



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA  
DE SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**VALDEANE DIAS CERQUEIRA**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia  
origanoides* Kunth E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
FRENTE A DIFERENTES SOROTIPOS DE *Haemophilus  
parasuis***

Feira de Santana, BA  
2014

**VALDEANE DIAS CERQUEIRA**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia  
origanoïdes* Kunth E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
FRENTE A DIFERENTES SOROTIPOS DE *Haemophilus  
parasuis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Heiddy Márquez Alvarez (UEFS)  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Angélica Maria Lucchese (UEFS)

Feira de Santana, BA  
2014

Dedico essa vitória ao meu pai Valdêr que estará sempre comigo e ao meu filho João Arthur, seu nascimento durante esse trabalho me deu a força necessária para suportar as dificuldades e não desistir.

## AGRADECIMENTOS

A dor da perda do meu pai e o nascimento de meu filho marcaram este difícil período da minha vida, mas muitas pessoas me mostraram o quanto é valioso ter alguém disposto a nos compreender e a ajudar, mesmo que seja nas pequenas coisas.

Agradeço a Deus pela benção da vida e sempre me permitir amadurecer através dos obstáculos.

Ao meu noivo/marido Rogério que provou só existir união com amor, companheirismo e compreensão. Passei por muitas aflições e você sempre conseguia uma forma de me tranquilizar. Tenho certeza que nossa relação é algo especial e único.

À minha família: minha mãe Sônia, minha irmã Valdeni, meus sobrinhos Melissa e Augusto, que mesmo longe fisicamente sempre se mantiveram presentes na minha vida.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angélica Maria Lucchese pela orientação, disponibilidade em ajudar sempre que necessário e principalmente por confiar e acreditar que seria possível concluir esse trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Heiddy Márquez Alvarez por não me abandonar e compreender as minhas dificuldades.

Ao Prof. Dr. José Lúcio dos Santos por permitir a utilização das instalações, materiais e equipamentos da Microvet e não medir esforços para prover recursos.

A Daniela Mendes, que mesmo grávida me auxiliou na execução dos meus ensaios.

À equipe da Microvet, em especial ao setor de Diagnóstico que me acolheu e com a alegria e descontração que só os mineiros têm.

A Serly Santiago por ser meu porto seguro na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

A Helton Ricardo por sua agilidade, disponibilidade e atenção. Te admiro por essas qualidades tão escassas nos dias de hoje.

A Nilcéia, secretária do programa de pós-graduação de microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, pela compreensão das minhas dificuldades na gravidez.

A todos o meu muito obrigada!

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

## RESUMO

A suinocultura vem se sobressaindo nos últimos anos no Brasil, por isso aumentam os estudos para tratamento das doenças que causam perdas de carcaça dos animais, como a doença de Glässer, provocada pelo *Haemophilus parasuis*. Alguns trabalhos incipientes demonstram a resistência humana a antibióticos devido ao consumo de carnes produzidas com altos índices destas substâncias, e tratamento alternativos com produtos naturais vem sendo desenvolvidos. *Lippia origanoides* Kunth se apresenta como uma fonte natural de substâncias antimicrobianas devido à composição do seu óleo essencial obtido principalmente das folhas desta planta. Este trabalho avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente a amostras de campo do *Haemophilus parasuis* com sorotipos 1,2,4,5,9,10,12,13,14 e um não sorotipável. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação das folhas secas após três horas, e na análise da composição química, o carvacrol foi identificado como componente predominante, caracterizando-o como quimiotipo B. Os resultados de atividade antimicrobiana demonstram o efeito inibitório do óleo essencial para todas as amostras de bactérias testadas. O melhor resultado encontrado foi de 0,005% frente a amostra MV12315 (sorotipo 10) enquanto o menos satisfatório foi de 0,078% contra a amostra MV12196 (sorotipo 12). Os resultados obtidos demonstram a ação bactericida do óleo para os diferentes sorotipos do *Haemophilus parasuis*.

**Palavras-chave:** Atividade Antimicrobiana. *Lippia origanoides*. *Haemophilus parasuis*. Concentração Inibitória Mínima (CIM).

## ABSTRACT

Pig farming has become increasingly important in recent years in Brazil, because of this, studies for the treatment of diseases that cause the loss of mass of meat animals has increased significantly, such as the Glasser's disease caused by *Haemophilus parasuis*. Some initial studies have shown human resistance to antibiotics due to the consumption of meat produced with high levels of these substances, and alternatively treatments have been developed from natural products. *Lippia origanoides Kunth* is presented as a natural source of antimicrobial substances due to the composition of the essential oil obtained, mainly, from the leaves of this plant. In this study the antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia origanoides Kunth*, by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against *Haemophilus parasuis* serotypes 1,2,4,5,9,10,12,13,14 and one untypable was studied. Essential oils were obtained by hydrodistillation of the dried leaves and the chemical composition analysis revealed the presence of carvacrol as the predominant component, which characterizes the chemotype B. The results of the antimicrobial activity demonstrated the inhibitory effect of essential oil samples for all tested bacteria. The best result was 0.005% against the sample MV12315 (serotype 10) while the least satisfactory was 0.078% against the sample MV12196 (serotype 12). Results demonstrate the bactericidal action of the oil against the different serotypes of *Haemophilus parasuis*.

**Keywords:** Antimicrobial Activity. *Lippia origanoides*. *Haemophilus parasuis*. Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	Evolução do abate de suínos por trimestre – Brasil- Trimestres 2008-2013	19
<b>Figura 02</b>	Pleurisia fibrinosas em suínos	21
<b>Figura 03</b>	Imagem de microscopia eletrônica do <i>Haemophilus parasuis</i>	23
<b>Figura 04</b>	Isolamento do <i>Haemophilus parasuis</i>	23
<b>Figura 05</b>	Estrutura da Enrofloxacina	26
<b>Figura 06</b>	Determinador de Umidade Série ID Versão 1.8 Marte®	32
<b>Figura 07</b>	Cromatógrafo a gás Shimadzu CG-2010	33
<b>Figura 08</b>	Amostras do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> Kunth	34
<b>Figura 09</b>	Ampola da amostra Liofilizada de <i>Haemophilus parasuis</i>	35
<b>Figura 10</b>	Bacterioteca	35
<b>Figura 11</b>	Estufa Bacteriológica	39
<b>Figura 12</b>	Jarra de anaerobiose	39
<b>Figura 13</b>	Repique do <i>Haemophilus parasuis</i>	40
<b>Figura 14</b>	Microscopia da Colônia do <i>Haemophilus parasuis</i>	40
<b>Figura 15</b>	Obtenção da suspensão bacteriana correspondente a 2 da escala nefelométrica de MacFarland	40

<b>Figura 16</b>	Espectrofotômetro	41
<b>Figura 17</b>	Homogeneização da amostra no Vortex	41
<b>Figura 18</b>	Filtração da amostra diluída	42
<b>Figura 19</b>	Representação da microdiluição em placa	43
<b>Figura 20</b>	Preparação da placa de microdiluição	44
<b>Figura 21</b>	Inoculação das placas para o CBM	45
<b>Figura 22</b>	Percentual de amostras por sorotipo	49
<b>Figura 23</b>	Placa CIM da Amostra MV 12340 (Sorotipo 1)	51
<b>Figura 24</b>	Placa CIM da Amostra MV 12149 (Sorotipo 2)	51
<b>Figura 25</b>	Placa CIM da Amostra MV 12285 (Sorotipo 4)	51
<b>Figura 26</b>	Placa CIM da Amostra MV 12343 (Sorotipo 5)	51
<b>Figura 27</b>	Placa CIM da Amostra MV 11986 (Sorotipo 9)	51
<b>Figura 28</b>	Placa CIM da Amostra MV 12315 (Sorotipo 10)	51
<b>Figura 29</b>	Placa CIM da Amostra MV 12196 (Sorotipo 12)	52
<b>Figura 30</b>	Placa CIM da Amostra MV 12146 (Sorotipo 13)	52
<b>Figura 31</b>	Placa CIM da Amostra MV 12331 (Sorotipo 14)	52
<b>Figura 32</b>	Placa CIM da Amostra MV 12335 (Não sorotipável)	52

<b>Figura 33</b>	Placa CIM da Solução de Tween (1)	54
<b>Figura 34</b>	Placa CIM da Solução de Tween (2)	54
<b>Figura 35</b>	Placa CIM da Solução de Tween (3)	54
<b>Figura 36</b>	Placa CIM da Solução de Tween (4)	54
<b>Figura 37</b>	Placa da Determinação da CBM da amostra MV 12315 (Sorotipo 10)	55
<b>Figura 38</b>	Placa da Determinação da CBM da amostra MV 12196 (Sorotipo 12)	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b>	Exportação Mundial de Carne Suína (Mil Toneladas - em equivalente-carcaça)	20
<b>Tabela 02</b>	Perdas econômicas por pleurísias (aderências)	22
<b>Tabela 03</b>	Frequência de sorotipos de <i>H. parasuis</i> isolados no Brasil 1995-1996	25
<b>Tabela 04</b>	Amostras de <i>Haemophilus parasuis</i> selecionadas	36
<b>Tabela 05</b>	Resultado do Antibiograma das amostras de <i>H. parasuis</i> testadas	37
<b>Tabela 06</b>	Escala de MacFarland	41
<b>Tabela 07</b>	Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Lippia origanoides</i> Kunth	48
<b>Tabela 08</b>	Valores em (mg/mL) da CIM para o controle positivo Enrofloxacina e em (%) da CIM e da CBM	53

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 01</b>	Cálculo do rendimento de óleos essenciais	32
<b>Equação 02</b>	Determinação dos Índices de Kovats	34

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
2.1	OBJETIVOS GERAIS	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>19</b>
3.1	SUINOCULTURA NO CENÁRIO NACIONAL E MUNDIAL	19
3.2	DOENÇA DE GLÄSSER	21
<b>3.2.1</b>	<b><i>Haemophilus parasuis</i></b>	<b>22</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Sorotipos de <i>Haemophilus parasuis</i></b>	<b>24</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Tratamento</b>	<b>26</b>
3.3	PROIBIÇÃO DO USO DE ANTIBIÓTICOS EM ANIMAIS PRODUTORES DE CARNE	27
3.4	<i>Lippia organoides</i>	28
3.5	UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIMICROBIANOS	29
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
4.1	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	31

4.2	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL	32
4.3	MICRO-ORGANISMOS	34
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	37
4.4.1	<b>Preparo dos meios de cultura</b>	37
4.4.2	<b>Preparo das soluções</b>	38
4.4.3	<b>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</b>	38
4.4.4	<b>Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)</b>	45
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	47
5.1	ÓLEO ESSENCIAL	47
5.2	TRIAGEM DE MICRO-ORGANISMOS	49
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	50
6	<b>CONCLUSÃO</b>	57
	<b>REFERÊNCIAS</b>	58

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (Abipecs), a carne suína é a mais consumida no mundo, fornecendo cerca de 38% da ingestão proteica diária mundial.

A suinocultura nacional vem progressivamente se desenvolvendo e se destacando no mercado mundial. Diversas doenças podem comprometer a sanidade do rebanho, e conseqüentemente a produção de carne suína e dentre elas está a doença de Glässer, que tem relevância econômica em todo mundo. Causada pelo *Haemophilus parasuis*, um importante patógeno bacteriano de suínos, a mortalidade em granjas susceptíveis é associada com a falta de imunidade para estirpes virulentas, recentemente introduzidas, e os animais que sobrevivem à fase aguda da infecção podem desenvolver poliserosite, o que muitas vezes resulta em condenação de carcaça (OLIVEIRA; PIJOAN, 2002).

Na pecuária, os antibióticos são usados extensivamente para prevenir doenças e para promover o crescimento dos animais, prática que envolve a administração simultânea e em massa deste tipo de medicamento. Alguns dos mesmos antibióticos ou substâncias são utilizados em animais destinados à alimentação e na medicina humana, levando ao risco real de surgimento e disseminação de bactérias resistentes, incluindo aquelas capazes de causar infecções em animais e pessoas. Os problemas associados com o uso de antibióticos na criação de animais estão crescendo em todo o mundo sem que existam evidências concretas de sua necessidade ou benefícios, levando ao crescente reconhecimento da necessidade de uma ação urgente (OMS 2012).

Drogas empregadas em terapêutica veterinária induzem o aparecimento de formas microbianas resistentes e prejudiciais à saúde e à terapia humana, despertando a atenção das autoridades governamentais em saúde pública. Os sucessivos relatos de problemas sanitários, decorrentes da resistência microbiana a antibióticos, determinaram a instituição de um comitê formado por representantes de entidades envolvidas com a alimentação animal e a indústria de rações, tendo sido criado o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos (PNCRB) (SUZUKI; FLEMMING; SILVA, 2008).

Diante da crescente necessidade de substituição dos agentes microbianos convencionais, novas fontes vêm sendo estudadas quanto à sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano, com destaque para os óleos essenciais. Óleos essenciais de plantas mostraram ter atividade contra muitas espécies de bactérias: *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Clotridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio para-haemolyticus*, *Pseudomonas* spp, *Bacillus cereus*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, entre várias outras, Gram positivas ou negativas, aeróbias ou não (BAGAMBOULA et al., 2003 *apud* SILVA, 2010).

A espécie *Lippia organoides* Kunth (Verbenaceae) é uma planta nativa do Brasil, conhecida popularmente como salva-de-marajó (PASCUAL et al., 2001). Seu óleo essencial é rico em timol, carvacrol e  $\gamma$ -terpineno, com ação antimicrobiana relatada frente a *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus neofarmans*, *Trichophyton rubrum* T544, *Fonsecaea pedrosoi*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mutans* (OLIVEIRA et al., 2007), sugerindo que possa apresentar ação bactericida frente a outros patógenos.

Considerando o potencial biológico desta espécie vegetal e a importância de fontes alternativas aos antibióticos em uso, este trabalho analisou a composição química do óleo essencial extraído de folhas de *Lippia organoides* oriunda do estado da Bahia e avaliou a atividade antimicrobiana, frente a amostras isoladas em campo de *Haemophilus parasuis* com diferentes sorotipos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth e a atividade antimicrobiana frente a diferentes sorotipos de *Haemophilus parasuis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

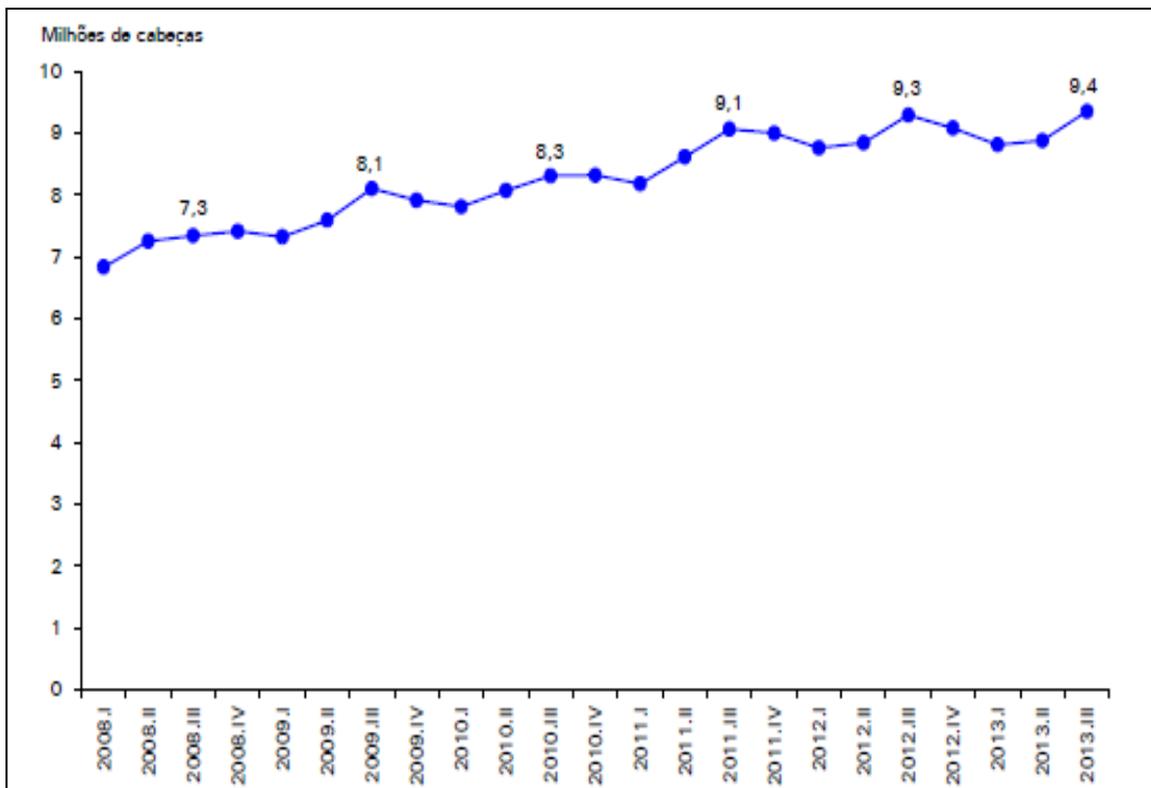
1. Determinar a composição química do óleo essencial das folhas de *Lippia origanoides*.
2. Realizar um levantamento da frequência dos sorotipos diagnosticados no ano de 2012, em suínos brasileiros, em banco de dados da bacterioteca disponível no laboratório da Microvet.
3. Investigar a atividade antimicrobiana do óleo essencial frente a diferentes sorotipos de *Haemophilus parasuis*

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 SUINOCULTURA NO CENÁRIO NACIONAL E MUNDIAL

A Suinocultura é uma das atividades da agropecuária mais difundida no mundo. O Brasil aprimorou técnicas de manejo e sanidade, e vem se consolidando como um dos maiores produtores mundiais de carne suína. No 3º trimestre de 2013 foram abatidas 9,351 milhões de cabeças de suínos, representando um aumento de 5,3% em relação ao trimestre imediatamente anterior e de 0,6% na comparação com o mesmo período de 2012. A série histórica do abate trimestral de suínos a partir de 2008 (Figura 01) mostra que o abate desta espécie tem sido crescente no comparativo anual entre os terceiros trimestres. O resultado deste trimestre é recorde histórico desde que a Pesquisa Trimestral do Abate de Animais foi criada em 1997 (IBGE, 2013).

**Figura 01** - Evolução do abate de suínos por trimestre – Brasil- Trimestres 2008-2013



Fonte: IBGE (2013)

A cada ano, a participação brasileira no comércio internacional vem crescendo, com destaque para a produção de carne bovina, suína e de frango. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014), até 2020, a expectativa é que a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial. Já a carne de frango terá 48,1% das exportações mundiais e a participação da carne suína será de 14,2%.

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (Abipecs), o Brasil é o 4º produtor mundial de carne suína, com uma produção de 3370 mil toneladas em equivalente carcaça, situação que estabelece o país na mesma posição como exportador, com 600 mil toneladas em equivalente carcaça no ano de 2013 (Tabela 01).

**Tabela 01 - Exportação Mundial de Carne Suína (Mil toneladas - em equivalente-carcaça)**

País	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<b>Estados Unidos</b>	<b>2.110</b>	<b>1.857</b>	<b>1.915</b>	<b>2.354</b>	<b>2.441</b>	<b>2.292</b>
<b>U. Europeia</b>	<b>1.727</b>	<b>1.366</b>	<b>1.705</b>	<b>2.151</b>	<b>2.171</b>	<b>2.200</b>
<b>Canadá</b>	<b>1.129</b>	<b>1.123</b>	<b>1.159</b>	<b>1.197</b>	<b>1.243</b>	<b>1.245</b>
<b>Brasil</b>	<b>625</b>	<b>707</b>	<b>619</b>	<b>584</b>	<b>661</b>	<b>600</b>
<b>China</b>	<b>223</b>	<b>232</b>	<b>278</b>	<b>244</b>	<b>235</b>	<b>250</b>
<b>Chile</b>	<b>142</b>	<b>152</b>	<b>130</b>	<b>139</b>	<b>180</b>	<b>185</b>
<b>México</b>	<b>91</b>	<b>70</b>	<b>78</b>	<b>86</b>	<b>95</b>	<b>110</b>
<b>Belarus</b>	<b>32</b>	<b>31</b>	<b>62</b>	<b>85</b>	<b>104</b>	<b>75</b>
<b>Austrália</b>	<b>48</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>41</b>	<b>36</b>	<b>35</b>
<b>Vietnã</b>	<b>11</b>	<b>21</b>	<b>19</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>
<b>Ucrânia</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>17</b>	<b>29</b>	<b>4</b>
<b>Outros</b>	<b>35</b>	<b>33</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>34</b>	<b>37</b>
<b>Total</b>	<b>6.173</b>	<b>5.632</b>	<b>6.031</b>	<b>6.948</b>	<b>7.254</b>	<b>7.058</b>

Fonte: Abipecs (2014)

### 3.2 DOENÇA DE GLÄSSER

A Doença de Glässer atualmente é considerada uma das doenças mais importantes economicamente na indústria de suínos devido aos altos custos com tratamentos antibióticos e ao descarte de animais, mesmo em granjas com alto padrão sanitário (NEDBALCOVA et al., 2006). A doença tem um início rápido, ocorrendo poucos dias após a exposição ao agente (OLIVEIRA; PIJOAN, 2004).

Glässer em 1910 relatou pela primeira vez a associação de um pequeno bastonete Gram-negativo com quadros de pleurisia serofibrinosa (Figura 02), pericardite, peritonite, artrite e meningite em suínos (LITTLE, 1970 *apud* MENIN; GAVA; VAZ, 2005).

**Figura 02** - Pleurisia serofibrinosas em suínos



**Fonte:** Acervo Fotográfico da Microvet

Os resultados da pesquisa de Silva (2010) indicaram haver relação entre o volume pulmonar afetado e o desenvolvimento corporal. Assim animais com hepatização superior a 10% do parênquima pulmonar tinham uma redução de 9,3% em seu desenvolvimento. Quando, além do comprometimento pulmonar, os animais apresentavam também pleurisias, a redução do desenvolvimento corporal era de 14,7%, conforme tabela 02.

**Tabela 02** - Perdas econômicas por pleurísias (aderências)

<b>Prejuízo em conversão alimentar</b>	<b>3 a 10%</b>
<b>Prejuízo pela mortalidade a cada 1%</b>	U\$ 1,50/animal

Fonte: SILVA (2010)

A doença de Glässer é causada pelo *Haemophilus parasuis*, e geralmente afeta suínos desde o desmame até 12 semanas de idade, todavia pode ocorrer entre duas e quatro semanas de idade quando sujeitos a condições ambientais estressantes. Anorexia, pirexia, claudicação, apatia e convulsões são características da doença, e os animais podem morrer de repente sem apresentar nenhum desses sintomas (QUINN et al., 2005).

Em rebanhos com níveis de patógenos controlados, usualmente são afetados animais em estágio de produção mais avançado. Neste caso a manifestação de lesões é esporádica e menos severa quando comparada com populações mais susceptíveis. As lesões geralmente estão restritas ao pulmão, que apresenta exsudato purulento nos brônquios e bronquíolos; contudo, ocasionalmente os animais afetados podem apresentar artrite (OLIVEIRA; PIJOAN, 2002).

### 3.2.1 *Haemophilus parasuis*

O *Haemophilus parasuis* é um bastonete, pequeno, pleomórfico da família Pasteurellaceae, variando de um simples cocobacilo a longas e filamentosas cadeias (Figura 03), mas sua expressão é influenciada por cultivos *in vitro* (BIBERSTEIN; WHITE, 1969; MENIN; GAVA; VAZ, 2005; ALMEIDA et al., 2008).

As espécies de *Haemophilus* são bacilos Gram-negativos pequenos, menores que 1µm x 1 a 3 µm e anaeróbios facultativos. O *Haemophilus parasuis* faz parte da microbiota normal do trato respiratório superior dos suínos (QUINN et al., 2005).



### 3.2.2 Sorotipos de *Haemophilus parasuis*

Tradicionalmente, amostras de *H. parasuis* têm sido classificadas por sorotipagem. Embora esse método seja relativamente útil para caracterização de cepas e preparo de vacinas, não é discriminativo o bastante para epidemiologia. A identificação do sorotipo é um dos critérios essenciais nos programas imunoproláticos baseados em vacinas autógenas. Entretanto, é necessário considerar que mais de um sorotipo pode estar presente no rebanho e até de um mesmo animal, com isso, a amostra isolada para produzir a bacterina pode não ser aquela envolvida no desenvolvimento da doença. (SMART; MINIATS; MACINNES, 1988; MACEDO et al., 2011).

A maioria dos estudos epidemiológicos em infecções por *H. parasuis* são baseadas em informações de sorotipagem (RAFIEE; BLACKAL, 2000). Atualmente são conhecidos 15 sorotipos do *H. parasuis* (SOBESTIANSKY et al., 2001 *apud* MENIN; GAVA; VAZ, 2005), entretanto, uma alta porcentagem de amostras não é sorotipável. Os sorotipos 1, 5, 10, 12, 13 e 14 são considerados altamente virulentos com morte ou morbidade em quatro dias, os sorotipos 2, 4 e 15, considerados moderadamente virulentos, o sorotipo 8, considerado de virulência média e os sorotipos 3, 6, 7, 9 e 11 não são virulentos (MACEDO et al, 2011).

A composição da cápsula de duas cepas (sorotipos 5 e 15) de *H. parasuis* foi examinada por Perry et al. (2013). Estes autores observaram que a cápsula era composta de uma cadeia principal com uma unidade de repetição de dissacarídeo B-glucose-6P e 2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxi-D-galactopiranoose, que é encontrado em mamíferos, mas esta foi a primeira vez que ele havia sido demonstrado em bactérias. Diferenças no polissacarídeo capsular poderiam ser responsável por diferentes sorotipos de *H. parasuis* (PERRY et al., 2013 ; COSTA-HURTADO, ARAGON; 2013)

Santos (1997) analisou 321 amostras de *H. parasuis* isolados de suínos oriundos de 204 propriedades e os sorotipos mais prevalentes foram 1, 4, 5 e 12 (representando 47% dos isolados), com 8,7% das amostras não sorotipáveis, conforme Tabela 03.

**Tabela 03** - Frequência de sorotipos de *H. parasuis* isolados no Brasil 1995-1996

SOROVARES	ISOLAMENTO(S)	
	NÚMERO(S)	FREQUENCIA
1	45	14,0
2	11	3,4
3	9	2,8
4	39	12,2
5	32	10,0
6	12	3,7
7	23	7,2
8	8	2,5
9	20	6,2
10	24	7,5
11	16	5,0
12	36	11,2
13	6	1,9
14	9	2,8
15	3	0,9
NS*	28	8,7
<b>TOTAL</b>	321	100,0

\*NS = Não sorotipável

Fonte: SANTOS (1997)

O exame de 290 isolados na antiga República Democrática Alemã indicou uma alta prevalência de sorovares 5 e 4, o que representa 23,8 e 17,2% dos isolados, respectivamente. Estas freqüências são semelhantes aos valores relatados para isolados dos Estados Unidos e Canadá, onde sorovares 5 e 4 corresponderam a 24,3 e 16,1%, respectivamente, dos isolados examinados. Assim, os dados tanto da América do Norte e Europa indicam sorovares 4 e 5 isolados como importantes do material patológico. Os demais sorovares foram detectados em baixa freqüências, variando de 0 a 5,5%. (KIELSTEIN; RAPP-GABRIELSON, 1992).

De acordo com Santos et al. (1998) , os sorotipos mais prevalentes entre os isolados no Brasil são 1, 4, 5 e 12, e fatores estressantes como transporte dos animais, mudança de ambiente e mistura de lotes, assim como baixas temperaturas,

podem ser responsáveis pela queda da resistência e conseqüente desenvolvimento da doença.

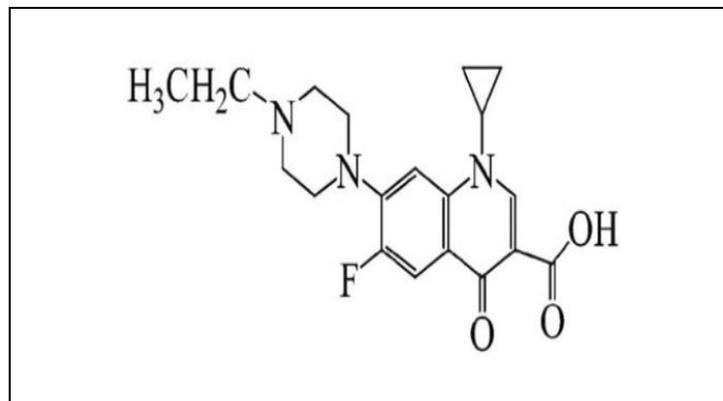
### 3.2.3 Tratamento

O uso profilático ou terapia oral com antibióticos possui pouco valor em surtos severos de *H. parasuis*. Altas doses de antibióticos podem ser administradas por via parenteral nos animais doentes e repetir a dose 24 horas depois. Como medida de prevenção pode-se optar por medicar o lote por via oral (MENIN; GAVA; VAZ, 2005).

A penicilina, amoxicilina, fluoroquinolona, cefalosporina, gentamicina, espectinomicina e sulfas tem atuado de forma significativa. Já à tetraciclina, eritromicina e lincosamida tem mostrado grande resistência (TRIGO et al., 1996). Contudo, deve ser realizado antibiograma para o rebanho, pois a sensibilidade pode variar de acordo com a cepa que está presente (MENIN; GAVA; VAZ, 2005).

A enrofloxacinina foi a primeira fluoroquinolona introduzida e aprovada na medicina veterinária, sendo amplamente utilizada em espécies domésticas, exóticas e silvestres, apresentando ação bactericida contra uma grande variedade de microorganismos (ALTE et al., 2012). Sua absorção é boa e amplamente distribuída nos tecidos, com maiores concentrações no fígado e rins, sendo eliminada pela urina e fezes (BOTSOGLOU; FLETOURIS, 2001 *apud* SOUZA, 2012)

**Figura 05** - Estrutura da Enrofloxacinina



**Fonte:** ALTE et al. (2012)

Macedo et al. (2011) avaliaram o tratamento de vinte e três suínos contaminados com o *H. parasuis* e constataram que a enrofloxacina reduziu significativamente a carga contaminante, mas não foi capaz de eliminar completamente o micro-organismo.

O uso de vacinas autógenas tem mostrado resultados satisfatórios, mas alguns tópicos devem ser levados em consideração. Após selecionar as sorovares prevalentes, devem-se tirar as cepas que foram originalmente isoladas de sítios sistêmicos; e esta seleção deve ser feita periodicamente, pois algumas cepas podem ser alteradas. A definição do calendário de vacinação também é muito importante, que vai depender do maior período de mortalidade dos leitões. Se esta for durante a fase inicial de creche, os leitões devem ser vacinados na maternidade e ao desmame (MENIN; GAVA; VAZ, 2005; ALMEIDA, et al. 2008).

### 3.3 PROIBIÇÃO DO USO DE ANTIBIÓTICOS EM ANIMAIS PRODUTORES DE CARNE

O uso incorreto de antibióticos em veterinária podem deixar resíduos nos produtos de origem animal. Estes resíduos podem ter efeitos tóxicos diretos sobre os consumidores, por exemplo, reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis, ou podem causar problemas indiretamente através da indução de cepas resistentes de bactérias (STOLKER; BRINKMAN, 2005 *apud* SOUZA, 2012).

O problema da resistência microbiana está aumentando e a perspectiva para o uso de drogas antimicrobianas no futuro é ainda indecisa. Portanto, ações devem ser tomadas para reduzir esse problema, por exemplo, para controlar o uso de antibióticos, desenvolver pesquisas para a melhor compreensão do mecanismo genético de resistência, e continuar estudos para desenvolver novas drogas, sintéticas ou naturais (SILVA; HOLLENBACH, 2010).

Representantes de produtores e da indústria de carnes apoiam o esforço da Food and Drug Administration (FDA), agência que regulamenta medicamentos e alimentos nos Estados Unidos, para limitar o uso de antibióticos em animais de corte. A orientação da FDA, divulgada em dezembro de 2013, busca eliminar progressivamente o uso de antibióticos para promover o crescimento de frangos,

bovinos e suínos. Acredita-se que a utilização continuada desses medicamentos em fazendas tenha contribuído para a proliferação de bactérias resistentes, que põem em perigo a saúde humana. Com estas novas regras a indústria empregaria antibióticos somente quando clinicamente necessário, tornando ilegal usá-los como promotores de crescimento.

Lara (2011) analisou a interferência do tratamento preventivo com antimicrobianos sobre a colonização de agentes da microbiota do trato respiratório de leitões e comprovou que a utilização de antimicrobianos de forma excessiva e contínua, pode desequilibrar a microbiota de animais saudáveis, uma vez que os mesmos são medicados coletivamente.

A grande polêmica no uso de antibióticos é que pode haver a diminuição da eficácia destas substâncias empregadas na medicina humana por um fortalecimento da resistência bacteriana. A consequência imediata deste fato seria o aumento permanente das doses empregadas aos humanos, com uso de antibióticos cada vez mais potentes e tóxicos. Este ponto de vista é defendido entre outras comunidades, por associações de consumidores em todo o mundo. No entanto, os fatos cientificamente provados demonstram que, até o momento, não existem evidências reais e concretas que os antibióticos usados em medicina veterinária podem comprometer a eficiência dos antibióticos usados em medicina humana. Em países onde o uso de alguns antibióticos foi proibido em produção animal, houve um incremento de aproximadamente 30% no uso terapêutico (GRANJA, 2004).

De acordo com a FAO (2009) a avaliação de risco quanto a ingestão de alimentos de origem animal com resíduos de agentes antimicrobianos, depende se estes resíduos representam ou não perigo para saúde humana, por exercer pressão sobre a microbiota intestinal, o que pode favorecer o crescimento de microorganismos com resistência natural ou adquirida.

### 3.4 *Lippia origanoides*

*Lippia origanoides* (Verbenaceae) é uma planta conhecida como Salva-de-Marajó, alecrim de tabuleiro, oregano do monte, entre outras denominações populares (PASCUAL, 2001; VEGA-VELA et al., 2013). A sua semelhança olfativa

com o orégano inspirou este nome aos botânicos Humboldt, Bonpland e Kunth. É a primeira das espécies brasileiras onde foi identificada a presença de timol nos óleos essenciais (MORAIS et al., 1972).

As folhas são amplamente utilizadas como um tempero na culinária e na medicina tradicional (PASCUAL, 2001; OLIVEIRA et al., 2007). A composição química do óleo essencial obtido das folhas mostrou um elevado teor de monoterpenos oxigenados (VICUÑA; STASHENKO; FUENTES, 2010), mas com elevada variação nos constituintes químicos (VEGA-VELA et al., 2013). Sete quimiotipos foram propostos, baseados na quantidade relativa dos compostos principais:  $\alpha$ - e  $\beta$ -felandrenos, *p*-cimeno, limoneno (quimiotipo A); carvacrol (quimiotipo B); timol (quimiotipos C e D); eucaliptol,  $\alpha$ -felandreno (quimiotipo E); *p*-cimeno, eucaliptol e éter metílico do timol (quimiotipo F) e *p*-cimeno, éter metílico do timol, timol e  $\gamma$ -terpineno (quimiotipo G) (STASHENKO et al., 2010; VEGA-VELA et al., 2013).

A atividade antimicrobiana do carvacrol e timol têm sido demonstrados (PASCUAL et al., 2001; GOMES; NOGUEIRA, MORAES, 2011, RIBEIRO et al. 2013). Ambas as substâncias parecem tornar a membrana da célula permeável, e é capaz de desintegrar a membrana externa de bactérias gram-negativas (BURT, 2004). Oliveira et al. (2007) constataram a ação antimicrobiana do óleo essencial de um quimiotipo de *Lippia origanoides* rico em carvacrol e timol, frente a *Candida albicans* Sorotipo B, *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans* Sorotipo A, *Trichophytum rubrum*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans*.

### 3.5 UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIMICROBIANOS

Substâncias antibacterianas de plantas foram descobertas, basicamente, através da observação de sua habilidade de inibir o crescimento de micro-organismos expostos a estes compostos, tendo por consequência a influência dos métodos e micro-organismos utilizados nos resultados (SOUZA; AVANCINI; WIEST, 2000). Extratos herbais e extratos vegetais fazem parte de uma classe de produtos

que poderão substituir os agentes antimicrobianos, devido aos efeitos benéficos associados aos seus princípios ativos e compostos secundários (KAMEL, 2000).

Pieri et al. (2012) testaram o efeito antimicrobiano através de testes de difusão em ágar com duas soluções a 10% de óleos obtidos de duas diferentes espécies de copaíba (*Copaifera officinalis* e *C. langsdorffii*) contra *A. pleuropneumoniae*, *C. freundii* e *Haemophilus parasuis*. Os óleos ensaiados demonstraram incapacidade para inibir essas bactérias.

A composição química, atividade farmacológica e usos tradicionais de 52 espécies atribuídas ao gênero *Lippia* (Verbenaceae), usadas na América do Sul, Central e África Tropical, foram revistos e comparados. Uma revisão da literatura demonstra que estas espécies são utilizadas principalmente para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e respiratórios (PASCUAL 2001), resfriados, bronquite e tosse (GOMES; NOGUEIRA, MORAES, 2011).

O efeito dos óleos essenciais sobre as bactérias dependem de uma série de fatores, dentre eles, a forma e a época de coleta da planta, podendo influenciar na composição dos constituintes, que vão atuar sobre as bactérias e outros micro-organismos que se deseja combater, podendo ser uma ótima alternativa para substituir os antimicrobianos promotores de crescimento (SILVA; NASCIMENTO; SILVA, 2010).

O uso de produtos naturais vem ganhando destaque na sanidade animal, pois podem ser fontes promissoras de substâncias bioativas contra parasitos e micro-organismos. Por isso, espécies de *Lippia* vêm sendo exploradas também na medicina veterinária, microbiologia, parasitologia, zootecnia e aquicultura, devido ao seu uso potencial e facilidade de produção agrônômica em escala (SOARES; DIAS, 2013). Ozaki e Duarte (2006) realizaram um levantamento bibliográfico e concluíram que na saúde animal, o emprego da fitoterapia é pouco abordado e explorado, e que novos conhecimentos e ações possibilitarão a utilização de plantas medicinais em tratamentos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O processo de obtenção do óleo essencial foi realizado no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON-UEFS), em triplicata.

O material vegetal foi coletado em Santa Terezinha, na Bahia, em junho de 2011 e uma excisata foi depositada no Herbário da UEFS (HUEFS80195). Após secagem a temperatura ambiente e ao abrigo do sol, as folhas foram separadas dos caules e utilizadas para a extração de óleo essencial.

O material foi pesado e em seguida, triturado em um liquidificador industrial com a frequente adição de água destilada para facilitar o processo. Após trituração, a biomassa vegetal foi transferida para um balão de destilação com capacidade para 5 L, sendo submetida à hidrodestilação, em um aparelho de Clevenger por um período de três horas.

Os óleos obtidos foram retirados do tubo separador com o auxílio de uma micropipeta do tipo Pasteur, sendo desidratados pela adição de sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrados e conservados em frascos de vidro. Este material foi armazenado sob baixa temperatura em freezer, até a realização da análise química e dos testes de atividade antimicrobiana.

O teor de óleo essencial de cada amostra foi determinado pela relação entre o volume de óleo obtido e a biomassa vegetal livre de umidade, conforme a Equação 01.

**Equação 01** - Cálculo do rendimento de óleos essenciais.

$$TO = \frac{Vo}{Bm - \left( \frac{Bm \times U}{100} \right)} \times 100$$

Onde:

TO = Teor de óleo essencial (%)

Vo = Volume de óleo extraído (mL), lido diretamente na escala do tubo separador.

Bm = Biomassa vegetal (g)

U = Teor de umidade presente na biomassa vegetal (%)

Para a obtenção do teor de umidade residual presente nas folhas, aproximadamente 1 g do material vegetal foi pesado e submetido a um Determinador de Umidade Série ID Versão 1.8 Marte® (Figura 06).

**Figura 06** - Determinador de Umidade Série ID Versão 1.8 Marte®



## 4.2 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

A identificação dos componentes e determinação dos Índices de Kovats dos componentes do óleo essencial foi realizada empregando-se um Cromatógrafo a gás Shimadzu CG-2010 (Figura 07) acoplado a Espectrômetro de Massas CG/MS-QP

2010 Shimadzu , com injetor automático, equipado com coluna RtX-5ms (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0.25  $\mu\text{m}$ ), com temperatura do forno: 60°C a 240°C (3°C/min), 240°C (20min); temperatura do injetor 220°C; gás de arraste hélio (1mL/min); relação de split de 1:10, temperatura da interface: 240°C; temperatura da fonte de ionização: 240°C; energia de ionização 70 eV; corrente de ionização: 0,7kV.

**Figura 07** - Cromatógrafo a gás Shimadzu CG-2010



Para a quantificação dos componentes, pelo método da normalização, empregou-se um Cromatógrafo a gás Shimadzu CG-2010 com detector de ionização de chama, com coluna capilar RtX-5 (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,25  $\mu\text{m}$ ), com temperatura do forno: 60°C a 240°C (3°C/min), 240°C (20min); temperatura do injetor 220°C; gás de arraste hélio (1mL/min); relação de split de 1:10 e temperatura do detector 240°C. Cada pico do cromatograma foi identificado pelo seu espectro de massas, por comparação com a biblioteca do equipamento (Wiley Nist 08), através de fontes da literatura (ADAMS, 2007) e injeções de padrões autênticos. A determinação dos Índices de Kovats foi realizada por co-injeção com padrões de alcanos ( $\text{C}_8$  a  $\text{C}_{24}$ ), conforme equação 02.

**Equação 02** - Determinação dos Índices de Kovats

$$IK = 100 N + 100 \cdot \frac{(\log t'_{R(A)} - \log t'_{R(N)})}{(\log t'_{R(N+1)} - \log t'_{R(N)})}$$

Onde:

IK = Índice de Kovats

N = Número de átomos de carbono do padrão do alcano (C<sub>8</sub> a C<sub>24</sub>)

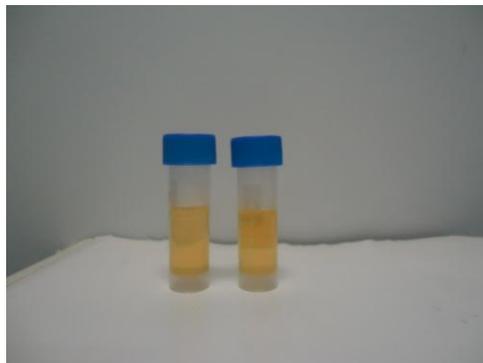
t'R(A) = tempo de retenção do pico calculado

t'R(N) = tempo de retenção do alcano correspondente ao pico calculado

t'R(N + 1) = tempo de retenção do alcano que elui posteriormente ao pico calculado.

As extrações foram realizadas em triplicata e as amostras obtidas foram reunidas num pool e fracionadas em dois eppendorff cada um contendo 3,5 mL (Figura 08) e mantidas em temperatura de -10 °C.

**Figura 08** - Amostras do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth



### 4.3 MICRO-ORGANISMOS

As amostras de *Haemophilus parasuis* utilizadas foram cedidas pelo laboratório Microvet Microbiologia Veterinária Especial, especializado em diagnóstico de doenças de suínos e produção de vacinas autógenas, localizado no município de Viçosa, em Minas Gerais. As cepas utilizadas são originárias do isolamento e identificação em órgãos enviados ao laboratório para o diagnóstico do patógeno causador da doença de Glasser.

As amostras estavam mantidas liofilizadas (Figura 09) e armazenadas em bacteriotecas (Figura 10) com temperatura controlada de 2 a 8 °C.

**Figura 09** - Ampola da amostra  
Liofilizada de *Haemophilus parasuis*



**Figura 10** - Bacterioteca



Foi realizado um levantamento das amostras catalogadas no período de 08/02/2012 a 19/11/2012, compreendendo 813 linhagens coletadas de materiais enviados de diversas regiões do Brasil e que possuíam isolamento positivo para *Haemophilus parasuis*, adotando-se como critério de classificação a sorotipagem. Após a classificação, conforme sorotipos, foi escolhida aleatoriamente uma amostra de cada sorotipo, que estão listadas na tabela 04. Nesta mesma tabela consta o órgão de onde foi isolado o micro-organismo, a idade do animal enviado para o diagnóstico, a cidade e estado onde a granja de suínos está localizada.

**Tabela 04** - Amostras de *Haemophilus parasuis* selecionadas

<b>Código da Amostra</b>	<b>Sorotipo</b>	<b>Órgão</b>	<b>Idade (dias)</b>	<b>Cidade/Estado</b>
<b>MV 12340</b>	1	Coração	56	Santa Rosa/RS
<b>MV 12149</b>	2	Pulmão	80	Campos Novos/SC
<b>MV 12285</b>	4	Pulmão	40	Pereiras/SP
<b>MV 12343</b>	5	Pulmão	20	Grão Pará/SC
<b>MV 11986</b>	9	Pulmão	45	Cristalina/Go
<b>MV 12315</b>	10	Pulmão	65	Erechim/RS
<b>MV 12196</b>	12	Coração	75	Campo Verde/MT
<b>MV 12146</b>	13	Pulmão	38	Santa Juliana/MG
<b>MV 12331</b>	14	Pulmão	46	Rio do Oeste/SC
<b>MV 12335</b>	NS*	Pulmão	0	Formiga/MG

\*NS = Não sorotipável

Conforme a literatura, amostras diferentes de um mesmo micro-organismo podem apresentar resultados diferentes quanto à sensibilidade aos antibióticos. Assim, na tabela 05 estão relacionadas estes dados das amostras desafiadas neste ensaio, conforme os laudos de exames cedidos pela Microvet Microbiologia Veterinária Especial.

**Tabela 05** - Resultado do Antibiograma das amostras de *H. parasuis* testadas

Código da Amostra	Amoxilina	Ampicilina	Cefalexina	Ciproflaxacina	Enrofloxacina	Flortenicol	Josamicina	Norfloxacina	Penicilina	Tetraciclina	Tiamulina	Tilmicosina
MV 12340	S	S	S	P/S	R	S	S	S	P/S	R	S	S
MV 12149	S	S	S	S	S	S	*	S	S	S	*	S
MV 12285	S	S	P/S	R	R	R	R	R	R	R	*	*
MV 12343	S	S	*	S	S	S	P/S	S	S	S	S	S
MV 11986	S	S	*	S	P/S	S	*	S	P/S	S	*	S
MV 12315	S	S	S	P/S	R	S	R	S	P/S	R	S	S
MV 12196	S	S	S	S	P/S	S	*	S	S	R	*	S
MV 12146	S	S	P/S	R	P/S	S	*	R	S	P/S	*	S
MV 12331	S	S	*	R	R	S	R	R	S	S	S	S
MV 12335	S	S	*	S	S	S	S	S	S	S	S	S

\* Teste não foi realizado para este antibiótico

R- Resistente S- Sensível P/S- Parcialmente sensível

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

##### 4.4.1 Preparo dos meios de cultura

O CLSI (2003) recomenda para os testes de CIM das espécies *Haemophilus* utilizar o Meio *Haemophilus* de Teste (HTM) para diluição em caldo, não sendo indicado nenhum meio sólido para a realização do CBM. O HTM é obtido através da formulação do Caldo Mueller-Hinton acrescido de NAD, hematina bovina, extrato de levedura e timidina fosforilase. No entanto o meio BHI permite o crescimento em caldo e quando suplementado com extrato de levedura permite o crescimento das colônias em meio sólido, possibilitando a realização do CBM.

O meio Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid®) foi preparado conforme orientação do fabricante de 37 g para 1000 mL de água purificada. Foi também preparado na

proporção de 74 g para 1000 mL considerado aqui como dupla concentração para sua utilização na microdiluição necessária para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) Os meios foram preparados, fracionados e esterilizados por autoclavação por 121 °C por 20 minutos.

Para o repique inicial e determinação da concentração bactericida mínima foi utilizado o meio BHI enriquecido com extrato de levedura. Para 1000 mL de meio foi preparado 900 mL de meio Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid®) conforme a orientação do fabricante e depois acrescentado 10g de extrato de levedura e 10g de ágar bacteriológico, autoclavou-se a 121 °C por 20 minutos e antes do seu completo resfriamento o meio foi vertido em placas.

#### **4.4.2 Preparo das soluções**

A solução salina necessária para diluir a massa da bactéria foi obtida numa concentração de 0,45% (m/v) e autoclavada a 121 °C por 20 minutos.

A solução de Tween 80 (Vetec ®) a 10% (m/v) esterilizada por 121 °C por 20 minutos.

A solução de enrofloxacin (Fatec ®) a 0,5 mg/mL foi preparada a partir do antibiótico em forma líquida estéril na concentração inicial de 5g/100mL, diluído 1 mL em 99 mL de água purificada estéril.

A resazurina (Inlab ®) utilizada como revelador apresentava-se na forma de pó e foi preparada uma solução 0,1 mg/mL, esta solução era manipulada 30 minutos antes da sua utilização e o volume restante descartado.

#### **4.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbico (CLSI, 2003) foi utilizada como fundamento para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), e as devidas adaptações foram realizadas de acordo com as características das amostras

*Haemophilus parasuis* empregados neste estudo, como a utilização do meio BHI em substituição do Meio *Haemophilus* de Teste, a suspensão bacteriana correspondente a escala 2 de MacFarland e utilização de jarra de anaerobiose.

Como as amostras encontravam-se liofilizadas foi necessária a sua re-hidratação. Quebrou-se a ampola de vidro e com auxílio de uma seringa descartável introduziu-se 1 mL de água purificada estéril na ampola, homogeneizou-se e retirou seu conteúdo, que foi depositado num tubo de ensaio. Utilizou-se uma alça de platina para realizar estrias no meio de ágar BHI. Incubou-se em estufa bacteriológica (Figura 11) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 24 horas em jarra de anaerobiose (Figura 12).

**Figura 11 - Estufa Bacteriológica**



**Figura 12 - Jarra de Anaerobiose**

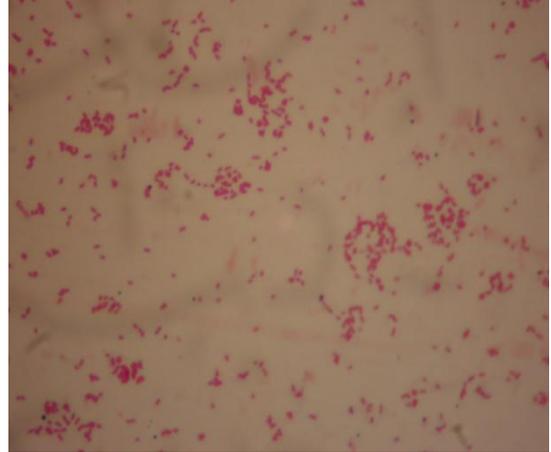


Após a incubação, as placas foram avaliadas visualmente quanto as características das colônias no meio BHI (Figura 13) e foi realizado coloração de Gram para averiguar-se a pureza dos inóculos através de microscopia (Figura 14).

**Figura 13** - Repique do *Haemophilus parasuis*

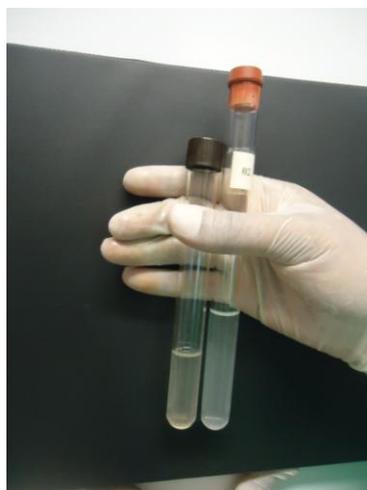


**Figura 14** - Microscopia da colônia do *Haemophilus parasuis*



Confirmado pela microscópica que não havia contaminação nos repiques, realizou-se a raspagem da massa bacteriana com auxílio de alça de platina, o material foi recolhido em tubo de ensaio e adicionada solução salina até obter uma turvação (Figura 15) correspondente a 2 da escala nefelométrica de MacFarland (Tabela 06), isto indica que havia aproximadamente  $6 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. A escala nefelométrica de MacFarland é um padrão de turvação mais frequentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia para determinar a multiplicação de micro-organismos em meios líquidos que se determina pelo grau de opacidade do meio.

**Figura 15** - Obtenção da suspensão bacteriana correspondente a 2 da escala nefelométrica de MacFarland



**Tabela 06 - Escala MacFarland**

NºTubo	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bactérias (x 10 <sup>8</sup> ) *	1,5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

\* Número aproximado de bactérias

Após conferência na escala de MacFarland, as suspensões bacterianas foram ajustadas com solução salina para a faixa de 0,500 a 0,600 de densidade ótica com leitura no espectrofotômetro com 600 nm de comprimento de onda (Figura 16).

**Figura 16 - Espectrofotômetro**

Decorrida a etapa de preparo da suspensão bacteriana, a amostra do óleo de *Lippia origanoides* foi manipulada para a concentração de 10%, diluindo 0,5 mL em 45 mL de uma solução de Tween 80 a 10% e homogeneizando com auxílio de Vortex (Figura 17).

**Figura 17 - Homogeneização da amostra no Vortex**

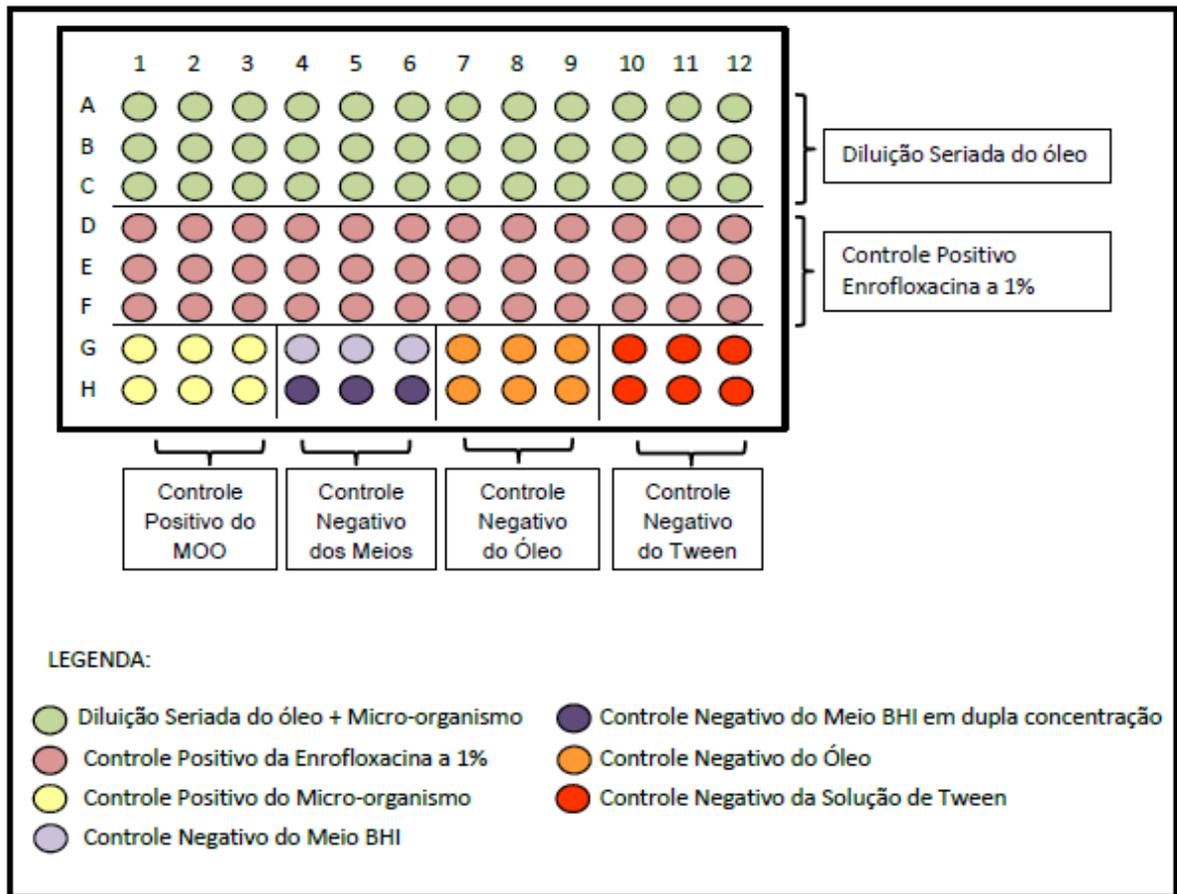
Um teste preliminar com uma das amostras do micro-organismo foi montado para definir a concentração da solução inicial do óleo que seria utilizada (1%, 5%, 10% e 30%). Como não houve diferença nos resultados de CIM quando soluções iniciais de óleo com concentrações 5% e 10% foram utilizadas, a concentração inicial de óleo a 10% foi a selecionada para os ensaios posteriores.

A opção desta concentração foi através de resultados de testes preliminares realizados com o óleo a 1%, 5%, 10% e 30% para definir a concentração adequada para o ensaio. Após o preparo da solução do óleo na concentração desejada, a amostra foi filtrada em membrana 0,22  $\mu\text{m}$  (Figura 18).

**Figura 18** - Filtração da amostra diluída



A montagem do ensaio foi realizada em triplicata, em microplaca estéril de 96 poços com fundo chato, distribuiu 90  $\mu\text{L}$  de meio BHI em dupla concentração na coluna 1 (linhas A a F). Nos poços das demais colunas (2 a 12) colocou-se 90  $\mu\text{L}$  de meio BHI nas linhas da A a F (Figura 19).



**Figura 19** - Representação da microdiluição em placa

Fez-se a diluição seriada adicionando-se 90  $\mu$ L do óleo a 10% nos três primeiros poços da placa (1A-1C) e homogeneizou-se, procedendo à diluição seriada com a retirada de 90  $\mu$ L do 1º poço e transferindo para o 2º, homogeneizando após a transferência. Esse procedimento foi repetido até o último poço, de onde retirou-se 90  $\mu$ L para descarte. O controle positivo foi realizado nas linha D,E e F com enrofloxacina, e procedeu-se a distribuição na placa da mesma maneira que foi utilizada para o óleo testado. Após a distribuição do óleo e antibiótico na placa, adicionou-se 10  $\mu$ L de suspensão de micro-organismo nos poços de todas as linhas de A a F, homogeneizando-se após cada adição.

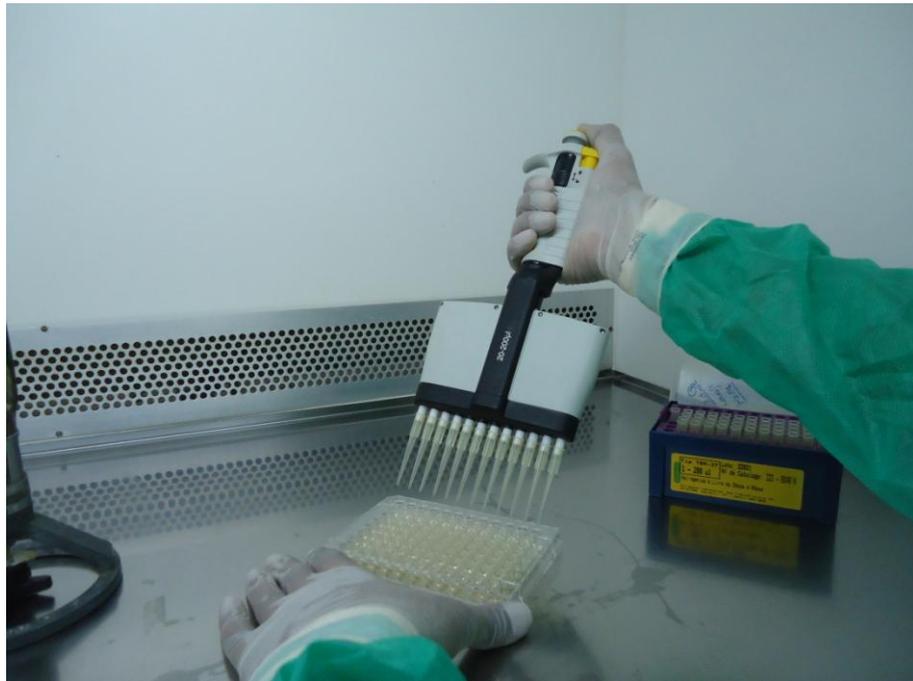
Para finalizar foram realizados nas linhas G e H o controle positivo do microorganismo e os controles negativos dos meios, óleo essencial e solução de tween. Para o controle do micro-organismo nas linhas G1 a G3 e H1 a H3 foram distribuídos 90  $\mu$ L de meio BHI e acrescentado 10 $\mu$ L da suspensão do micro-

organismo e homogeneizando-se. Este controle tem como objetivo verificar a viabilidade bacteriana, e os demais para comprovar a esterilidade dos meios, óleo e solução de tween.

No controle do meio concentrado nas linhas G4 a G6 foram distribuídos 100  $\mu\text{L}$  de meio BHI em cada poço e nas linhas H4 a H6 foram distribuídos 100 $\mu\text{L}$  de meio BHI em dupla concentração em cada poço. Para o controle do óleo nas linhas G7 a G9 e H7 a H9 foram distribuídos 50 $\mu\text{L}$  de meio BHI concentrado, acrescentado 50 $\mu\text{L}$  do óleo e homogeneizado. O controle da solução de tween foi realizado nas linhas G10 a G12 e H10 a H12, onde foram distribuídos 50  $\mu\text{L}$  de meio BHI concentrado, acrescentado 50  $\mu\text{L}$  da solução de tween e homogeneizado.

Todo o procedimento descrito foi repetido com as 10 amostras de *Haemophilus parasuis* escolhidas para o ensaio (Figura 20) e ao final da manipulação as placas foram incubadas por 24 h a 37°C em estufa bacteriológica.

**Figura 20:** Preparação da placa de microdiluição



Também foram preparadas placas de microdiluição para testar o efeito inibitório da solução de tween a 10% e observar a interferência desta solução no óleo estudado.

Decorrido o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e acrescentado em cada poço 30  $\mu$ L do revelador resazurina, que possui coloração azulada e é oxidado na presença de células viáveis modificando a coloração do meio para uma cor que pode variar de rosa a vermelho. As placas retornaram para a estufa e aguardaram 03 horas para realizar a leitura do teste.

Para a leitura visual deste teste utilizou-se o seguinte critério: poços com coloração rósea indicam crescimento bacteriano e poços com coloração azulada ausência de crescimento bacteriano, desta forma, foi possível determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

#### 4.4.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Realizou-se a Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial frente a todas as amostra de *Haemophilus parasuis* deste ensaio. Demarcou-se previamente placas com meio ágar BHI em quadrante e fez-se uma subcultura retirando uma alíquota dos poços das linhas A a C (Colunas 1 a 12) e inoculando na placa (Figura 21).

**Figura 21** - Inoculação das placas para o CBM



As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em jarra de anaerobiose e após este período a leitura visual foi realizada. Como critério de avaliação foi considerado que a CBM foi determinada pela menor concentração em que apresentou a inibição de crescimento.

Os quadrantes inoculados com o conteúdo dos poços em que foi verificado o efeito antibacteriano do óleo em meio líquido e apresentaram crescimento bacteriano indicam que houve atividade bacteriostática, enquanto o não crescimento indica atividade bactericida.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ÓLEO ESSENCIAL

O rendimento de óleo foi de  $4,61\% \pm 0,47$  (relação V/m), em biomassa seca, e está em conformidade com dados da literatura, com descrição de teores de 0,7 a 4,6%. Para plantas do Pará o teor de óleo foi de 1% (OLIVEIRA et al., 2007), no Piauí apresentou teor de 4,6% (CAVALCANTE et al., 2009) e na Colômbia, variou de 1,0% a 4,4% (ESCOBAR et al., 2010). A produção de óleo essencial depende de vários fatores, como condições ambientais, hora e período de colheita, formas de cultivo, método de extração, entre outras (SIMÕES, 2007), explicando esta variabilidade encontrada nos teores de óleo. Silva et al. (2009) descrevem que o teor de óleo desta espécie foi de 1,5%, 0,7% e 1,3%, em coletas realizadas ao longo do dia, confirmando a influência circadiana na produção deste óleo.

Pela análise da composição química do óleo essencial foram identificados 21 constituintes, pertencentes a classe dos terpenos, conforme apresentado na tabela 07. Os monoterpenos são preponderantes com 84,32%, em comparação aos sesquiterpenos que estão presentes em uma proporção de 15,83%. O monoterpeno carvacrol é o constituinte majoritário (40,24%), seguido pelo  $\gamma$ -terpineno (11,46%), linalol (9,17%) e p-cimeno (8,47%) e dentre os sesquiterpenos se destacam o biciclogermacreno (7,18%) e o E-cariofileno (5,37%).

**Tabela 07** - Composição química do óleo essencial de folhas de *Lippia origanoides* Kunth

Composto	IK <sub>lit</sub>	IK <sub>calc</sub>	% ± DP
<b>MONOTERPENOS</b>			
α-tujeno	930	930	0,84±0,26
α-pineno	939	938	0,45±0,00
canfeno	954	954	0,76±0,42
mirceno	990	992	1,80±0,38
α-terpineno	1020	1019	1,49±0,37
p-cimeno	1026	1028	8,47±1,41
limoneno	1029	1032	0,93±0,06
γ-terpineno	1064	1063	11,46±1,95
linalol	1196	1100	9,17±0,95
cânfora	1146	1148	2,22±0,18
borneol	1169	1169	0,86±0,09
terpinen-4-ol	1177	1180	0,38±0,04
metil timol	1235	1238	2,83±0,06
timol	1290	1296	2,42±0,28
carvacrol	1299	1311	40,24±4,81
acetato de carvacrol	1372	1376	0,43±0,22
<b>SESQUITERPENOS</b>			
E-cariofileno	1419	1423	5,37±1,04
aromadendreno	1441	1442	0,63±0,12
α-humuleno	1454	1457	1,53±0,29
biciclogermacreno	1500	1500	7,18±1,52
espatulenol	1578	1581	1,12±0,09

Vega-Vela et al. (2013) salientam que os níveis de diversidade genética em *L. origanoides* são elevados e que, embora para os óleos desta espécie os monoterpenos sejam preponderantes, o composto majoritário pode variar gerando quimiotipos. Para populações de diferentes regiões da Colômbia sete quimiotipos foram encontrados por Vega-Vela et al. (2013), sendo o quimiotipo B rico em carvacrol (acima de 40%), seguido por p-cimeno (7,0-11,8%), α-terpineno (6,3-16,6%) e timol (6,8-8,6%). O quimiotipo B já havia sido anteriormente descrito por Stashenko et al. (2010), para espécies também da Colômbia, contendo cerca de 40% de carvacrol, 13% de p-cimeno, 11% de α-terpineno e 11% de timol, além do quimiotipo A (α- e β-felandrenos, p-cimeno, limoneno) e C (timol, p-cimeno, α-terpineno).

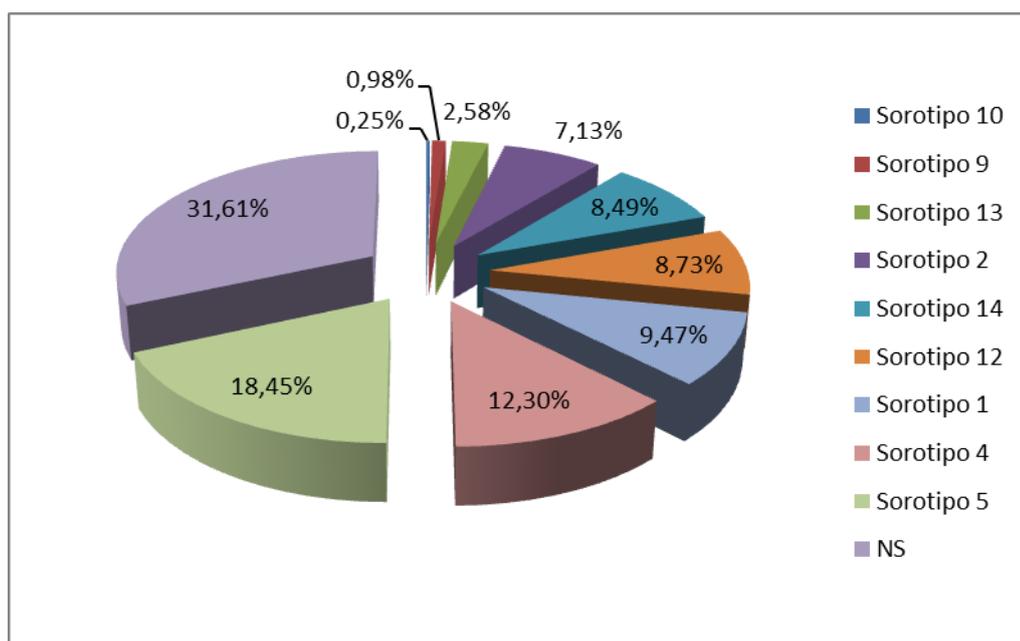
Considerando a concentração de carvacrol na amostra trabalhada neste estudo, podemos sugerir que os espécimes de *L. organoides*, oriundos do estado da Bahia, e utilizados na extração de óleo essencial pertencem ao quimiotipo B. Os teores mais baixos de timol (2,23%) encontrados, em comparação aos relatados na literatura (6,8-11%) para este quimiotipo, podem ser resultado de fatores edafoclimáticos, que devem ser futuramente investigados.

## 5.2 TRIAGEM DE MICRO-ORGANISMOS

Das 813 amostras disponíveis para o período 31,61% não são sorotipáveis, e para as demais foram identificados 9 sorotipos, dos quais 30% pertencem ao sorotipo 4 e 18,45% aos sorotipos 5 e 12, ilustrado na figura 22.

A prevalência do sorotipo 4 em suínos brasileiros também foi observada por Macedo et al. (2011), que avaliou 63 amostras de *H. parasuis* isoladas de suínos brasileiros, por métodos de genotipagem, com detecção de 8 sorovares, dos quais o 4 foi o mais frequente (15,9%), sendo que 60,3% não foram sorotipáveis.

**Figura 22** - Percentual de amostras por sorotipo



Castilla et al. (2012) caracterizou cepas de campo de *H. parasuis* de diferentes estados do Brasil, empregando métodos de sorotipagem e genotipagem. O sorotipo 4 foi predominante (26,1%), seguido de sorovares 5 (17,4%), 14 (8,7%), 13 (4,4%) e 2 (4,4%), ao passo que 39% das estirpes foram considerados como não-tipável. Esse sorotipo também é o mais frequente em outros países, Luppi et al. (2012) avaliou 106 cepas de *H. parasuis* isoladas de suínos na Itália, por sorotipagem em difusão em ágar, concluindo que o sorotipo 4 foi prevalente (24,5%), seguido pelo 13 (19,8%) e 5 (11,3%), com 27,3% não sorotipável. Poucas variações tem sido observadas entre os países (ANGEN et al, 2004), sendo os sorovares 4, 5 e 13 os mais frequentes, seguidos pelos 2, 12 e 14, conforme levantamentos realizados na Alemanha, Austrália, Canadá, China Dinamarca, Espanha, Estados Unidos, além do Brasil e Itália (LUPPI et al., 2012).

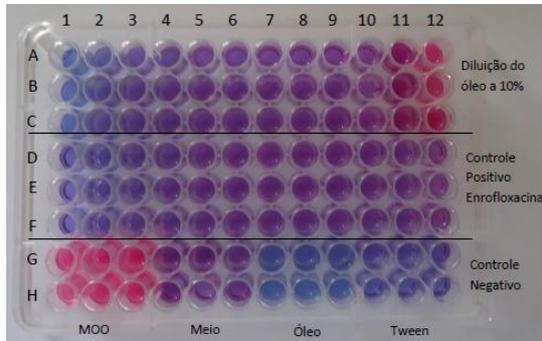
Considerando o grande número de amostras disponíveis foram selecionadas aleatoriamente 10 cepas (09 com sorotipos distintos e uma não sorotipável) para os ensaios de atividade antimicrobiana. É importante destacar que destes sorotipos selecionados, seis podem levar a morte em 96 horas (sorotipos 1, 5, 10, 12, 13 e 14), dois provocam lesões características de polisserosite (sorotipos 2 e 4) e apenas um (sorotipo 9) é considerado não virulento ou pouco patogênico (MACEDO et al., 2009; LUPPI et al., 2012).

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

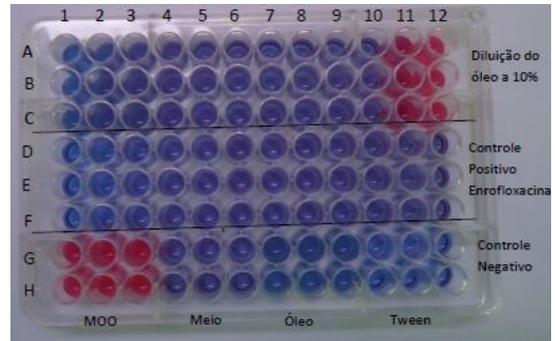
O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do micro-organismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada (OSTROSKY et al., 2008).

Pela avaliação da atividade antimicrobiana o óleo essencial de *Lippia origanoides* demonstrou inibição frente a todas as amostras testadas, conforme ilustrados nas figuras 23 a 32. Nestas mesmas placas também foi realizado o controle positivo com a enrofloxacina e os controles negativos. Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 08.

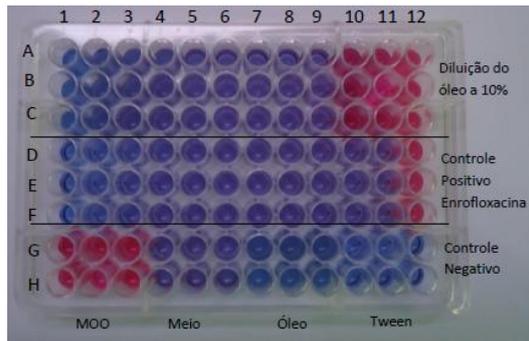
**Figura 23 - Placa CIM da Amostra MV 12340 (Sorotipo 1)**



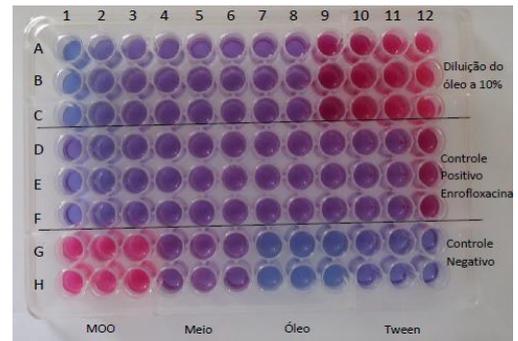
**Figura 24 - Placa CIM da Amostra MV 12149 (Sorotipo 2)**



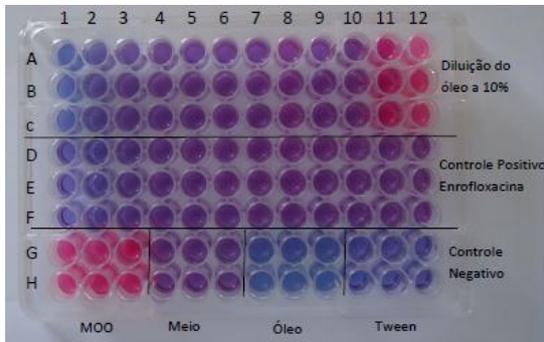
**Figura 25 - Placa CIM da Amostra MV 12285 (Sorotipo 4)**



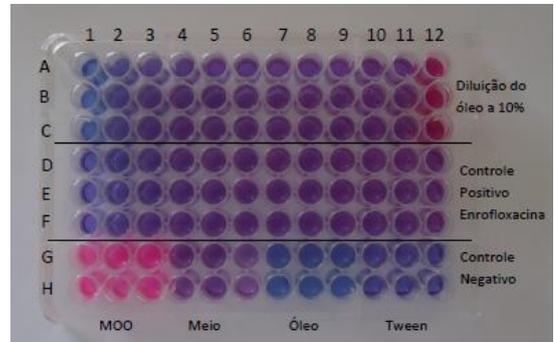
**Figura 26 - Placa CIM da Amostra MV 12343 (Sorotipo 5)**



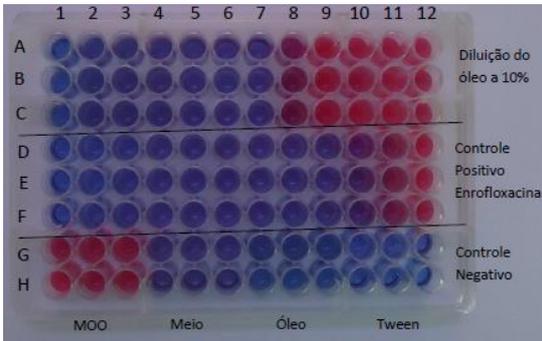
**Figura 27 - Placa CIM da Amostra MV 11986 (Sorotipo 9)**



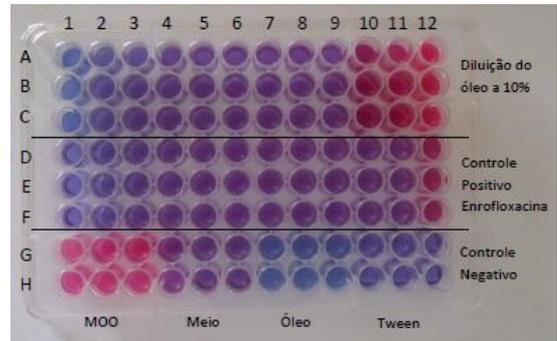
**Figura 28 - Placa CIM da Amostra MV 12315 (Sorotipo 10)**



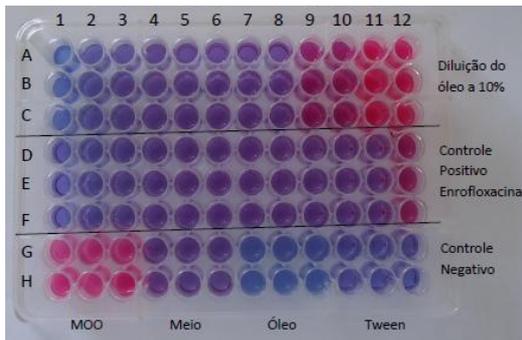
**Figura 29** - Placa CIM da Amostra MV 12196  
(Sorotipo 12)



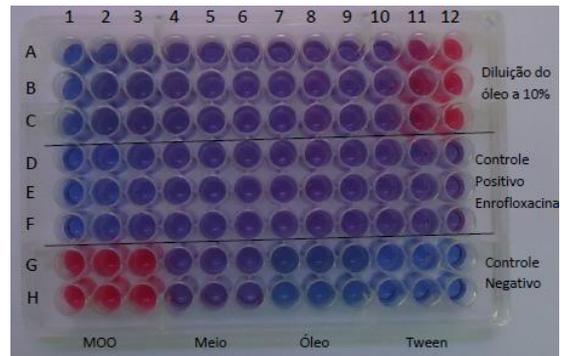
**Figura 30** - Placa CIM da Amostra MV 12146  
(Sorotipo 13)



**Figura 31** - Placa CIM da Amostra MV 12331  
(Sorotipo 14)



**Figura 32** - Placa CIM da Amostra MV 12335  
(Não Sorotipável)



Os dados de atividade antimicrobiana deste óleo frente a diferentes sorotipos de amostras de campo do *H. parasuis* estão relacionados na tabela 08, com valores de CIM e CBM.

**Tabela 08** - Valores em (mg/mL) da CIM para o controle positivo Enrofloxacina e em (%) da CIM e da CBM

<b>Código da Amostra</b>	<b>Sorotipo</b>	<b>Controle CIM</b>	<b>CIM</b>	<b>CBM</b>
MV 12340	1	0,005	0,010	0,010
MV 12149	2	0,005	0,010	0,010
MV 12285	4	0,005	0,020	0,020
MV 12343	5	0,005	0,039	0,039
MV 11986	9	0,005	0,010	0,010
MV 12315	10	0,005	0,005	0,005
MV 12196	12	0,010	0,078	0,078
MV 12146	13	0,005	0,020	0,020
MV 12331	14	0,005	0,039	0,039
MV 12335	NS*	0,005	0,010	0,010

\*NS = Não sorotipável

Nos testes de atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo, os melhores resultados referem-se aos menores valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, quanto menor o valor da CIM, maior é a atividade antimicrobiana do óleo. O melhor resultado encontrado foi de 0,005% para a amostra MV 12315 do Sorotipo 10 enquanto o menos satisfatório foi de 0,078% para a amostra MV 12196 do sorotipo 12.

Paralelamente aos testes de suscetibilidade dos microrganismos às amostras de óleo essencial, foi realizado um ensaio com a solução de tween a 10% utilizada para obter a diluição do óleo. O Tween foi testado frente as 10 amostras do *H. parasuis*, e não apresentou atividade inibitória para nenhuma amostra desafiada, conforme ilustra as figuras de 33 a 36.

Figura 33 - Placa CIM da Solução de Tween (1)

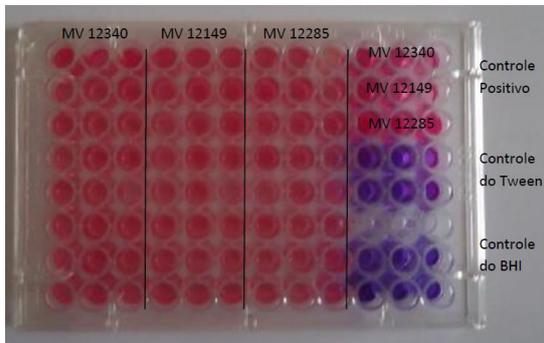


Figura 34 - Placa CIM da Solução de Tween (2)

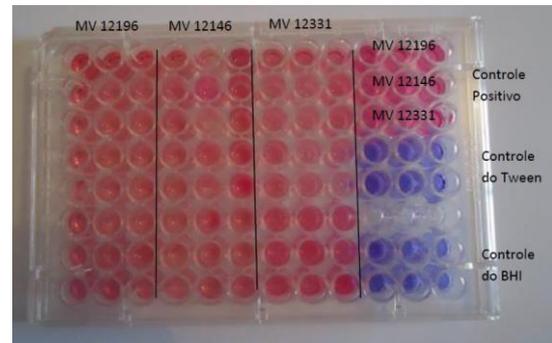


Figura 35 - Placa CIM da Solução de Tween (3)

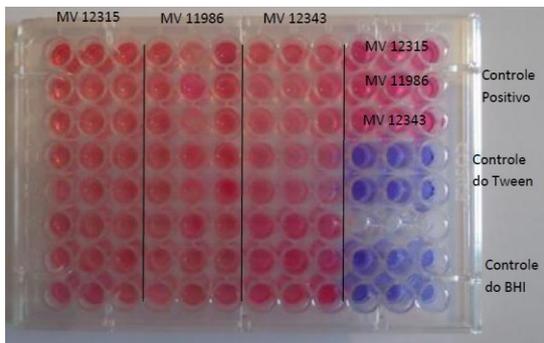
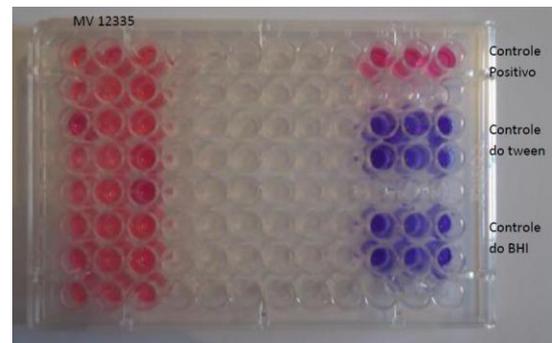


Figura 36 - Placa CIM da Solução de Tween (4)



O óleo exibiu ação bactericida em todas cepas de micro-organismos testados, nos mesmos valores verificados para a CIM, que variaram de 0,005% a 0,079%, conforme ilustrado pelas Figuras 37 e 38. Cabe destacar os resultados obtidos frente as cepas de sorotipos 1, 5, 10, 12, 13 e 14 que são consideradas altamente patogênicas, levando a morte do suíno em 96 horas, e nestes casos a ação bactericida do óleo essencial frente a estas cepas variou entre 0,01 a 0,078%.



bactérias, sendo efetivo contra 42 (KOTAN et al., 2007), o que sugere sua contribuição na ação frente a *H parasuis*. Outros constituintes presentes no óleo, como p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno foram individualmente testados frente a fungos e bactérias, mas não apresentaram ação antimicrobiana (DORMAN; DEANS, 2000). Como o óleo se trata de uma mistura de componentes a ação sinérgica dos constituintes não pode ser descartada. Carvacrol, por exemplo, inibe o crescimento de *Salmonella typhimurium* com CIM de 0,4 mg/mL, mas a mistura de carvacrol + timol foi mais efetiva, inibindo o crescimento com CIM de 0,1 mg/mL (MICHIELS et al., 2009).

Embora este seja o primeiro relato de ação antimicrobiana do óleo de *L. origanoides* frente a este micro-organismo patogênico para animais de corte, este material já foi desafiado para bactérias com origem de coleções de culturas. Betancourt et al. (2012) testaram o óleo essencial de *L. origanoides* em diversas amostras da American Type Culture Collection (ATCC), como *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium breve*, com valores de CIM entre 0,098 mg/mL (*S. enteritidis*) e 50 mg/mL (*B. breve*), entretanto o quimiotipo avaliado era rico em timol. Oliveira et al. (2007) determinaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de um quimiotipo rico em carvacrol e timol, mas pelo método de difusão em ágar, frente a fungos e bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. A atividade antimicrobiana de extratos de folhas e caules de espécies deste quimiotipo rico em carvacrol também foram investigadas por Pinto et al. (2013), que ao comparar três espécies de *Lippia* concluiu que o extrato obtido das folhas de *L. origanoides* foi o mais ativo.

Variações na determinação da ação antimicrobiana e do material aplicado, como técnica empregada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, se as amostras foram preparados a partir de plantas frescas ou secas, entre outras, podem interferir no resultado da atividade biológica (FENNEL et al., 2004 *apud* OSTROSKY 2008; SIMÕES, 2007). Embora estes dados de literatura não possam ser diretamente correlacionados com os resultados aqui obtidos, todos apontam para o potencial desta espécie como agente antimicrobiano para uso veterinário e/ou humano, indicando a importância de estudos futuros que envolvam o desenvolvimento de formulações para testes em animais.

## 6. CONCLUSÃO

A composição química do óleo essencial obtido é condizente com os achados descritos na literatura para extrações realizadas das folhas de *L. origanoides*, indicando se tratar do quimiotipo B.

O levantamento realizado com 813 cepas de *H. parasuis* isolados de suínos no Brasil infectados com a doença de Glässer indicou que o sorotipo 4 foi predominante, levando a seleção de dez linhagens (9 sorotipos diferentes e um não sorotipável) para os testes de atividade antimicrobiana.

O óleo essencial de *L. origanoides* foi capaz de impedir o crescimento bacteriano em todos os sorotipos testados com valores de CIM entre 0,005 a 0,078%, sendo que frente ao sorotipo 10 houve a maior ação inibitória.

Os dados obtidos corroboram com o potencial antimicrobiano do óleo essencial frente a *H. parasuis*, contudo é necessário ampliar os ensaios com um maior número de amostras por sorotipo, desenvolvimento de formulações e testes em animais.

## REFERÊNCIAS

ABIPECS/ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTAÇÃO DE CARNE SUÍNA. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mundial/exportacao.html>>. Acesso em: 16 de Fevereiro de 2014.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois-USA, 2007. 804p.

ALMEIDA, Fabiana; SPIGOLON, Zenilda; SILVA, Tiago Pereira; PEREIRA, Rose Elisabeth Peres; PRESUMIDO, Marcio. Haemophilus Parasuis em Suínos. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, Garça, n. 11, jul. 2008.

ALTE, M. A.; THOMÉ, S.; ABREU, B. R. R.; LEHMANN, M.; DIHL, R.R. Avaliação da atividade tóxico-genética da enrofloxacina. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n. 10/2012, 2012.

ANGEN, O.; SVENSMARK, B.; MITTAL, K. Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates **Veterinary Microbiology**, v. 103, p 255-258, nov. 2004.

BETANCOURT, L; PHANDANAUVONG, V.; PATIÑO, R.; ARIZA-NIETO, C.; AFANADOR-TELLEZ, G. Composition and Bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* genus. **Open Journal Systems**. 2012.

BIBERSTEIN, E.L.; WHITE, D.C.. A Proposal for the Establishment of two New *Haemophilus* Species. **Journal Med. Microbiol.**, v. 2, p. 75-78, 1969.

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

CASTILLA, K. S.; GOBBI, D. D. S.; MORENO, L. Z.; PAIXÃO, R.; COUTINHO, T. A.; SANTOS, J. L.; MORENO, A. M. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from Brazilian swine through serotyping, AFLP and PFGE. **Research in Veterinary Science** 92, p. 366-371, 2012.

CAVALCANTE, I.M.S.M. et al. Potencial Mutagênico (Teste de micronúcleos) e composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Lippia organoides*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 32., 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Adaltech Soluções para eventos, 2009.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; **Approved standard- six edition. CLSI document M7-A6** (ISBN 1-56238-486-4, CLSI, 940 West Valley Road, suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA), 2003.

COSTA-HURTADO, Maria; ARAGON, Virginia. Advances in the quest for virulence factors of *Haemophilus parasuis*. **The Veterinary Journal** **186**, Barcelona, p. 571-576, ago. 2013.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**. V 88, p 308–316, Fev 2000.

ESCOBAR, Patricia; LEAL, Sandra Milena; HERRERA, Laura Viviana; MARTINEZ, Jairo Rene; STASHENKO, Elena. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

FAO/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food**. Roma, 2009. Capítulo 8 : Maximum residue limits for pesticides and veterinary drugs. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44065/1/WHO\\_EHC\\_240\\_11\\_eng\\_Chapter\\_8.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44065/1/WHO_EHC_240_11_eng_Chapter_8.pdf) 32>. Acesso em: 27 de Novembro de 2012.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GRANJA, Rodrigo. Drogas Veterinárias e Antibióticos. Um panorama geral em carnes. In: Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição, 5., 2004, Balneário Camboriú. **Anais...** Balneário Camboriú, 2004.

IBGE/INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Estatística de Produção Pecuária. **Indicadores IBGE**, jun. 2013. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201301\\_publicacao\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201301_publicacao_completa.pdf) > Acesso em: 16 de fevereiro de 2014.

KAMEL, C. A novel look at a classic approach extracts. Feed Mix – **The International Journal on Feed, Nutrition and Technology**, Doetinchem, v.18, n.6, p. 19-24, 2000.

KIELSTEIN, Peter; RAPP-GABRIELSON, Vicki J.. Designation of 15 Serovars of *Haemophilus parasuis* on the Basis of Immunodiffusion Using Heat-Stable Antigen Extracts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 862-865, abr. 1992.

KOTAN, Recep; KORDALIC, Saban; CAKIR, Ahmet. Screening of Antibacterial Activities of Twenty-One Oxygenated Monoterpenes **Z. Naturforsch.** v. 62, p. 507-513, 2007.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J. Appl. Microbiol.**, v.91, p.453-462, 2001.

LARA, Anne Caroline. Interferência do Tratamento Preventivo com Antimicrobianos Sobre a Colonização de Agentes da Microbiota do trato Respiratório de Leitões, Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

LUPPI, A.; BONILAUDI, P.; DOTTORI, M.; IODICE, G.; GHEPELLI, Y., MERIALDI, G.; MARTELLI, P. *Haemophilus parasuis* Serovars Isolated from Pathological Samples in Northern Italy. **Source: PubMed**. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) - Brescia, Italy Department of Animal Health, University of Parma, Italy, 2012.

MACEDO, Núbia Resende; OLIVEIRA, Simone Rodrigues; LAGE, Andrey Pereira; GUEDES, Roberto Maurício Carvalho. Epidemiologia molecular de *Haemophilus parasuis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.8, p.2576-2582, nov. 2009.

MACEDO, Nubia Resende; OLIVEIRA, Simone Rodrigues; LAGE, Andrey Pereira; SANTOS, José Lúcio; ARAÚJO, Marina Rios; GUEDES, Roberto Maurício Carvalho. ERIC-PCR genotyping of *Haemophilus parasuis* isolates from Brazilian pigs. **The Veterinary Journal** 188, p. 362-364, 2011.

MAPA/MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 16 de Fevereiro de 2014.

MENIN, Álvaro; GAVA, Danielle; VAZ, Eliana Knackfuss. Aspectos gerais sobre a infecção por *haemophilus parasuis* em suínos – Revisão. **Revista de Ciência Agroveterinárias**, Lajes, v.4, n.2, p. 148-156, 2005.

MICHIELS, J.; MISSOTTEN, J.A.; FREMAUT, D.; SMET, S.; DIERICK, N.A. In vitro characterization of the antimicrobial activity of selected essential oil components and binary combinations against the pig gut flora. **Animal Feed Science Technology**, v. 151, p. 111-127, 2009.

MORAIS, A. A.; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; MAGALHÃES, M. T. Óleos essenciais da Amazônia contendo Timol. In: Simposio Internacional Sobre Plantas De Interes Economico de La Flora Amazonica, Belém, p.145-146, 1972.

NEDBALCOVA, K.; SATRAN, P.; JAGLIC, Z.; ONDRIASOVA, R.; KUCEROVA, Z. *Haemophilus parasuis* and Glässer's disease in pigs: a review. **Vet. Med.**, v. 51, n. 5, p.168-179, 2006.

OLIVEIRA, Danilo R.; LEITÃO, Gilda G.; BIZZO, Humberto R.; LOPES, Daíse; ALVIANO, Daniela S.; ALVIANO, Celuta S.; LEITÃO, Suzana G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry** 101, p. 236–240, 2007.

OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. Diagnóstico, epidemiologia e controle da infecção por *Haemophilus parasuis*. In: Congresso Latino Americano de Suinocultura, 2002. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2002.

OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. **Veterinary Microbiology** **99**, p. 1-12, 2004.

OMS/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAUDE, A crescente ameaça da resistência antimicrobiana 2012. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS\\_IER\\_PSP\\_2012.2\\_por.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf). Acesso em 16 de fevereiro de 2014.

OSTROSKY, Elissa A.; MIZUMOTO, Miriam K.; LIMA, Marcos E. L.; KANEKO, Telma M.; NISHIKAWA, Suzana O.; FREITAS, Beatriz R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 301-307, abr./jun. 2008.

OZAKI, Andréia Tiemi; DUARTE, Paula da Cunha. Fitoterápicos Utilizados na Medicina Veterinária, em Cães e Gatos. **Infarma**, São Paulo, v.18, n. 11/12, 2006.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D. SANCHEZ; VILLAR, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n 3, p. 201–214, 2001.

PERRY, M.B.; MACLEAN, L. L.; GOTTSCHALK, M.; ARAGON, V.; VINOGRADOV, E. Structure of the capsular polysaccharides and lipopolysaccharides from *Haemophilus parasuis* strains ER-6P (serovar 15) and Nagasaki (serovar 5). **Carbohydrate Research**, v 378, p.91-97, 2013.

PIERI, F.A.; SILVA, V.O.; SOUZA, C.F.; COSTA, J.C.M. ; SANTOS, L.F.; MOREIRA, M.A.S. Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.1, p.241-244, 2012.

PINTO, Cristiana da Purificação; RODRIGUES, Velize Dias; PINTO, Fernanda da Purificação; PINTO, Renata da Purificação; UETANABARO, Ana Paula Trovatti; PINHEIRO, Carla Santos Ribeiro; GADEA, Suzana Ferreira Magalhães; SILVA, Tânia Regina dos Santos; LUCCHESI, Angélica Maria. Antimicrobial Activity of *Lippia* Species from the Brazilian Semiarid Region Traditionally Used as Antiseptic and Anti-Infective Agents. **Hindawi Publishing Corporation**, 2013, 5 p.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. São Paulo: Artmed, 2005. 512p.

RAFIEE, M.; BLACKALL, P.J. Establishment, validation and use of the Kielstein–Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. **Aust. Vet. J.**, v.78, n.3, p. 172–174, 2000.

RIBEIRO, A.F.; MAIA, J.G.; ANDRADE, E.H.A.; REZENDE, A.; RIBEIRO, F.P.; LOPES, L. ; FIGUEIREDO, P.L.B. Avaliação Antifúngica Do Óleo Essencial De *Lippia organoides* Kunth Com Ocorrência Na Floresta Nacional De Carajás Frente Ao Fitopatógeno *Fusarium* sp. In: Congresso Brasileiro de Química, 53., 2013, Rio de Janeiro, 2013.

SANTOS, J.L.; LEITE, R.C.; ABREU, V.L.V. The frequency of *Haemophilus parasuis* serovars in Brazil. In: IPVS CONGRESS, 15, 1998, Birmingham. Proceedings..., p.278, 1998.

SANTOS, José Lúcio. Epidemiologia e Controle da Infecção por *Haemophilus parasuis*. 49f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

SILVA, M.M. et al. Variação de timol e carvacrol em *Lippia microphylla* Cham. ao longo do dia. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 32., Fortaleza, 2009. **Anais...** Disponível em: <sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T1075-1.pdf>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2014.

SILVA, J.M.B.; HOLLENBACH, C.B.. Artigo de Revisão: Fluoroquinolonas X Resistência Bacteriana na Medicina Veterinária. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.2, p.363-369, abr./jun. 2010.

SILVA, Taisa R.G.; NASCIMENTO, M.C.O. ; SILVA, N.C.. Uso de óleos essenciais na dieta de suínos em substituição aos antimicrobianos. **Acta Veterinária Brasilica**, Mossoró, v. 4, n. 2, p. 70-73, 2010.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p.467-496, 2007.

SMART, Nonie L.; MINIATS, O. P.; MACINNES, J. I. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.52, n.3, p. 319-324, 1988.

SOARES, Bruna Viana; DIAS, Marcos Tavares. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazonia**, Macapá, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SOUZA, 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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.6, p.429-433, 2000.

SOUZA, Maria Izabel Amaral. Resíduos de Antibióticos em Carne Bovina.. 34f. Seminário Apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J.R., RUIZ, C.A.; ARIAS, G.; DURAN, C.; SALGAR, W. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **J. Sep. Sci.** ;v. 33, p. 93–103, 2010.

SUZUKI, O. H.; FLEMMING, J. S.; SILVA, M. E. T. Uso de Oleos essenciais na alimentacao de leitões. **Revista Academica: Ciencias Agrarias e Ambientais**, Curitiba, v. 6, n. 4, p. 519-526, dez. 2008.

TRIGO, E.; MENDEZ-TRIGO, A.V.; SIMONSON, R. Antimicrobial susceptibility profiles of *Haemophilus parasuis*: a retrospective study from clinical cases submitted during 1994 and 1995 to a veterinary diagnostic laboratory. **Proc Int Congr Pig Vet Soc.**, v. 14, p. 313, 1996.

VEGA-VELA, Nelson Enrique; DELGADO-AVILA, Wilman Antonio; CHACON-SANCHEZ, María Isabel. Genetic structure and essential oil diversity of the aromatic shrub *Lippia organoides* Kunth (Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. **Agron. Colomb**, vol.31, n.1, p. 5-17, 2013.

VICUÑA, G. C.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia** **81**, p. 343-349, 2010.