2001).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial de *M. alternifolia* na apresentação de OL, não apresentou efeito bacteriostático frente aos isolados clínicos e de solo de *R. equi*. Entretanto, 62,5% (5/8) dos isolados de fezes foram inibidos nas concentrações de 2.500µg/mL até 625µg/mL. Resultados de CIM de compostos de origem vegetal entre 1.500 e 600µg/ml são considerados de efeito moderado; todavia, CIM acima de 1.600 µg/mL são considerados como uma fraca inibição (Aligianis *et al.*, 2001). Desta forma, pode-se inferir que o óleo essencial de *M. alternifolia* apresentou ação inibitória de fraca a moderada frente a isolados de fezes de *R. equi*. Estudos anteriores comprovaram a atividade bacteriostática e bactericida do óleo essencial de *M. alternifolia* sobre *Porphyromonas gingivalis* (Faria *et al.*, 2012). Banes-Marshall *et al.* (2001) relataram que a maioria das bactérias são sensíveis ao óleo essencial de *M. alternifolia* na concentração de 10mg/mL; no entanto, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* necessitaram de concentrações maiores do óleo para serem inibidos. Neste estudo com *R. equi*, a maior concentração do óleo essencial na formulação de OL (2.500µg/mL) não foi capaz de inibir a maioria (79,2%) dos isolados de *R. equi* (19/24).

As NE e NC contendo óleo essencial de *M. alternifolia*, apresentaram efeito bacteriostático frente a 100% (8/8) dos isolados de solo e isolados de fezes (8/8) de *R. equi* nas concentrações de 2.500µg/mL até 312,5µg/mL, totalizando 16 isolados inibidos. Isolados clínicos não foram inibidos. O uso das nanoestruturas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*, em comparação ao OL, apresentou atividade inibitória 2,75 vezes maior ( $P < 0.05$ ). A associação de fármacos aos sistemas nanoestruturados, devido ao seu reduzido tamanho, propicia a melhora do índice terapêutico dos mesmos, como observado na atividade antimicrobiana da clorexidina associada à NC sobre *Staphylococcus epidermidis* apresentando maior atividade em relação ao fármaco livre em um modelo experimental *ex vivo* com pele de orelha de suíno (Lboutounne *et al.*, 2002). Paulo *et al.* (2010) avaliaram a atividade antifúngica

de nanopartículas contendo anfotericina B, obtendo resultados satisfatórios em comparação ao fármaco livre. Melhora da atividade inibitória do óleo essencial de *M. alternifolia*, quando associado à nanocarreadores, também foi demonstrada por Flores *et al.* (2013) frente ao fungo dermatófito em modelo experimental de infecção ungueal, quando comparado à atividade do OL. No presente experimento, o OL e as nanoestruturas contendo óleo essencial, não apresentaram efeito bactericida sobre os isolados de *R. equi* analisados.

Diante da possibilidade de ocorrer um efeito complementar entre o OL de *M. alternifolia* e as nanoestruturas contendo óleo essencial, avaliou-se a atividade antimicrobiana das combinações de OL+NE e OL+NC. Com isso, observou-se atividade bacteriostática e bactericida em 100% (24/24) dos isolados, sem diferença estatística entre as associações. Acredita-se que este resultado esteja relacionado à dose inicial de ataque, oferecida pelo OL, e a manutenção desta pelo controle da liberação do óleo proporcionado pelas nanoestruturas (Flores *et al.*, 2011). Cabe salientar que o efeito antimicrobiano do óleo ocorreu imediatamente após a sua aplicação, o que pode ter ocorrido devido ao contato direto com a membrana do micro-organismo, provocando alterações na permeabilidade da membrana e inibição da respiração celular, conforme sugerido por Carson *et al.* (2006). Além disso, é provável que os sistemas nanoestruturados promoveram a liberação gradual dos compostos, um aumento do tempo de contato, e, por apresentarem reduzido tamanho de partícula, proporcionaram a deposição de um maior número de partículas na superfície da célula microbiana, expondo maior quantidade da substância ativa (Lboutounne *et al.*, 2002). Desta forma, conclui-se que tanto a formulação de NC ou NE contendo o óleo essencial de *M. alternifolia* em associação ao OL, possuem atividade bacteriostática e bactericida contra isolados de *R. equi* de diferentes origens.

O terpinen-4-ol é um dos principais responsáveis pela atividade antibacteriana do óleo essencial de *M. alternifolia*, representando aproximadamente 40% do óleo essencial (Carson *et al.*, 2006). Com o terpinen-4-ol utilizado isoladamente frente aos isolados de *R. equi*, obteve-se CIM nas concentrações entre 11.090 $\mu$ g/mL e 5.545 $\mu$ g/mL e CBM nas concentrações de 44.360 $\mu$ g/mL a 11.090 $\mu$ g/mL, demonstrando que a atividade antibacteriana do terpinen-4-ol isolado foi 18,02 vezes menos efetiva do que na composição do óleo essencial de *M. alternifolia*. Em contrapartida, o terpinen-4-ol demonstrou superior capacidade antibacteriana quando utilizado isoladamente do que quando incorporado ao óleo essencial de *M. alternifolia*. frente a isolados de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Cox *et al.*, 2001) Da mesma forma, HAMMER *et al.* (2003) constataram que o terpinen-4-ol isolado foi mais eficaz que o óleo essencial da planta frente a *Candida albicans*. A estrutura



celular e metabolismo específico do *R. equi* podem ter determinado a menor ação do terpinen-4-ol sobre este agente, quando comparado com os micro-organismos anteriormente descritos.

Considerando a problemática no tratamento da rodococose equina, a resistência antimicrobiana ao tratamento convencional e de posse dos resultados obtidos, salientamos o potencial uso da planta *M. alternifolia*, especialmente ao incorporar o óleo essencial da planta em sistemas nanoestruturados, possibilitando a potencialização da atividade antimicrobiana frente aos isolados de *R. equi*.

## CONCLUSÃO

*M. alternifolia* apresenta atividade bacteriostática frente a isolados de *R. equi*, tanto na forma de OL quanto em sistemas nanoestruturados, porém esta atividade é fortemente potencializada diante da associação de óleo essencial de *M. alternifolia* na forma de livre e incorporado a NC e NE. Terpinen-4-ol apresenta atividade bacteriostática frente a isolados de *R. equi*, porém sua utilização de forma isolada não é indicada, uma vez que sua ação não foi superior ao OL. Devido aos relatos de resistência antimicrobiana de isolados de *R. equi*, estudos farmacológicos devem ser conduzidos a fim de avaliar a ação terapêutica de compostos contendo óleo essencial de *M. alternifolia* como uma alternativa ao tratamento convencional da rodococose equina.

## REFERÊNCIAS

- ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, v.49, n.9, p.4168-4170, 2001.
- ANTON, N.; BENOIT, J.; SAULNIER, P. et al. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – A review. *J. Controlled Release.*, v.128, n.3, p.185-199, 2008.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. et al. Biological effects of essential oils – A review. *Food. Chem. Toxicol.*, v. 46, n.1, p. 446–475, 2008.
- BANES-MARSHALL, L.P., CAWLEY, P.; PHILLIPS, C.A. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against bacterial and *Candida* spp. Isolates from clinical specimens. *Br. J. Biomed. Sci.*, v.58, n.3, p.139–145, 2001.
- BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L.L. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma.*, v.17, n.3, p.80-83, 2005.

- BOUCHEMAL, K.; BRIANCON, S.; PERRIER, E. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *Int. J. Pharm.*, v.51, n.1, p.280-241, 2004.
- CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Ver.*, v.19, n.1, p.50-62, 2006.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico. Wayne: PA, 2013. 5ed.
- COX, S.D.; MAN, C.M.; MARKHAM, J.L. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.*, v.88, n.1, p.170–175, 2000.
- FARIA, T.P.M.; GRAZIANO, T.S.; CALIL, C.M. et al. Atividade do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento e expressão gênica de *Porphyromonas gingivalis*. *J. Clin. Periodonto.*, v.22, n.1, p.80-86, 2012.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, v.55, n.1, p.1–4, 1989.
- FLORES F.C.; RIBEIRO, R.F.; OURIQUE, A.F. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. *Quím. Nova.*, v.34, n.6, p.968–972, 2011.
- FLORES F.C.; LIMA, J.A.; RIBEIRO, R.F. et al. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing Tea Tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia*, v.175, n.1, p.1–2, 2013.
- GIGUÉRE, S.; GASKIN, J.M.; MILLER, C. et al. Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.220, n.1, p.59-63, 2002.
- HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Appl. Microbiol.*, v.95, n. 1, p.853–860, 2003.
- LBOUTOUNNE, H.; CHAULET, J.; PLOTON, C. et al. Sustained *ex vivo* skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly (ε-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J. Controlled Release*, v. 82, n.2, p. 319–334, 2002.
- MEIJER, W.G.; PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*. *Vet. Res.*, v.35, n.4, p.383-396, 2004.
- MONEGO, F.; MABONI, F.; KREWER, C. et al. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* from horse breeding farms by means of multiplex PCR for the *vap* gene family. *Curren. Microb.*, v.58, n.4, p.399-403, 2009.

- MOSQUEIRA, V.C.F.; ARAÚJO, R.S.; BRANDÃO, H.M. et al. Composição nanoparticulada contendo antibióticos para administração intramamária de uso animal. BR PI 1002601-0. 2010.
- MUSCATELLO, G.; LEADON, D.P.; KLAY, M. et al. *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of ‘rattles’. *Equine. Vet. J.*, v.39, n.39, p.470-478, 2007.
- OLIVA, B.; PICCIRILLI, E.; CEDDIA, T. et al. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 37, n.1, p.185-187, 2003.
- OZAKI, A.T.; DUARTE, P. C. Fitoterápicos utilizados na medicina veterinária, em cães e gatos. *Infarma*, v.18, n.11, p. 17-25, 2006.
- PAULO, C.S.O.; VIDAL, M.; FERREIRA, L.S. Antifungal nanoparticles and surfaces. *Biomacromolecules.*, v.11, n.10, p.2810–2817, 2010.
- RIBEIRO, M.G.; SEKI, I.; YASUOKA, K. et al. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, 87-kb type I, and a new variant, 87-kb type III. *Comp. Immunol. Microb.*, v.28, n.1, p.53-61, 2005.
- SAS. Statistical analysis system user’s guide: statistics. Version 9.2, Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001. 1686p.
- SCHAFFAZICK, R.S.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím. Nova*, v. 26, n.5, p. 726-737, 2003.
- SELEEM, M.N.; JAIN, N.; POTHAYEE, N. et al. Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline. *FEMS Microbiol.*, v.294, n.1, p.24–31, 2009.
- SILVA, R.S.S.; DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.A. et al. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Acta. Sci. Agron.*, v. 24, n.5, p.363-368, 2002.
- TRONCARELLI, M.Z.; BRANDÃO, H.M.; GERN, J.C. et al. Mastite bovina sob nanocontrole: A própolis nanoestruturada como nova perspectiva de tratamento para rebanhos leiteiros orgânicos. *Vet. Zootec.*, v.20, n.1, p.124-136, 2013.
- VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical. Res.*, v.26, n.5, p.726-737, 2009.

#### 4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo é possível concluir que:

O óleo livre de *M. alternifolia* mesmo na maior concentração utilizada, possui baixa atividade bactericida e bacteriostática contra os isolados de *R. equi* analisados.

A associação do óleo essencial de *M. alternifolia* aos nanocarreadores, incrementou sua atividade bactericida e bacteriostática frente aos isolados de *R. equi*.

O terpinen-4-ol demonstrou atividade bacteriostática quando incorporado ao óleo essencial de *M. alternifolia* frente aos isolados de *R. equi*. Entretanto, este composto demonstrou atividade bactericida e bacteriostática quando utilizado isoladamente frente aos isolados de *R. equi*

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que tanto o óleo essencial de *M. alternifolia* quanto o terpinen-4-ol possuem potencial para futuras pesquisas envolvendo a terapia da rodococose.

## 5. REFERÊNCIAS

ADAM, K. et al. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p. 1739-1745, 1998.

ALLEN, P. Tea tree oil: the science behind the antimicrobial hype. **Lancet**, v.358, p.1245, 2001.

ANTON, N. et al. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – A review. **Journal of Controlled Release**, v.128, n.3, p.185-199, 2008.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p. 431-41, 2005.

BARROS V.P.; VILLAESCUSA V.G. Puntos Cuanticos: nueva aportacion de la nanotecnologia en investigacion y medicina. **Revista Complutense de Ciencias Veterinarias**, v.5, p.69, 2011.

BERTINI, L.M., et al. Perfil da Sensibilidade de Bactérias Frente a Óleos Essenciais de Algumas Plantas do Nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n.3/4, p.80-83, 2005.

BRASIL 1999. Congresso Nacional. **Lei no. 9.782, de 26 de janeiro de 1999**. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Poder Legislativo, Brasília, DF, 27 jan. 1999.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Riqueza de espécies**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/chm/biodiv/brasil.html>>. Acesso em: 28 nov. 2013.

BROPHY, J.J., et al. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.37, p.1330–1335, 1989.

- BYRNE, B. A. et al. Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted proteins. **Infections and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 650-656, 2001.
- CARSON, C.F., et al. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.1914–1920, 2002.
- CARSON, C.F. et al. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, p.50–62, 2006.
- CASTRO, C., et al. Análise econômica do cultivo E extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 241-249, 2005.
- CAUCHARD, J. et al. Foal IgG and opsonising anti- *Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. **Veterinary Microbiology**, v.104, p.73-81, 2004.
- COX, S.D., et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.170 –175, 2000.
- DARRAH, P.A. et al. Innate immune responses to *Rhodococcus equi*. **Journal Immunology**, v.173, p.1914-1924, 2004.
- FARIA, T.P.M., et al. Atividade do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento e expressão gênica de *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Periodontology**, v.22, n.1, p.80-86, 2012.
- FLORES F.C. et al. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing Tea Tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v.175, p.1–2, 2013.
- GIGUERE, S. et al. Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v.67, p.3548–3557, 1999.

GIGUÉRE, S. et al. Retrospective comparison of azithromycin, clarithromycin, and erythromycin for the treatment of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.18, p.568-573, 2004.

GIGUÉRE, S. et al. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance to macrolide antimicrobials or rifampin in *Rhodococcus equi* isolates and treatment outcome in foals infected with antimicrobial-resistant isolates of *R equi*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.237, n.1, p.74-81, 2010.

GIRARDINI, L.K. et al. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e presença do gene vapA em *Rhodococcus equi* de origem humana, ambiental e equina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.6, p.735-740, 2013.

GROPPO, F.C. et al. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. **International Dental Journal**, nº.52, v.6, p.433-437, 2002.

HAGHIGHI, H.; PRESCOTT, J.F. Assessment in mice of *vapA*-DNA vaccination against *Rhodococcus equi* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.104, p.215-225, 2005.

HAMMER, K.A., et al. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.853–860, 2003.

HILLIDGE, C.J. Use of erythromycin-rifampin combination in treatment of *Rhodococcus equi* pneumonia. **Veterinary Microbiology**, v.14, n.3, p.337-342, 1987.

HOMAR, J.C. Medicinas complementarias o alternativas? Um dilema para el sistema público. **Atención Primaria**, v. 35, p.389-391, 2005.

HOMER, L.E., et al. Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.28, p.367–382, 2000.

HOOPER-MCGREVVY, K.E. et al. Immunoglobulin G subisotype responses of pneumonic and healthy, exposed foals and adult horses to *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins. **Clinical diagnosis Laboratory Immunology**, v.10, p.345-351, 2003.

HULIN, V. et al. Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. **Sciences des Aliments**, v.18, p.563-582, 1998.

JAIN, S. et al. Deletion of *vapA* encoding virulence associated protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. **Molecular Microbiology**, v.50, n.1, p.115-128, 2003. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03689.x.

LEADON, D.P.; KLAY M. Pneumonia in foals with special reference to *R. equi*. In: **Proceedings of the 9th World Equine Veterinary Association Conference**, p.216-218, 2006.

LETEK, M. et al. The *Rhodococcus equi* genome. **Proc. 4th Havemeyer Workshop on *Rhodococcus equi***, Edinburgh, p. 17, 2008.

LINDER, R. *Rhodococcus equi* and *Corynebacterium haemolyticum*: Two “Coryneform” bacteria increasingly recognized as agents of human infection. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p.1-10, 1997.

MACGOWAN, K.L., MANGANO, M.F. Infections on *Rhodococcus equi* in children. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.14, p.347-352, 1991.

MANN, C.M., et al. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Letters in Applied Microbiology**, v.30, p.294–297, 2000.

MARTENS, R.J. et al. Association of disease with isolation and virulence of *Rhodococcus equi* from farm soil and foals with pneumonia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, p.220-225, 2000.



MEIJER, W.G.; PRESCOTT J.F. *Rhodococcus equi*. **Veterinary Research**, v.35, p.383-396, 2004.

MISHRA, B. et al. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine**, v.6, p.9–24, 2010.

MONEGO F. et al. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* from Horse-Breeding Farms by means of multiplex PCR for the *vap* gene family. **Current Microbiology**, v.58, n.4, p.399-403, 2009.

MOSSER, D.M., HONDALUS, M.K. *Rhodococcus equi*: an emerging opportunistic pathogen. **Trends in Microbiology**, v.4, p.29-33, 1996.

MOSQUEIRA, V.C.F. et al. **Composição nanoparticulada contendo antibióticos para administração intramamária de uso animal**. BR PI 1002601-0. 2010.

MUSCATELLO, G. et al. Virulent *Rhodococcus equi* on horse farms: Source and spread of Rattles. In: **Proceedings of the Dorothy Havemeyer Foundation Workshop on *Rhodococcus equi***, Washington State University, Pullman, p.5, 2002.

MUSCATELLO, G. et al. **Rattles in Horses: Effects of Stud Management on Ecology of Virulent *Rhodococcus equi***. Australian Government Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, 2006.

MUSCATELLO, G. et al. *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of ‘rattles’. **Equine Veterinary Journal**, v.39, n.5, p.470-478, 2007.

OLIVA, B., et al. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p.185–187, 2003.

OZAKI, A.T.; DUARTE, P.C. Fitoterapicos utilizados na medicina veterinária, em cães e gatos. **Infarma**, v.18, n.11/12, p.17-25, 2006.

PADMAVATHY, N; VIJAYARAGHAVAN R. Enhanced bioactivity of ZnO Nanoparticles- an antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials**, v.9, p.35004–35011, 2008.

PEDROSA R. C., et al. A Necessidade do Desenvolvimento da Indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. **Quimica Nova**, v.24, p.147-152, 2001.

PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. **Clinical Microbiology**, v.4, p.20-34, 1991.

RAMYADEVI, J. et al. Copper nanoparticles synthesized by polyol process used to control hematophagous parasites. **Parasitology Research**, v.109, p.1403–1415, 2011.

RANJITA, S. et al. Present status of nanoparticle research for treatment of tuberculosis. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical**, v.4, p.100–116, 2011.

RIBEIRO, M.G. et al. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, 87-kb type I, and a new variant, 87-kb type III. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v.28, n.1, p.53-61, 2005.

RODRIGUES, A. G. Fitoterapia no Sistema Único de Saúde. **Anais da V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de Plantas Mediciniais**, Joinville, p. 68-69, 2006.

RUSSELL, D.A. et al. The LysR-type transcriptional regulator VirR is required for expression of the virulence gene *vapA* of *Rhodococcus equi* ATCC 33701. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.5576-5584, 2004.

SANDHIYA, S. et al. Emerging trends of nanomedicine- an overview. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.23, p.263-269, 2009.

SANTHOSHKUMAR, T. et al. Evaluation of stem aqueous extract and synthesized silver nanoparticles using *Cissus quadrangularis* against *Hippobosca maculata* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Experimental Parasitology**, v.132, p.156-165, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, p. 726-737, 2003.

SCOTT N.R. Nanotechnology and Animal Health. **OIE Scientific and Technical Review**, v.24, p.425–432, 2005.

SELEEM, M.N. et al. Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline. **FEMS Microbiology**, v.294, p.24–31, 2009.

SHEPHARD, M.J. et al. Immunogenicity of bovine parainfluenza type 3 virus proteins encapsulated in nanoparticle vaccines, following intranasal administration to mice. **Research in Veterinary Science**, v.74, p.187–190, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A Pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: A necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.1, p.35- 40, 2002.

SOPPIMATH, K.S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v.70, p.1-20, 2001.

STRATTON-PHELPS, M. et al. Risk of adverse effects in pneumonic foals treated with erythromycin versus other antibiotics: 143 cases (1986-1996). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.217, p.68-73, 2000.

TAKAI, S. et al. *Rhodococcus equi* infection in foals - current concepts and implications for future research. **Journal Equine Science**, v.6, p.105-119, 1995

TAKAI, S. et al. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in soil from five *R. equi*-endemic horse-breeding farms and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in isolates from soil and infected foals in Texas. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, n.3, p.489-484, 2001.

TAKARADA, K., et al. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiology and Immunology**, v.19, n.1, p.61-64, 2004.

TOYOOKA, K. et al. *Rhodococcus equi* can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. **Journal Medicine Microbiology**, p. 54, p.1007-1015, 2005.

TRONCARELLI, M.Z. et al. Mastite bovina sob nanocontrole: A própolis nanoestruturada como nova perspectiva de tratamento para rebanhos leiteiros orgânicos. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.124-136, 2013.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v.26, p.1025-1058, 2009.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A. et al. Havemeyer workshop report: *Rhodococcus equi* comes of age. **Equine Veterinary Journal**, v.41, n.1, p.93-95, 2009.

VIEIRA, T. R., et al. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v.27, p.536-539, 2004.

WALSH, R.D. et al. *Rhodococcus*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.14, p.282-287, 1993.

ZINK, M.C. et al. Electron microscopic investigation of intracellular events after ingestion of *Rhodococcus equi* by foal alveolar macrophages. **Veterinary Microbiology**, v.14, p.295-305, 1987.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A** – Concentração inibitória mínima (CIM- $\mu\text{g/ml}$ ) da planta medicinal *Melaleuca alternifolia* frente aos isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens nas formulações de óleo livre (OL), nanoemulsão (NE) e nanocápsula (NC) contendo óleo essencial, além do seu composto majoritário terpinen-4-ol, incorporado ao óleo essencial (T4 IN) e usado isoladamente, em uma formulação comercial (T4 IS).

Isolado	Origem	OL	NE	NC	OL+ NE	OL + NC	T4 IN	T4 IS
CIM (ug/mL)								
1	Clínico	>2.500	>2.500	1.250	625	625	>1.000	11.090
2		>2.500	>2.500	2.500	625	625	>1.000	11.090
3		>2.500	>2.500	2.500	625	1.250	>1.000	11.090
4		>2.500	>2.500	2.500	625	1.250	>1.000	11.090
5		>2.500	>2.500	2.500	625	625	>1.000	11.090
6		>2.500	>2.500	2.500	1.250	1.250	>1.000	5.545
7		>2.500	>2.500	2.500	625	625	>1.000	5.545
8		>2.500	>2.500	2.500	625	1.250	>1.000	11.090
9	Fezes	>2.500	>2.500	>2.500	312,5	1.250	>1.000	5.545
10		625	>2.500	>2.500	1.250	1.250	250	5.545
11		2.500	>2.500	>2.500	625	1.250	1.000	5.545
12		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	1.250	>1.000	11.090
13		625	2.500	>2.500	625	625	250	11.090
14		625	156,25	>2.500	312,5	312,5	250	11.090
15		1.250	>2.500	>2.500	1.250	1.250	500	11.090
16		>2.500	>2.500	>2.500	625	1.250	>1.000	5.545
17	Solo	>2.500	1.250	1.250	312,5	625	>1.000	11.090
18		>2.500	1.250	1.250	156,2	625	>1.000	11.090
19		>2.500	2.500	1.250	625	1.250	>1.000	5.545
20		>2.500	2.500	1.250	312,5	625	>1.000	11.090
21		>2.500	312,5	312,5	312,5	625	>1.000	11.090
22		>2.500	1.250	1.250	625	625	>1.000	5.545
23		>2.500	1.250	1.250	625	1.250	>1.000	11.090
24		>2.500	1.250	1.250	312,5	625	>1.000	11.090

**APÊNDICE B** – Concentração bactericida mínima (CBM- $\mu\text{g/ml}$ ) da planta medicinal *Melaleuca alternifolia* frente aos isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens nas formulações de óleo livre (OL), nanoemulsão (NE) e nanocápsula (NC) contendo óleo essencial, além do seu composto majoritário terpinen-4-ol, incorporado ao óleo essencial (T4 IN) e usado isoladamente, em uma formulação comercial (T4 IS).

Isolado	Origem	OL	NE	NC	OL+ NE	OL + NC	T4 IN	T4 IS
CBM (ug/mL)								
1	Clínico	>2.500	>2.500	>2.500	1.250	1.250	>1.000	22.180
2		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	2.500	>1.000	22.180
3		>2.500	>2.500	>2.500	2.500	2.500	>1.000	11.090
4		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	2.500	>1.000	22.180
5		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	2.500	>1.000	22.180
6		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	2.500	>1.000	11.090
7		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	1.250	>1.000	11.090
8		>2.500	>2.500	>2.500	2.500	1.250	>1.000	11.090
9	Fezes	>2.500	>2.500	>2.500	2.500	2.500	>1.000	22.180
10		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	2.500	>1.000	22.180
11		>2.500	>2.500	>2.500	625	1.250	>1.000	11.090
12		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	2.500	>1.000	22.180
13		>2.500	>2.500	>2.500	2.500	2.500	>1.000	44.360
14		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	312,5	>1.000	22.180
15		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	1.250	>1.000	22.180
16		>2.500	>2.500	>2.500	2.500	2.500	>1.000	11.090
17	Solo	>2.500	>2.500	>2.500	625	1.250	>1.000	22.180
18		>2.500	>2.500	>2.500	312,5	1.250	>1.000	22.180
19		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	1.250	>1.000	22.180
20		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	1.250	>1.000	11.090
21		>2.500	>2.500	>2.500	625	1.250	>1.000	11.090
22		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	1.250	>1.000	11.090
23		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	1.250	>1.000	11.090
24		>2.500	>2.500	>2.500	1.250	1.250	>1.000	11.090