

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA
VIDA INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ESTUDO SOBRE A AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE
MICROORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA

TAMIRIS SILVA LOPES

Caxias do Sul
2020

TAMIRIS SILVA LOPES

ESTUDO SOBRE A AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE
MICROORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Antunes Rizzo

Caxias do Sul
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

L864e Lopes, Tamiris Silva

Estudo sobre a ação de óleos essenciais no controle de microrganismos causadores de mastite bovina / Tamiris Silva Lopes. – 2020.

157 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.

Orientação: André Felipe Streck.

Coorientação: Fábio Antunes Rizzo.

1. Úbere - Doenças. 2. Microorganismos. 3. Essências e óleos essenciais. 4. Mastite - Tratamento alternativo. I. Streck, André Felipe, orient. II. Rizzo, Fábio Antunes, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 591.469:636.2

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o) Paula
Fernanda Fedatto Leal - CRB 10/2291

TAMIRIS SILVA LOPES

ESTUDO SOBRE A AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE
MICROORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck
Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Antunes Rizzo

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05 DE JUNHO DE 2020.

Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Antunes Rizzo

Prof^ª. Dr^ª. Joséli Schwambach

Prof^ª. Dr^ª. Lilian Kolling Girardini

Prof^ª. Dr^ª. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe Lisandra que sempre foi meu maior exemplo e lutou bravamente para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. André Felipe Streck, pela oportunidade de realizar este projeto e por sempre acreditar no meu potencial, não medindo esforços para que eu tivesse todos os recursos necessários para executar o trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fábio Antunes Rizzo, por ter sido o primeiro a escutar minha ideia de projeto e ter acreditado nela tanto quanto eu.

Às minhas ICs Caroline Fussieger e Paula Scalabrin Fontoura, por serem meu braço direito e ajudarem na realização de todas as etapas desse projeto, sem elas eu não conseguiria.

Aos demais estagiários, colegas de pós-graduação e à técnica Simone, do laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária, por compartilharem comigo os anseios e me auxiliarem quando necessário.

À pós-doutoranda Simone Silveira, que mesmo em sua breve passagem em nosso laboratório, trouxe muito conhecimento e auxiliou imensamente na execução do projeto.

À Prof^a. Dr^a. Mariana Roesch Ely pelo empréstimo do Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA.

À agência de fomento CAPES, pelo suporte financeiro e à Universidade de Caxias do Sul, pela infraestrutura que permitiram o desenvolvimento deste trabalho e aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelas contribuições à minha formação acadêmica.

À minha família, por viverem esse sonho comigo. Sem eles nada disso seria possível.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação de mestrado, minha eterna gratidão.

Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então,
com todo o coração, dedicar-se a ele.”

Buda

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS.....	9
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL.....	16
2.1 Definição e caracterização da mastite bovina.....	16
2.2 Impactos econômicos associados à mastite bovina.....	20
2.3 Tratamento convencional e medidas de controle	22
2.4 Resistência associada aos patógenos da mastite bovina.....	24
2.4.2 <i>Enterococcus</i> spp.....	29
2.4.3 <i>Corynebacterium</i> spp.	30
2.4.4 <i>Streptococcus</i> spp.	30
2.4.5 Enterobactérias.....	31
2.6 Terapias alternativas.....	33
2.6.1.1 Capim-limão.....	37
2.6.1.2 Tomilho.....	38
2.6.1.3 Lavanda.....	39
2.6.1.4 Hortelã-menta	40
2.6.1.5 Eucalipto.....	42
3.1 Objetivo geral.....	45
3.2 Objetivos específicos.....	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Capítulo I.....	46
4.2 Capítulo II.....	76
4.3 Capítulo III.....	100
5 DISCUSSÃO GERAL.....	131
6 CONCLUSÕES.....	134
7 PERSPECTIVAS.....	135
8 REFERÊNCIAS	136
9 ANEXOS	156

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

CBT: Contagem bacteriana total

CCS: Contagem de células somáticas

CT: Canal do teto

CG-MS: Gas Chromatography–Mass Spectrometry (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas)

CG-FID: Gas Chromatography with Flame-Ionization Detection (Cromatografia a gás com detector por ionização de chama)

CIM: Concentração inibitória mínima

CBM: Concentração bactericida mínima

SCN: *Staphylococcus* coagulase-negativa

GN: Gram-negativas

GP: Gram-positivas

GRAS: Generally Regarded as Safe (Geralmente considerado como seguro)

°C: Graus Celsius

IIM: Infecção intramamária

LPS: Lipopolissacarídeos

MRS: *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina (methicillin-resistant *Staphylococcus* spp.)

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

MR-CoNS: *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa resistentes à metilina (methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp.)

mL: Mililitro

OE: Óleo essencial

μg : Micrograma

μL : Microlitro

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação está estruturada da seguinte forma: introdução geral, objetivos do trabalho (geral e específicos), 3 capítulos com artigos e discussão geral. As conclusões obtidas são apresentadas, seguida das perspectivas, referências bibliográficas e os anexos.

A introdução da dissertação apresenta generalidades sobre a mastite bovina, sua classificação e etiologia, prejuízos associados, tratamento convencional, principais agentes causadores e o problema da resistência, além da possibilidade dos óleos essenciais e extratos vegetais como tratamentos alternativos. O Capítulo I apresenta o trabalho publicado na revista “Research in Veterinary Science”, o qual abordou estudos utilizando extratos vegetais e óleos essenciais contra microrganismos causadores de mastite bovina, os entraves para utilização desses derivados vegetais e perspectivas de minimizá-los.

O Capítulo II refere-se ao artigo que será submetido à revista “Brazilian Journal of Microbiology”, que apresentou os patógenos identificados como causadores de mastite em municípios da região da serra gaúcha, Rio Grande do Sul e o perfil de suscetibilidade antimicrobiana desses isolados frente aos antimicrobianos comumente utilizados rotineiramente para tratamento da doença.

O capítulo III traz o artigo que será submetido à revista “Journal of Dairy Science”, mostrando a atividade de diferentes óleos essenciais sobre patógenos da mastite com perfis de resistência distintos.

Ao final, é apresentada uma discussão geral acerca da mastite bovina, as conclusões finais do trabalho desenvolvido seguido das perspectivas, referências bibliográficas e anexos.

RESUMO

A mastite bovina é uma das principais enfermidades que acometem o gado leiteiro no mundo. Consiste na inflamação da glândula mamária, causada principalmente por bactérias. Os impactos econômicos associados a essa doença surgem através da queda na produção, perda na qualidade, descarte do leite, gastos com medicamentos, serviços veterinários e descarte prematuro de animais. No geral, o tratamento e a prevenção da mastite bovina são feitos através da utilização de antimicrobianos. Porém, o uso exacerbado desses medicamentos, muitas vezes de forma empírica e subterapêutica, está contribuindo para o desenvolvimento da resistência antimicrobiana nos patógenos da mastite. Dessa forma, a busca por tratamentos alternativos é requerida e os óleos essenciais apresentam-se como possibilidades promissoras pela sua origem natural e atividade antimicrobiana bem relatada. Com isso, o objetivo deste estudo foi isolar, identificar e determinar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de bactérias causadoras de mastite bovina em municípios da região da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul, avaliar a presença do gene *mecA* e seu homólogo *mecC* nos isolados pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, além de analisar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de capim-limão, tomilho, lavanda, eucalipto e hortelã-menta sobre esses isolados. Ao todo, foram identificados 41 microrganismos. O grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativa foi o mais prevalente (65,8%), seguido de *S. aureus* (17,1%). Foram detectados altos percentuais de resistência à penicilina (39,02%) e tetraciclina (34,14%), além de altos percentuais de multirresistência. Em relação aos óleos essenciais, o óleo de capim-limão mostrou-se mais eficiente sobre todos os microrganismos testados, enquanto o óleo de eucalipto apresentou resultados pouco promissores. Os resultados encontrados neste trabalho evidenciam elevada resistência a antimicrobianos em microrganismos causadores de mastite bovina em municípios pertencentes à Serra Gaúcha e sugerem que os óleos de capim-limão e tomilho podem ser uma alternativa para o tratamento em substituição aos fármacos convencionais. Porém, ainda são necessários estudos acerca da citotoxicidade, estabilidade e forma de aplicação desses derivados vegetais.

Palavras-chave: úbere, multirresistência, tratamentos alternativos

ABSTRACT

Bovine mastitis is one of the main diseases that affect dairy cattle in the world. It consists of inflammation of the mammary gland, caused mainly by some bacterias. The economic impacts associated with this disease led to a decrease in milk production and quality, discard of milk, expenses with medicines, veterinary services and premature losses of animals. In general, the treatment and prevention of bovine mastitis is done through the use of antimicrobials. However, the exacerbated use of these drugs, often in an empirical and subtherapeutic manner, is contributing to the increase in antimicrobial resistance in mastitis pathogens. Searches for alternative treatments are required and essential oils are presented as promising possibilities due to their natural origin and well-reported antimicrobial activity. Thus, the objective of this study was to isolate, identify and determine the antimicrobial susceptibility profile of bacteria that cause bovine mastitis in municipalities in the Serra Gaúcha region, Rio Grande do Sul, to evaluate the presence of the *mecA* gene and its *mecC* homologue in the isolates belonging to the genus *Staphylococcus*, in addition to analyzing the antibacterial activity of essential oils of lemon grass, thyme, lavender, eucalyptus and mint on these isolates. In all, 41 microorganisms were identified. The group of *Staphylococcus* coagulase-negative was the most prevalent (65.8%), followed by *S. aureus* (17.1%). High percentages of resistance to penicillin (39.02%) and tetracycline (34.14%) were detected, in addition to high percentages of multidrug resistance. Regarding essential oils, lemongrass oil proved to be more efficient over all tested microorganisms, while eucalyptus oil showed little promising results. The results found in this work show high resistance to antimicrobials in microorganisms that cause bovine mastitis in counties belonging to Serra Gaúcha and suggest that oils of lemongrass and thyme may be an alternative for the treatment in substitution to conventional drugs. However, studies on the cytotoxicity, stability and form of application of these plant derivatives are still needed.

Keywords: udder, multidrug resistance, alternative treatments

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença complexa e multifatorial que acomete os rebanhos leiteiros no mundo todo (De Vliegher et al., 2018). É definida como a inflamação da glândula mamária causada principalmente por microrganismos, mais frequentemente bactérias. É considerada a doença mais dispendiosa das fazendas leiteiras, impactando negativamente o bem-estar animal, a produção e a qualidade do leite, além dos altos custos gerados com medicamentos, serviços veterinários, descarte do leite e descarte prematuro das vacas (Lopes et al., 2012).

A doença pode ser classificada como clínica ou subclínica, de acordo com a intensidade da resposta inflamatória produzida. A mastite clínica caracteriza-se por sinais macroscópicos evidentes, tais como edema, calor, dor, rubor e alterações nas características físicas do leite, podendo haver o aparecimento de grumos, pus, sangue e modificações na consistência (Tozzetti et al., 2008). Já a mastite subclínica apresenta-se de forma silenciosa, não causando sinais visíveis, porém elevando a contagem de células somáticas (CCS) (células de descamação do epitélio da própria glândula mamária e leucócitos), alterando a composição e diminuindo a produção de leite. Para seu diagnóstico, a mensuração da CCS é realizada de maneira direta ou indireta, por meio dos testes *California Mastitis Test* (CMT) ou pela contagem eletrônica de células somáticas (Santos e Fonseca, 2007).

De maneira geral, o tratamento e a prevenção da mastite bovina são feitos através do uso de antimicrobianos. Porém, o uso indiscriminado, subterapêutico e/ou empírico dessas drogas vêm sendo associado ao desenvolvimento da resistência nos patógenos da mastite (Kurosawa et al., 2020). Diante desse cenário, há grandes preocupações relacionadas ao risco de transferência desses microrganismos resistentes a humanos, pelo

fato das substâncias antimicrobianas corriqueiramente utilizadas na indústria leiteira serem em grande parte das mesmas classes daquelas utilizadas na medicina humana.

Por esse motivo, a procura por tratamentos alternativos está em ascensão e os produtos oriundos de plantas destacam-se pela ampla atividade biológica e boa aceitação pelo mercado consumidor. Os óleos essenciais são compostos aromáticos voláteis, sintetizados pelas plantas aromáticas durante o metabolismo secundário, podendo ser extraídos de várias partes do vegetal (Burt, 2004). Diversas propriedades já foram relatadas nos óleos essenciais e a antibacteriana mostra-se promissora pelo amplo espectro de ação. Nesse contexto, avaliar a atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isoladas de vacas diagnosticadas com mastite é válido pela oportunidade de redução na utilização de antimicrobianos na cadeia do leite e a possibilidade de utilização destes produtos em fazendas que trabalham com produção orgânica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

2.1 Definição e caracterização da mastite bovina

A mastite bovina é uma condição inflamatória das glândulas mamárias de animais em lactação, caracterizada por dor, edema, calor local e infiltração polimórfica de neutrófilos (Yadav et al., 2020). Essa doença é um grande problema para a indústria de laticínios, pois diminui a produtividade e a qualidade do leite e aumenta o custo do gerenciamento dos rebanhos (Yadav et al., 2020), além de ter efeitos adversos no bem-estar dos animais (Steele et al., 2020).

Como na maioria das doenças infecciosas, a incidência da mastite depende dos seguintes componentes: virulência e quantidade de microrganismos invasores, eficiência das defesas do úbere e fatores de riscos ambientais (Leelahapongsathon et al., 2020). Segundo Derakhshani et al. (2018), os mecanismos de defesa do úbere contra a colonização microbiana são modulados por vários fatores incluindo, entre outros, o genótipo das vacas em genes específicos que codificam vários componentes do sistema imunológico inato e adaptativo, alterações do estado fisiológico das vacas e perfil metabólico durante as diferentes fases do ciclo de lactação. Além disso, a composição e a funcionalidade da microbiota comensal que coloniza o ápice, o orifício e o revestimento do canal do teto (CT) podem influenciar a colonização microbiana intramamária e, como resultado, modular o estado de saúde do úbere. Certas condições (por exemplo, perda pré-parto do tampão de queratina do CT ou dilatação pós-ordenha do músculo esfíncteriano do CT) podem comprometer esse mecanismo da primeira linha de defesa do úbere e aumentar a propensão à invasão e colonização por uma ampla gama de microrganismos de várias fontes extramamárias (Figura 1).

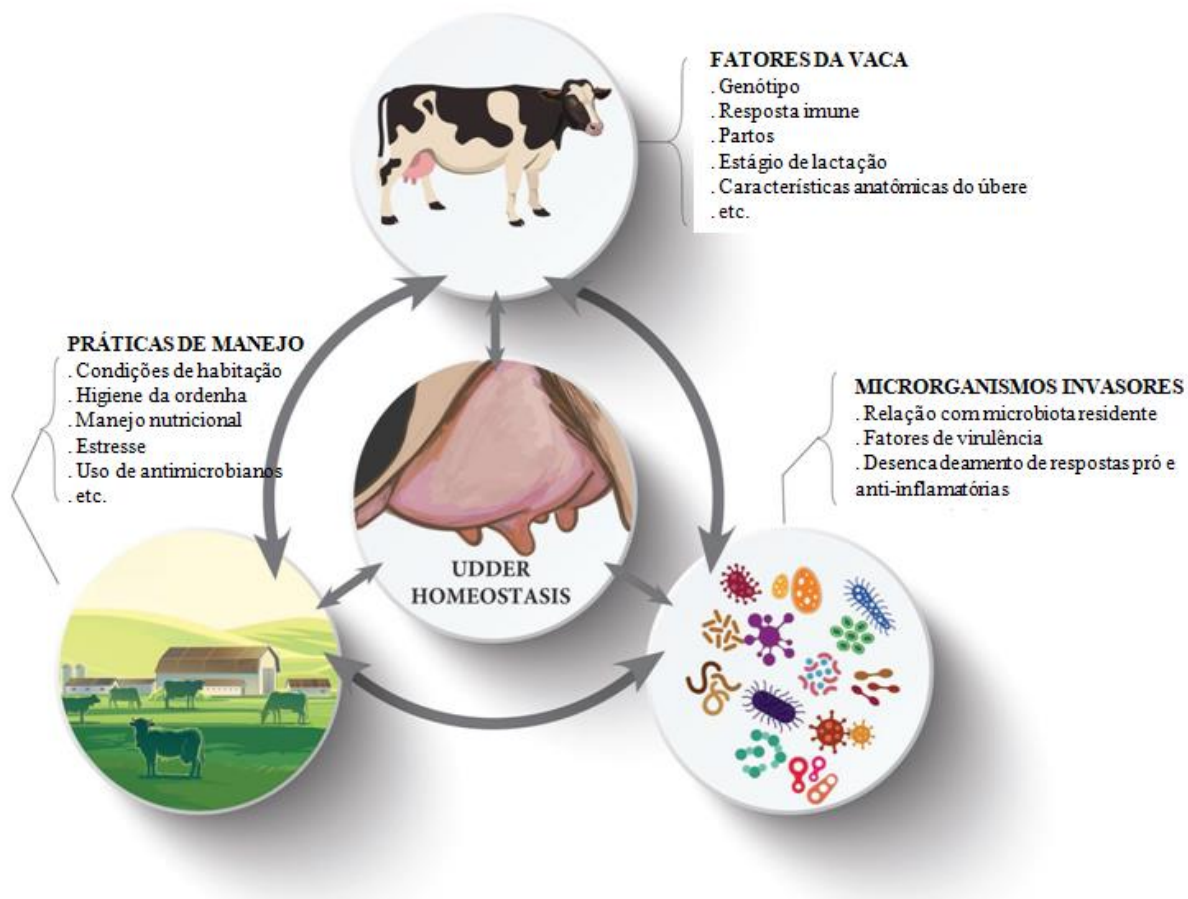


Figura 1 - Determinantes da homeostase do úbere: os mecanismos de defesa do úbere contra a colonização microbiana são modulados por uma complexa rede de interação entre o genótipo da vaca, o estado fisiológico e as características do úbere; invasão de microrganismos, suas interações e fatores de virulência; e práticas de manejo que podem influenciar a homeostase metabólica e imunológica da vaca (adaptado de Derakhshani et al., 2018).

Quando os patógenos atravessam o CT e se multiplicam no leite, uma fase aguda do mecanismo de defesa do úbere tenta resolver a infecção intramamária (IIM) imediatamente (Suriyasathaporn et al., 2000; Leelahapongsathon et al., 2020). Se os mecanismos de defesa celulares e não-celulares combaterem a infecção de maneira rápida e eficaz, a mastite será leve e transitória, curando-se espontaneamente. No entanto, quando os mecanismos de defesa falham ou quando o patógeno é capaz de fugir das defesas normais (por exemplo, resistir à fagocitose ou destruição intracelular) (Morin, 2009), a eliminação dos

microrganismos será mal sucedida e a IIM pode proceder de duas maneiras: a primeira seria uma IIM com uma resposta imune agressiva, causando mastite clínica. Já a segunda opção seria uma IIM levando a uma resposta imune mais branda, resultando na persistência da infecção sem sinais clínicos, resultando em mastite subclínica (EzzatAlnakip et al., 2014; Leelahapongsathon et al., 2020). Portanto, a intensidade da resposta inflamatória irá determinar se a mastite será clínica ou subclínica (Morin, 2009).

A gravidade também é relacionada ao patógeno causador. As infecções por bactérias Gram-negativas (GN) tendem a induzir uma resposta inflamatória mais grave, com potencial envolvimento sistêmico, enquanto muitos patógenos Gram-positivos (GP) normalmente produzem uma resposta inflamatória mais leve ou retardada (Schukken et al., 2011; Steele et al., 2020). A patogenicidade das bactérias GN se deve a alta capacidade de crescer nas secreções mamárias e liberar endotoxina, presente no lipopolissacarídeos (LPS), da parede celular. Quanto mais rápido o número de bactérias aumenta na glândula mamária, mais endotoxinas estão presentes e mais acelerada é a resposta inflamatória (Mehrzaad et al., 2008; Schukken et al., 2011), levando ao aparecimento de sinais clínicos como edema, dor, calor ou aparecimento de grumos, pus, sangue e alterações na consistência do leite. Esses sinais podem ser detectados através da avaliação clínica do úbere buscando os sintomas característicos e com o teste da caneca de fundo preto, que avalia as alterações físicas do leite (Santos e Fonseca, 2007).

As bactérias GP são frequentemente associadas à mastite subclínica, a qual não acarreta alterações visíveis no leite e úbere, sendo necessários testes auxiliares para o diagnóstico. Esses testes determinam a CCS presentes no leite, em resposta a presença do microrganismo na glândula mamária. A mensuração da CCS pode ser feita de maneira direta ou indireta, por meio dos testes CMT ou pela contagem eletrônica de células somáticas (Fonseca e Santos, 2001). O leite de um quarto não infectado apresenta CCS

menor que 100.000 cel/mL, enquanto a CCS de um quarto infectado é geralmente superior a 200.000 cel/mL, o que indica a ocorrência de mastite subclínica ou que o quarto está se recuperando da infecção (Santos e Fonseca, 2007).

Os agentes etiológicos causadores da mastite bovina são classificados em dois grupos distintos: contagiosos e ambientais. Os patógenos contagiosos têm a pele do teto como reservatório e causam IIM quando entram no úbere através do CT (Svennesen et al., 2018). A transmissão ocorre quando o leite de uma glândula infectada entra em contato com uma glândula não infectada durante o processo de ordenha. O equipamento de ordenha, mãos do ordenhador e toalhas são fômites importante se as vacas acometidas forem ordenhadas antes das vacas saudáveis. Em alguns casos, flutuações bruscas de vácuo no conjunto de ordenhadeiras podem impulsionar patógenos contagiosos para o CT de uma glândula sadia. *Streptococcus agalactiae* e *S. aureus* são os principais patógenos da mastite contagiosa, causando elevação na CCS e reduzindo a produção de leite. Os *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN) são comumente observados em casos de mastite contagiosa (Kim et al., 2019) e juntamente com *Corynebacterium bovis*, são considerados patógenos menores (Morin, 2009), causando menos impacto na CCS e afetando a produção de maneira mais branda. Esses microrganismos são frequentemente associados à mastite subclínica.

Os patógenos ambientais, por sua vez, têm como reservatório predominante o meio ambiente. A transmissão ocorre quando esses microrganismos oportunistas entram no CT entre as ordenhas ou no momento da ordenha. As fontes comuns de infecção são esterco, camas, solo e água contaminada. Os patógenos ambientais predominantes da mastite são bactérias coliformes e estreptococos que não *Streptococcus agalactiae* (estreptococos ambientais) (Morin, 2009). Estes, geralmente são associados a casos de mastite clínica.

2.2 Impactos econômicos associados à mastite bovina

A mastite resulta em problemas substanciais em termos de bem-estar animal, segurança alimentar e lucratividade da produção de leite (Heikkilä et al., 2018). As perdas econômicas associadas a essa doença derivam principalmente da redução na produção, descarte do leite, custos de reposição de vacas, redução do valor de venda das vacas, abate de animais continuamente infectados, serviços veterinários, medicamentos, mão de obra e penalidades na qualidade do leite (Seegers et al., 2003; Reshi et al., 2015).

O efeito negativo da mastite na produção de leite está diretamente relacionado ao grau de lesão do tecido mamário, alteração dos componentes do leite e elevação da CCS (Langoni et al., 2017). Geralmente, a CCS é utilizada para mensurar a gravidade das IIM e também como indicadora de perdas econômicas (Petzer et al., 2017). Embora inúmeros fatores possam influenciar a CCS, tais como ordem de parto, estágio de lactação, configurações incorretas da máquina de ordenha, estresse e outros, a causa mais importante permanece o status de infecção da glândula mamária (Petzer et al. 2017). Esse aumento de CCS dá-se pela migração de neutrófilos após microrganismos invadirem o CT (Reshi et al., 2015), e a redução na produção deve-se à lesões nas células epiteliais secretoras de leite, podendo haver destruição permanente do parênquima, originando áreas de fibrose e micro-abscessos que protegem o agente patogênico dos mecanismos de defesa do úbere, como da fagocitose (Langoni et al., 2017).

De acordo com Sert et al. (2016), os efeitos de uma CCS elevada nos componentes do leite são: menor concentração de proteína, caseína, lactose e gordura. Além disso, ocorre alterações no balanço mineral do leite, aumento da concentração de sódio, diminuição do potássio e cálcio total à medida que a CCS aumenta. Essas alterações têm impactos diretos no processo de fabricação de lácteos, com vários estudos descrevendo coagulação mais

lenta do leite e consistência fraca de coalhadas (Bobbo et al., 2017). Também podem ser identificados uma redução na produção de queijos, um comprometimento da qualidade sensorial e uma diminuição do tempo de prateleira dos produtos lácteos (Sert et al., 2016).

Embora os parâmetros que definem a qualidade do leite variam de acordo com o país, região, práticas de manejo animal e padrões de segurança alimentar, fatores bem estabelecidos como baixa contagem bacteriana total, baixa CCS, alto teor de gordura e proteína, ausência de resíduos de produtos veterinários e contaminantes e gado livre de tuberculose e brucelose, são indicadores internacionalmente aceitos de qualidade do leite (Picinin et al., 2019). Devido a crescente preocupação acerca da procedência do leite, surgiram mudanças na legislação com o objetivo de adequar a produção leiteira às exigências do mercado consumidor (Costa et al., 2019). A remuneração por um produto de melhor qualidade foi a maneira utilizada pelas indústrias para melhorar a higiene da ordenha por parte dos produtores, devido às exigências de aumento do rendimento industrial e da lucratividade (Oliveira et al., 2013). Esse programa bonifica os produtores de leite com maior percentual de constituintes nutricionais e índices de qualidade mais altos (Oliveira et al., 2013), visando a redução da contagem bacteriana total (CBT) e CCS do leite cru (Sert et al., 2016). Nesse sentido, a produção e o processamento de leite de alta qualidade trazem benefícios tanto para os produtores quanto para a indústria e os consumidores, o que é importante para garantir a confiança do consumidor e a competitividade da cadeia produtiva do leite (Oliveira et al., 2013).

Múltiplas medidas devem ser adotadas com o objetivo de evitar a ocorrência e a transmissão da mastite nos rebanhos, que vão desde a higiene adequada no momento da ordenha até o manejo sanitário das instalações e do ambiente de permanência das vacas, garantindo assim a salubridade e a qualidade do leite. A grande prevalência da doença, bem como o alto custo dos tratamentos instituídos, juntamente com os prejuízos e perdas na

produção, justificam a necessidade do estabelecimento de programas relacionados à sua prevenção e controle (Coser et al., 2012).

2.3 Tratamento convencional e medidas de controle

Os procedimentos adotados para o controle da mastite em fazendas leiteiras envolvem boas condições de higiene, um correto manejo da ordenha, incluindo pré-dipping e pós-dipping, que consiste na desinfecção dos tetos antes e após a ordenha, terapia da vaca seca, tratamento dos animais acometidos e descarte dos que apresentarem infecções crônicas (Coser et al., 2012).

Segundo Campos e Lizieire (1993), deve-se manter um rígido controle higiênico-sanitário ambiental da fazenda por meio da limpeza dos pastos, estábulos e salas de ordenha, evitando o acúmulo de fezes, água parada ou lama, principalmente nos locais de permanência das vacas, afastar do restante do rebanho os animais com mastite crônica e ter cautela com a entrada de novos animais, certificando-se que estes não possuem infecções que possam causar contaminação.

Já os princípios que orientam um correto manejo de ordenha incluem procedimentos de pré-dipping, estimulação da ejeção, extração eficiente e rápida do leite e aplicação de pós-dipping (Fonseca e Santos, 2001). Esses procedimentos, quando utilizados em conjunto, constituem a estratégia mais eficiente na prevenção da transmissão dos agentes contagiosos e, em menor escala, de agentes ambientais (Coser et al., 2012).

No contexto da mastite bovina, os antimicrobianos são usados regularmente de forma profilática e terapêutica (Derakhshan et al., 2018). O custo do leite descartado e o risco de resíduos foram reconhecidos como limitações ao uso de antimicrobianos para tratar a grande proporção de vacas lactantes infectadas, de modo que a utilização da terapia

antibiótica em vacas secas começou a ser explorada (Albright et al., 1961). No período em que a vaca cessa a produção de leite é realizada a aplicação de antibióticos de longa ação em todos os quartos mamários a fim de curar as infecções subclínicas adquiridas durante a fase de lactação e evitar a ocorrência de novos casos durante o período seco (Andrews et al., 2008) . Porém, muitas vacas sadias são tratadas. Isso foi amplamente aceito, pois a infusão também protege contra novas infecções. No entanto, as vacas com probabilidade de se infectar não podem ser previstas, e muitos animais que permaneceriam sadios recebem tratamento desnecessário (Hillerton et al., 2017). Por esse motivo, pesquisas acerca de tratamentos antimicrobianos seletivos em vacas secas estão em ascensão, com o intuito de excluir os animais que apresentaram baixa CCS e consequentemente reduzir a quantidade de antimicrobianos utilizados nesse setor (Cameron et al., 2015; Tetens et al., 2019). Para a implementação dessa prática, é necessário que se faça um rígido controle dos dados dos animais ao longo do período lactante.

Como a antibioticoterapia é o procedimento mais comum usado para tratar os casos de mastite bovina (Freitas et al., 2018), essa doença é responsável pela maior proporção do uso de antimicrobianos no gado leiteiro (Zhang et al., 2018). Existe uma relação entre o aumento do uso dessas drogas em animais de produção e patógenos de emergência em humanos, com diminuição da suscetibilidade ou resistência completa a antibióticos (Landers et al., 2012). Além disso, a presença de resíduos antimicrobianos no leite destinado ao consumo humano é uma preocupação crescente (Freitas et al., 2018), tornando-se uma questão de saúde pública, pelo problema de resistência bacteriana e a possibilidade de disseminação através do consumo de lácteos (Heikkilä et al., 2018).

Outro ponto importante é o fato de os antimicrobianos pertencerem ao grupo de substâncias residuais com maior influência na qualidade do leite (Langoni et al., 2017), afetando diretamente a indústria de laticínios. Para minimizar esse problema, deve-se

respeitar o período de carência do antimicrobiano que estiver sendo utilizado (Langoni et al., 2017).

Devido aos riscos associados à antibioterapia e a pressão pública para reduzir o uso de antibióticos na produção animal, existe um grande incentivo para encontrar medidas eficazes de controle dos quadros de mastite bovina sem a utilização de antibióticos (Côté-Gravel e Malouin, 2019). Com isso, a vacinação surgiu como uma ferramenta auxiliar que visa atingir um ou mais dos seguintes objetivos: prevenir a ocorrência de novas infecções intramamárias, reduzir a gravidade e frequência de sintomas clínicos e auxiliar na eliminação de infecções crônicas (Santos e Tomazi, 2012). Porém, nenhuma formulação de vacina disponível comercialmente demonstra proteção suficiente e potencial econômico (Côté-Gravel e Malouin, 2019). Vários fatores são responsáveis pela falta de proteção, incluindo alvos inadequados de vacina, alta diversidade entre cepas que provocam mastite, variação de vaca a vaca na resposta imune e falha em provocar uma resposta imune apropriada para proteção contra um patógeno altamente complexo (Côté-Gravel e Malouin, 2019). Além disso, um entendimento completo da imunidade adaptativa no contexto da saúde mamária oferece desafios, uma vez que a glândula mamária dos ruminantes é única, pois o tráfico de linfócitos, essencial à imunidade adaptativa, é compartilhado com o sistema imunológico periférico e não com o sistema imunológico da mucosa comum. Essa relativa incapacidade das vacas em montar uma resposta protetora adequada e duradoura é outro grande obstáculo para o desenvolvimento de vacinas eficazes (Schukken et al., 2011).

2.4 Resistência associada aos patógenos da mastite bovina

Os antimicrobianos são tão importantes para a manutenção de animais produtores de alimentos, incluindo gado leiteiro, quanto para a saúde humana, mas a eficácia dessas

importantes terapias é ameaçada pela proliferação da resistência antimicrobiana (Oliver et al., 2020). Embora bactérias resistentes e seus genes de resistência existam por milênios, a prevalência aumentou rapidamente em conjunto com a fabricação generalizada e o uso antropogênico de antibióticos (D'Costa et al., 2011).

Desde a década de 1950, a pressão seletiva imposta às bactérias pelo uso de agentes antimicrobianos possibilitou a esses microrganismos desenvolver e refinar várias maneiras e meios de resistir ou escapar dos efeitos inibitórios dessas drogas (Schwarz et al., 2017). As bactérias podem sobreviver ao tratamento com antibióticos devido a quatro fenômenos diferentes: resistência, heterorresistência, tolerância e persistência (Bakkeren et al., 2020).

A resistência aos antibióticos geralmente é determinada geneticamente e possibilita que os microrganismos cresçam em altas concentrações de um antibiótico, independentemente da duração do tratamento e é quantificada pela concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico específico (Brauner et al., 2016; Bakkeren et al., 2020). Pode ser dividida em intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca é uma característica bacteriana específica de gênero ou espécie e geralmente é baseada na ausência ou inacessibilidade das estruturas-alvo. Em contraste, a resistência adquirida é uma propriedade específica da cepa que pode ser baseada em uma ampla variedade de mecanismos de resistência presentes nas diferentes bactérias (Schwarz et al., 2017). Esses mecanismos da resistência podem ser classificados em quatro categorias principais: redução da permeabilidade; (2) efluxo ativo; (3) modificação do agente antimicrobiano; e (4) modificação do alvo (Giguère et al., 2013) (Figura 2).

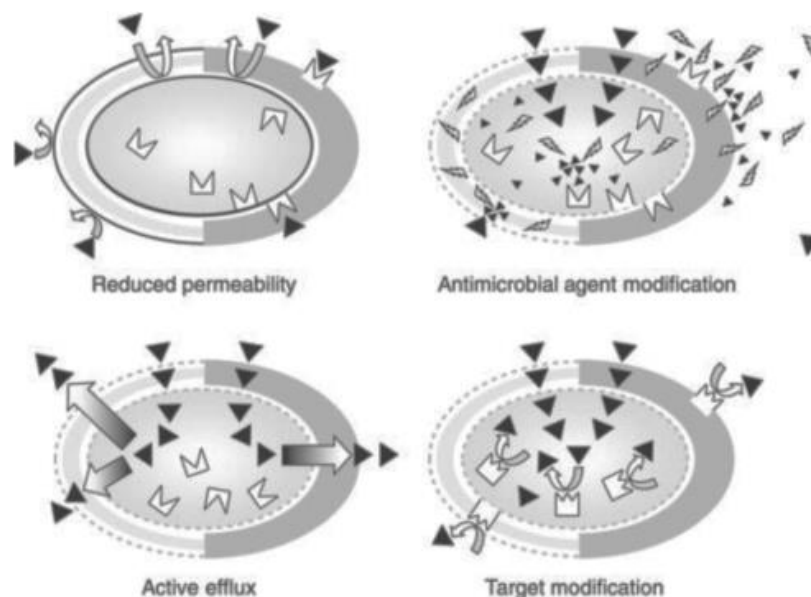


Figura 2 - Os quatro principais mecanismos de resistência antimicrobiana: (1) A permeabilidade reduzida pode ser devido à falta de permeabilidade da membrana externa ou da membrana celular; (2) o efluxo ativo pode bombear agentes antimicrobianos de volta ao espaço periplasmático ou diretamente no meio externo; (3) a modificação do agente antimicrobiano por enzimas bacterianas pode ocorrer após a penetração do agente na célula ou mesmo fora da célula bacteriana, antes mesmo do agente atingir seu alvo na superfície da bactéria; (4) a modificação do alvo para a superfície exposta quanto para alvos intracelulares (adaptado de Giguère et al., 2013).

Na maioria dos casos, a resistência se expressa em todas as células da população bacteriana. Entretanto, em alguns casos, o fenótipo de resistência é expresso apenas por algumas células de uma população bacteriana clonal, sendo então denominada heterorresistência (Bakkaren et al., 2020). Essa subpopulação pode ser o resultado de raros mutantes resistentes que aumentam em frequência ao longo do tempo (heterorresistência policlonal) ou duas subpopulações distintas (sensíveis e resistentes) que alternam fenotipicamente mesmo na ausência de antibióticos (Bakkaren et al., 2020). O termo tolerância, por sua vez, é usado para descrever a capacidade, herdada ou não, de microrganismos sobreviverem à exposição transitória a altas concentrações de um antibiótico sem uma alteração na CIM, o que geralmente é alcançado diminuindo a velocidade de um processo bacteriano essencial (Brauner et al., 2016). Ao contrário da

resistência, as bactérias tolerantes não podem se replicar na presença do antibiótico, mas são mortas mais lentamente (Cohen et al., 2013; Michiels et al., 2016; Bakkaren et al., 2020).

Ao contrário da resistência e da tolerância, a persistência ocorre apenas em uma subpopulação de células bacterianas (Brauner et al., 2016). As células bacterianas persistentes são variantes transitórias de uma população geneticamente homogênea, que podem sobreviver à exposição ao estresse, como tratamento com antibióticos, entrando em latência celular (Lewis, 2001; Suclupe-Campos e Aguilar-Gamboa, 2020). A latência é uma característica primária das bactérias persistentes e é definida como o estado que envolve o desligamento metabólico reversível (metabolismo inativo) que permite que as células escapem da ação letal dos antibióticos, onde muitos locais-alvo tornam-se inativos, o que explica a ineficácia dos tratamentos antimicrobianos (Zhang et al., 2012; Suclupe-Campos e Aguilar-Gamboa, 2020). Esse fenótipo é uma importante primeira linha de defesa contra antibióticos antes que a resistência antimicrobiana seja adquirida (Suclupe-Campos e Aguilar-Gamboa, 2020).

De acordo com Suclupe-Campos e Aguilar-Gamboa (2020), a possibilidade das bactérias persistentes serem a etiologia das doenças crônicas, constituírem reservatórios biológicos de recorrências e que mutantes resistentes possam emergir delas destaca a importância de revolucionar práticas clínicas, métodos de diagnóstico e necessidade de desenvolver novas antimicrobianos para erradicar essa subpopulação bacteriana de difícil controle.

2.4.1 *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* é constituído por bactérias cocóides GP, não-móveis, pertencentes à Família Micrococcae. Geralmente fazem parte da microbiota comensal da pele de humanos e animais. Embora o gênero *Staphylococcus* inclua 52 espécies e 28 subespécies, *S. aureus* é uma das espécies com maior relevância clínica (Lee et al., 2018). Na mastite bovina, *S. aureus* é um dos agentes etiológicos prevalentes (Soares et al., 2017). Estudos têm demonstrado altos níveis de resistência a β -lactâmicos em *S. aureus* isolados de leites mastíticos (Medeiros et al., 2009; Ren et al., 2020), em especial à penicilinas com índices variando de 83% a 95% (Silva et al., 2012; Soares et al., 2017; Titouche et al., 2019), além de resistência à eritromicina (Ren et al., 2020), tetraciclinas, fluoroquinolonas, trimetoprim (Freitas et al., 2018; Titouche et al., 2019) e neomicina (Freitas et al., 2018). Existem também diversos relatos de multirresistência (Medeiros et al., 2009; Li et al., 2015a; Freitas et al., 2018; Cheng et al., 2019; Titouche et al., 2019; Ren et al., 2020), ou seja, resistência a 3 ou mais classes de antimicrobianos (Li et al., 2015b), tanto no Brasil como em outros países do mundo. Já foi descrito a ocorrência de cepas multirresistentes de *S. aureus* isoladas de leite de vaca e essas foram associadas a casos de infecções humanas (Freitas et al., 2018).

Os SCN são considerados patógenos menores da mastite bovina, elevando moderadamente a CCS do leite. São os microrganismos mais isolados em leite em diversas localidades do mundo (Santos et al., 2010; Oliveira et al., 2011; Saab et al., 2014; Sztachañska et al., 2016; Vakkamäki et al., 2017). Esse grupo tende a ser mais resistente aos antimicrobianos em comparação a *S. aureus* e frequentemente apresentam multirresistência (Medeiros et al., 2009; Cheng et al., 2019; Kim et al., 2019).

Outra grande preocupação é a emergência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA) e SCN resistentes à meticilina (methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus*- MR-CoNS) em

bovinos (Li et al., 2015b). A resistência à meticilina é conferida pela presença do gene *mecA* (ou seu homólogo *mecC*) que codifica a produção de uma proteína alterada de ligação à penicilina (PBP2a), com baixa afinidade por todos os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (Titouche et al., 2019). Numerosos estudos têm descrito a incidência de MRSA e MR-CoNS no leite e produtos lácteos (Brody et al., 2008; Li et al., 2015b; Titouche et al., 2019; Kim et al., 2019) e análises genéticas de *Staphylococcus* resistentes à meticilina isolados de humanos e mastite bovina sugeriram que a transferência horizontal de genes entre patógenos humanos e animais é inevitável (Li et al., 2015b; Kim et al., 2019).

2.4.2 *Enterococcus* spp.

O gênero *Enterococcus* pertence à Família Enterococcaceae e inclui 52 espécies e duas subespécies (Porto et al., 2016). Características intrínsecas de *Enterococcus* permitem que eles cresçam e sobrevivam em ambientes pouco favoráveis (dos Santos et al., 2007). Essas bactérias oportunistas fazem parte da microbiota intestinal fisiológica normal em humanos e animais, mas, nos últimos anos, tornaram-se um dos principais patógenos que causam inúmeras infecções em humanos, principalmente as adquiridas em hospitais, como bacteremia e infecções do trato urinário, pele, tecidos moles, abdômen e pelve, bem como sistema nervoso central (Róžańska et al., 2019). Além disso, são um dos agentes causadores ambientais da mastite bovina (Róžańska et al., 2019).

Estudos vêm demonstrando altos percentuais de resistência antimicrobiana em *Enterococcus* associados à mastite bovina. Róžańska et al. (2019) encontrou elevadas taxas de resistência à lincomicina (84%), tetraciclina (82%), eritromicina (50,57%) e

cloranfenicol (49,73%) na Polônia. Chajęcka-Wierzchowska et al. (2020), em estudos conduzidos também na Polônia, identificaram 23 fenótipos diferentes de resistência bacteriana em *Enterococcus* spp. isolados de produtos lácteos, além de multirresistência. Já *E. faecalis* isolados de quartos mastíticos na China apresentaram alta resistência à tetraciclina (87,7%) e eritromicina (79,0%) (Yang et al., 2018).

2.4.3 *Corynebacterium* spp.

O gênero *Corynebacterium* é composto por bacilos GP, membros do Filo Actinobacteria, residentes da pele de humanos e outros mamíferos (Clifford e Pritchett-Corning, 2012). Em relação a *Corynebacterium bovis*, apesar de controvérsias sobre seu papel na etiologia da mastite bovina, vários autores o associam à diminuição da produção e a casos de mastite crônica, muitas vezes em associação com outros microrganismos (Langoni et al., 2017).

Embora existam relatos de resistência e multirresistência em *Corynebacterium* spp., o potencial de transferir essa característica é baixo (Hahne et al., 2018) e a maioria das cepas são altamente suscetível à penicilina e respondem satisfatoriamente à terapia de vaca seca (de Sá et al., 2018).

2.4.4 *Streptococcus* spp.

Os estreptococos são considerados o segundo grupo de microrganismos em importância na etiologia da mastite dos ruminantes, sendo precedidos pelo grupo dos estafilococos. Quatro espécies, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equinus* e *S. uberis*

ocorrem na maioria dos rebanhos leiteiros do mundo (dos Santos et al., 2007), sendo classificados como contagiosos (*S. agalactiae*) e ambientais (*S. dysgalactiae*, *S. equinus* e *S. uberis*), porque estes apresentam maior capacidade de sobreviver e multiplicar em sítios extramamários incluindo, por exemplo, várias regiões do corpo do animal e outras fontes do ambiente de produção (dos Santos et al., 2007).

Estudos conduzidos no Brasil sobre o perfil de resistência antimicrobiana do gênero *Streptococcus* em rebanhos leiteiros apresentaram resultados preocupantes. Altas taxas de resistência foram encontrados em *S. agalactiae* frente à novobiocina (97%), oxacilina (97%), polimixina B (96%), estreptomicina (96%), lincomicina (95%) e 97,8% das cepas apresentaram multirresistência (Mesquita et al., 2019). Silva et al. (2017a) relatou as seguintes porcentagens de resistência com a mesma bactéria: sulfonamida (98,36%), tetraciclina (47,54%), clindamicina (29,51%), eritromicina (26,23%) e gentamicina (3,28%). Em outras espécies do mesmo gênero, como *S. uberis* e *S. dysgalactiae*, também há relatos de multirresistência (Pitkälä et al., 2008; Minst et al., 2012; Zhang et al., 2018).

2.4.5 Enterobactérias

Alguns dos gêneros mais importantes clinicamente da Família Enterobacteriaceae são *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Yersinia*, *Edwardsiella* e *Providencia* (Schukken et al., 2012). Como agente causador de mastite bovina destaca-se *E. coli*, a qual tem como habitat o trato gastrintestinal de humanos e animais, sendo eliminada nas fezes. Alguns outros membros do grupo também podem ser encontrados em fezes, porém são mais frequentemente isolados do ambiente (Schukken et al., 2012).

Segundo Tomazi et al. (2018), as IIM causadas por *E. coli* geralmente são de curta duração e o sistema imunológico da vaca é competente para eliminar espontaneamente infecções leves e com isso, o tratamento antimicrobiano pode ser desnecessário em muitos casos. No entanto, a maioria das fazendas ainda não identifica o patógeno e a mastite é tratada de forma empírica (Griffioen et al., 2016). O uso abusivo e não criterioso de antimicrobianos para controlar *E. coli* foi associado ao aumento do risco de resistência (Tomazzi et al., 2018). Com isso, a crescente descrição de resistência múltipla em *E. coli* isoladas do leite de bovinos tem alertado para o risco de veiculação de linhagens multirresistentes para o homem (de Sá et al., 2018; Tomazzi et al., 2018; Cheng et al., 2019; Guerra et al., 2020). Além de *E. coli*, outro agente GN comum da mastite que demonstra essa característica é *Klebsiella* spp. (Cheng et al., 2019; Salauddin et al., 2019).

2.5 Transferência de resistência antimicrobiana dos patógenos da mastite aos seres humanos

A rota de transmissão de resistência dos patógenos da mastite para humanos pode ocorrer através do consumo de leite e derivados. Porém, nos últimos anos, alguns países mais desenvolvidos elaboraram um rigoroso sistema federal de segurança alimentar que garante leite e carne sem resíduos de antibióticos e patógenos (Oliver et al., 2020). Todavia, a transmissão de resistência ainda ocorre pela disseminação de resíduos de antibióticos, bactérias resistentes e genes de resistência através do manejo adotado na destinação dos dejetos animais (urina + fezes) para áreas de cultivo e sistemas naturais, que podem então servir como reservatórios e vetores de resistência antimicrobiana para patógenos humanos (Xie et al., 2018; Oliver et al., 2020).

Estudos mostram que as pastagens destinadas a vacas leiteiras, as áreas de criação de bezerros, as terras próximas à fazendas e os solos expostos ao esterco desses animais tratados podem ter níveis elevados de resíduos de antibióticos, bactérias resistentes e genes de resistência (Oliver et al., 2020). Altos níveis também podem ser encontrados na água de irrigação, águas superficiais e águas subterrâneas nas proximidades das operações de laticínios (Li et al., 2015a; Pan e Chu, 2017; Oliver et al., 2020).

Como o uso de antimicrobianos em sistemas de produção animal está sob crescente análise, o tratamento da mastite sem conhecimento prévio do agente causador pode ser considerado imprudente (Steele et al., 2020). Os estudos de vigilância da resistência antimicrobiana são essenciais para escolher o tratamento mais apropriado e reduzir o risco de desenvolvimento e disseminação da resistência por meio da transferência lateral de genes de resistência ou transferência direta de patógenos resistentes (Zhang et al., 2018). A fim de reduzir esse problema no setor de laticínios, investimentos contínuos em pesquisas para desenvolver alternativas aos antimicrobianos são necessários e mais ênfase deve ser direcionada aos métodos para amenizar a resistência desses patógenos (Ruegg, 2017).

2.6 Terapias alternativas

2.6.1 Óleos essenciais

A resistência antimicrobiana surgiu como uma das ameaças mais importantes para a saúde humana e animal no mundo (Nobrega et al., 2018). Sem ação urgente, estima-se que 10 milhões de mortes humanas por ano serão atribuíveis à resistência de microrganismos até 2050 (O'Neill, 2016). Como o principal contribuinte para a deterioração dessa situação é o uso excessivo e imprudente de antimicrobianos (Bragg et al., 2018), esforços recentes para mitigar o rápido aumento de resistência têm enfatizado reduzir o uso dessas drogas (Nobrega et al., 2018).

Em vista desse problema, medicamentos alternativos, seguros, eficazes e com menos efeitos colaterais são necessários no controle da mastite (Yadav et al., 2020). Dentro desse contexto, torna-se cada vez mais necessário a pesquisa de propriedades antimicrobianas entre os recursos naturais renováveis, como em plantas, que fornecem matéria-prima vegetal enriquecida de substâncias que podem ser utilizadas para fins terapêuticos (Wiest et al., 2009). Dessa forma, os óleos essenciais (OEs) apresentam-se como uma alternativa promissora no controle dos patógenos causadores da mastite bovina.

Os OEs são substâncias naturais, voláteis e complexas, caracterizadas por um forte odor, sendo produzidos durante o metabolismo secundário de plantas aromáticas (Machado e Junior, 2011). Podem ser sintetizados por todos os órgãos das plantas, como brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca de árvore e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Bakkali et al., 2008). Na natureza, esses metabólitos secundários estão diretamente envolvidos em mecanismos que permitem a adaptação do produtor ao seu meio. De fato, já foram reconhecidas diversas funções desses metabólitos, como a defesa contra herbívoros e microrganismos, a proteção contra raios UV, a atração de polinizadores e animais dispersores, bem como a participação em alelopatias (Simões et al., 2010).

Segundo Simões e colaboradores (2010), a origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e acetil-CoA (Figura 3). O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Já os derivados do acetil-CoA podem ser classificados, segundo a via metabólica seguida, em: derivados do acetato, via ciclo do ácido cítrico; derivados do acetato, via mevalonato; e produtos de condensação do acetato.

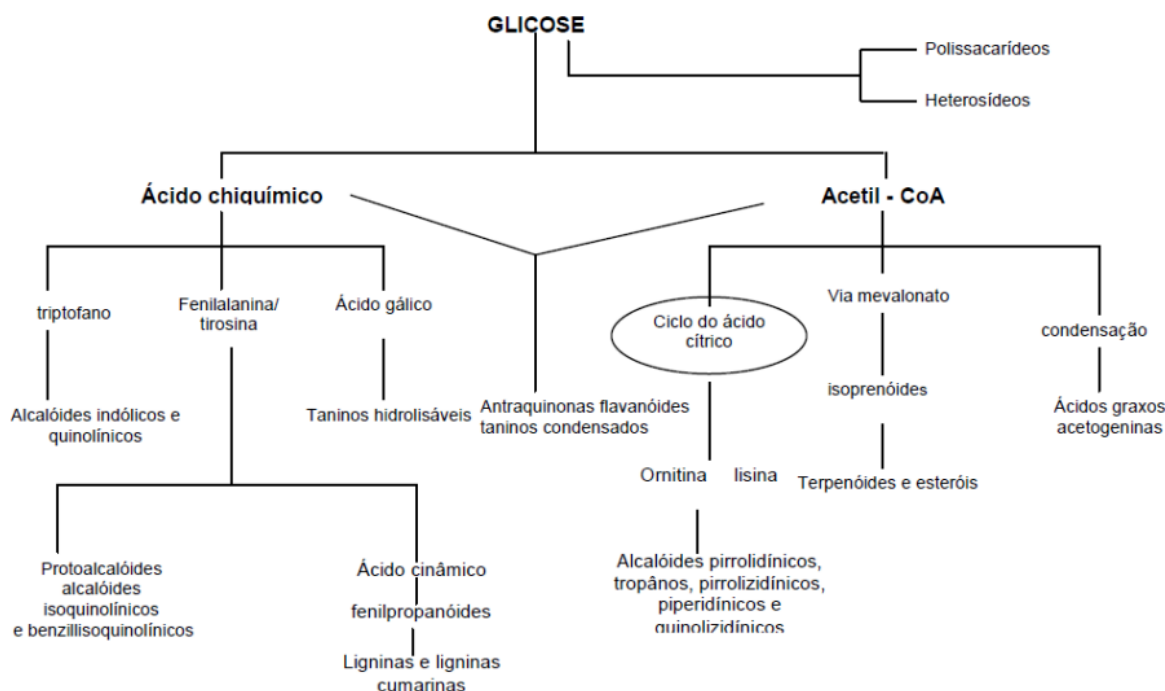


Figura 3 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (adaptado de Simões et al., 2010).

Quimicamente, a grande maioria dos OEs é constituída de derivados de fenilpropanóides e terpenóides, sendo que esses últimos preponderam (Simões et al., 2010). Os terpenóides são formados pela condensação de unidades de isopreno (C5) (Bakkali et al., 2008), sendo que a unidade isoprênica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico (Simões et al., 2010). Os esqueletos carbonados dos terpenóides possuem um número variável de unidades isoprênicas. Os principais terpenos são os monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), mas também existem hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (Bakkali et al., 2008). Nos OEs, as moléculas mais representativas são os monoterpenos (constituem cerca de 90% dos OEs) e os sesquiterpenos. Os monoterpenos podem ainda ser divididos em 3 subgrupos: acíclicos, monocíclicos e bicíclicos. Em cada um desses subgrupos, há ainda outras classificações: hidrocarbonetos insaturados, álcoois, aldeídos ou cetonas, lactonas e tropolonas. As variações estruturais dos sesquiterpenos são da mesma natureza que as precedentes, podendo ser acíclicos, monocíclicos ou lactonas sesquiterpênicas. Em cada um desses

subgrupos, classificam-se diversas substâncias, caracterizadas por inúmeros tipos diferentes de esqueleto (Simões et al., 2010).

Já os fenilpropanóides ocorrem com menos frequência nos OE (Bakkali et al., 2008). Eles se formam a partir do ácido chiquímico, que produz as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico. Esses últimos, por meio de reduções enzimáticas originam propenilbenzenos e/ou alibenzenos e, por meio de oxidações com degradação das cadeias laterais, geram aldeídos aromáticos. Ciclizações enzimáticas intramoleculares produzem cumarinas (Simões et al., 2010). As vias biossintéticas relativas aos terpenos e derivados fenilpropânicos geralmente são separadas nas plantas, mas podem coexistir (Bakkali et al., 2008).

Os OEs são misturas naturais complexas que podem conter uma quantidade variada de componentes em concentrações bastante diferentes. Eles são caracterizados por dois ou três compostos principais em concentrações razoavelmente altas (20-70%), denominados majoritários, em comparação com outros presentes em pequenas quantidades (Bakkali et al., 2008). Diversas propriedades vêm sendo atribuídas a esses componentes, como propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias, antivirais, antifúngicas, digestivas, coadjuvantes do sistema imune, entre tantos outros (Manion e Widder, 2017). Dentre essas atividades, a antibacteriana vem destacando-se por apresentar resultados promissores de amplo espectro, contra bactérias GP e GN (Shojaee-Aliabadi et al., 2017). De acordo com Burt (2004), considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos OEs, é mais provável que sua atividade antibacteriana não seja atribuível a um mecanismo específico, mas que haja vários alvos na célula. Os prováveis locais de ação dos OEs em uma célula bacteriana estão indicados na Figura 4.

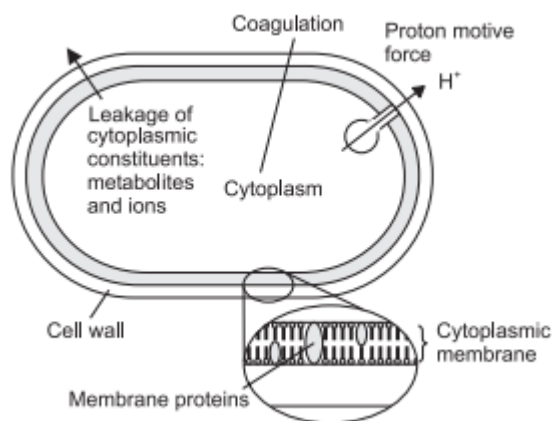


Figura 4 - Prováveis alvos dos OEs em uma célula bacteriana: degradação da parede celular; dano à membrana citoplasmática; dano às proteínas de membrana; vazamento do conteúdo celular; coagulação do citoplasma e depleção da força próton-motriz (adaptado de Burt, 2004).

Diversos OEs são classificados como geralmente considerado como seguro (Generally Regarded as Safe - GRAS) pelos especialistas da Associação de Fabricantes de Sabores e Extratos (Flavor and Extract Manufacturers Association - FEMA). A FEMA atua como o principal órgão independente que tem por objetivo avaliar a segurança de ingredientes aromatizantes. O procedimento para avaliar a segurança dessas substâncias conta com avaliação da composição química, estimativa de exposição e considerações de dados toxicológicos e bioquímicos (Cohen et al., 2019).

Por esse motivo, a utilização desses produtos naturais tem boa aceitação pelo mercado consumidor e surge como uma possibilidade de terapia alternativa para mastite bovina, pela atividade antibacteriana bem estabelecida e a classificação de muitos OEs como GRAS, sendo frequentemente considerados mais seguros para os animais, humanos e meio ambiente.

2.6.1.1 Capim-limão

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf é uma planta originária do sudoeste da Ásia (sul da Índia e Sri Lanka) (Aćimović et al., 2019), conhecida popularmente como capim-limão. É uma grama tropical perene com folhas finas e longas, pertencente à Família Poaceae (Boukhatem et al., 2014) e considerada uma das plantas medicinais mais importantes, cultivada principalmente por seu OE nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, América do Sul e África (Sahal et al., 2020).

O OE de capim-limão é classificado como GRAS (FDA, 2019) e é extraído por destilação a vapor das folhas secas ou frescas da planta (Boukhatem et al., 2014). No que se refere a sua composição, o OE de capim-limão apresenta o citral como componente principal, encontrado como uma combinação de formas isométricas, como geranial (α -citral) e neral (β -citral). Outros compostos como limoneno, citronelal, β -mirceno e geraniol também estão presentes em baixas concentrações (Bassolé et al., 2011; Boukhatem et al., 2014; Peichel et al., 2019; Sahal et al., 2020).

Múltiplas propriedades biológicas vêm sendo atribuídas ao OE de capim-limão, como atividades anti-inflamatórias, antidiabéticas, hipolipidêmicas, renoprotetoras e cardioprotetoras, além de atividades anticâncer (Aćimović et al., 2019). Estudos *in vivo* utilizando ratos evidenciaram o potencial do OE de capim-limão como agente antifúngico e anti-inflamatório para prevenção e tratamento de doenças inflamatórias agudas da pele (Boukhatem et al., 2014). Além dessas propriedades, também há relatos de forte atividade antibacteriana contra bactérias GP e GN (Bassolé et al., 2011; Aćimović et al., 2019) e da capacidade de inibição de biofilmes (Sahal et al., 2020).

2.6.1.2 Tomilho

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é um subarbusto perene pertencente à Família Lamiaceae, cultivado em todo o mundo (Mandal e DebMandal, 2016). É nativo do sul da

Europa, do Mediterrâneo ocidental ao sul da Itália (Hosseinzadeh et al., 2015) e é usado popularmente em infusões para tratamento de doenças respiratórias como resfriados, congestão, dor de garganta e infecções respiratórias inferiores, além de diabetes e infecções intestinais (Mohamad et al., 2020). Variações polimórficas na produção de monoterpenos são observadas no tomilho, classificando-o em quimiotipos denominados geraniol, α -terpineol, tujanol-4, linalol, carvacrol e timol, devido ao monoterpeno dominante (Mandal e DebMandal, 2016).

O OE de tomilho recebeu o status de GRAS (FDA, 2019), sendo recomendado principalmente para uso tópico, em vista de alguns efeitos adversos observados após sua ingestão (Mandal e DebMandal, 2016). Dentre as propriedades biológicas encontradas nesse OE, destacam-se as propriedades anti-inflamatórias, antivirais, antioxidantes, inseticidas, antifúngicas e antibacterianas (Reddy et al., 2014; Hosseinzadeh et al., 2015; Mandal e DebMandal, 2016).

O potencial antibacteriano e antioxidante do tomilho torna-o excelente candidato para uso como conservante de alimentos. Segundo Mandal e DebMandal (2016), o OE de *T. vulgaris* apresenta propriedades antibacterianas de amplo espectro contra bactérias deteriorantes de alimentos e aquelas relacionadas a intoxicações alimentares em humanos como *E. coli*, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *Salmonella enterica* sorovar Typhi, *Shigella flexneri*, *Bacillus cereus* e *S. aureus*.

2.6.1.3 Lavanda

Lavandula dentata L., conhecida popularmente como alfazema-brava, alfazema ou lavanda, é uma espécie de planta com flores da Família Lamiaceae, endêmicas da região do Mediterrâneo (Gonçalves e Romano, 2013). O OE de *L. dentata*, o qual é produzido em

tricomas glandulares especializados encontrados na superfície de folhas e flores (Gonçalves e Romano, 2013), tem sido amplamente produzido para atender a demanda das indústrias de perfumaria, farmacêutica e cosmética (Verma et al., 2010).

Na composição química do OE de lavanda há grande quantidade de 1,8-cineol e cânfora (Silva et al., 2017b; Silva-Flores et al., 2019). A presença destes monoterpenos oxigenados conferem ao OE propriedades medicinais e terapêuticas com ações antiespasmódica, antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, repelente e inseticida (Masetto et al., 2011).

Alguns estudos relataram potencial antibacteriano de amplo espectro no OE de *L. dentata* contra bactérias GP e GN. Dentre as espécies bacterianas que mostraram-se suscetíveis encontram-se *S. aureus*, *Streptococcus* spp.; *E. coli*, *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* (Prusinowska e Śmigielski, 2014; Bouazama et al., 2017; Justos et al., 2018). Embora *P. aeruginosa* tenha apresentado uma menor sensibilidade frente ao OE de lavanda, ainda assim foi possível verificar um efeito inibitório no seu crescimento quando concentrações maiores eram utilizadas (Bouazama et al., 2017; Justos et al., 2018).

2.6.1.4 Hortelã-menta

Mentha x piperita L., conhecida popularmente como hortelã-menta, é uma erva perene pertencente à Família Lamiaceae, apresentando-se amplamente distribuídas em todo o mundo, tendo como centro de origem a Europa meridional e a região do Mediterrâneo (Gasparin et al., 2014). Essa espécie, híbrida de *Mentha spicata* L. e *Mentha aquatica* L., é bastante conhecida por suas propriedades aromatizantes. As folhas de hortelã-pimenta

(frescas e secas) e seu OE são utilizados em muitos produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos (McKay e Blumberg, 2006).

A composição química do OE de hortelã-menta é bastante complexa e altamente variável (Grumezescu et al., 2012). No geral, o mentol (33 a 60%) e a mentona (15 a 32%) são os componentes mais abundantes e os de maior valor econômico (McKay e Blumberg, 2006; Pegoraro et al., 2010). Além desses, outros compostos como isomentona (2 a 8%), 1,8-cineol (5 a 13%), mentil-acetato (2 a 11%), mentofurano (1 a 10%), limoneno (1 a 7%), β -mirceno (0,1 a 1,7%), β -cariofileno (2 a 4%), pulegona (0,5 a 1,6%) e carvona (1%) são citados como constituintes do óleo (McKay e Blumberg, 2006).

Diversos estudos *in vitro* demonstraram capacidade antioxidante, antitumoral, antialérgica, antiviral, antibacteriana e fungicida no OE de hortelã-menta e em seus derivados (McKay e Blumberg, 2006). Já em modelos animais, há relatos que os mesmos beneficiam o funcionamento gastrointestinal (Hawthorn et al., 1988; Beesley et al., 1996), hepático (Wacheret al., 2002), cerebral (Umezu et al., 2001), além de apresentar potencial quimiopreventivo (Samarth et al., 2001; Samarth et al., 2002), imunomodulador (Arakawa e Osawa, 2000) e anestésico (Galeotti et al., 2001).

Em relação a atividade antibacteriana presente no OE de *M. piperita*, bons resultados foram encontrados (İşcan et al., 2002; Rasooli et al., 2010; Kizil et al., 2010; Geromini et al., 2012), além disso foi verificado uma potencialização do efeito antimicrobiano de antibióticos como clindamicina, ciprofloxacino, tetraciclina, gentamicina, penicilina e eritromicina sobre *S. aureus* após os discos de antibióticos serem tratados com OE, demonstrando potencial adjuvante de drogas convencionais (Grumezescu et al., 2012).

2.6.1.5 Eucalipto

O gênero *Eucalyptus*, nativo da Austrália, pertence à família Myrtaceae e compreende cerca de 900 espécies (Elaissi et al., 2012). Diversos representantes desse gênero são utilizados em plantações florestais em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo (Souza et al., 2004). No Brasil, a espécie *Eucalyptus grandis* é amplamente cultivada devido ao seu potencial produtivo e às características da madeira. Esta é empregada na produção de celulose e papel, painéis de fibra e aglomerado, combustível industrial e doméstico e produtos de serraria (Barreiros et al., 2007; Barbosa et al., 2016).

As folhas de eucalipto são bem conhecidas pelo alto teor de OE (cerca de 2,0%) (Lucia et al., 2009; Barbosa et al., 2016) e tradicionalmente utilizadas na medicina popular em inalações com a finalidade de tratar distúrbios do trato respiratório, como faringite, bronquite e sinusite (Elaissi et al., 2012).

Como descrito para outras espécies do gênero *Eucalyptus*, diferentes quimiotipos são relatados para *E. grandis*. É possível observar que plantas cultivadas em diferentes localizações apresentam quimiotipos distintos. Para *E. grandis* já foram relatados quimiotipos com os seguintes compostos majoritários: γ -terpineno, β -pineno, *o*-cimeno, α -pineno, *p*-cimeno, 1,8-cineol e α -terpinil acetato (Estanislau et al., 2001; Su et al., 2006; Batista-Pereira et al., 2006; Lucia et al., 2007; Barbosa et al., 2016).

Os estudos avaliando a atividades biológicas desta espécie já encontraram potencial inseticida (Batista-Pereira et al., 2006; Lucia et al., 2007; Lucia et al., 2009) e antifúngico (Su et al., 2006). Já os relatos de atividade antibacteriana são escassos e testados frente a poucos microrganismos (*E. coli*, *Salmonella choleraesuis*, *S. aureus*, *Klebsiella* spp. e *Streptococcus* spp.), porém foi possível observar um efeito inibitório do OE de *E. grandis*, principalmente contra bactérias GP (Estanislau et al., 2001, Soyingbe et al., 2013).

Como o setor madeireiro é bastante representativo no Brasil e no mundo, investigações para avaliar a destinação dos seus resíduos para produção de OE podem constituir uma boa oportunidade de negócios para as empresas envolvidas (Barbosa et al., 2016).

2.6.2 Extratos vegetais

Os extratos vegetais são preparações concentradas de várias composições e consistências possíveis (Gouvea et al., 2017). Para obtenção de extratos vegetais, é requerida a aplicação de técnicas de extração sólido-líquido, precedidos ou não de pré-tratamentos (Simões et al., 2010). Isso implica basicamente em duas etapas no processo de fabricação: a separação dos compostos específicos de um meio complexo com a utilização de um solvente; e a concentração, por eliminação mais ou menos completa dos solventes.

No caso da mastite bovina, alguns trabalhos foram realizados a fim de avaliar o efeito desses extratos vegetais frente a patógenos causadores desta enfermidade. Extratos aquosos e etanólicos de *Portulaca oleracea* L. e *Taraxacum mongolicum* mostraram alta atividade antibacteriana *in vitro* contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae*, sendo *E. coli* considerada a mais suscetível (Peng et al., 2014). Extratos metanólicos e aquosos *Cenchrus ciliaris* e *Coccinia grandis* foram efetivos contra esses mesmos microrganismos e também *Klebsiella pneumoniae*. Nesse último estudo, *S. aureus* foi o mais sensível à ambos os extratos (Muhamed Mubarack et al., 2011). Além desses, outros extratos vegetais como os extraídos de *Allium sativum*, *Alpinia zerumbet*, *Asteracantha longifolia*, *Bunium persicum*, *Cymbopogon nardus*, *Oryza sativa* e *Punica granatum*, mostraram efeitos promissores contra agentes da mastite bovina (Diaz et al., 2010; Muhamed Mubarack et al., 2012; Moreira et al., 2014; Castro et al., 2016; Amber et al., 2018).

A atividade do extrato aquoso de *Ocimum sanctum* (L) já foi confirmada *in vivo* através de aplicações intramamárias, elevando significativamente o conteúdo de neutrófilos, linfócitos e enzimas lisossômicas das células polimorfonucleares do leite (Mukherjee et al., 2005), favorecendo a imunidade da vaca.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana de diferentes óleos essenciais (capim-limão, tomilho, lavanda, eucalipto e hortelã-menta) frente a bactérias isoladas de vacas diagnosticadas com mastite em municípios da região da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar uma revisão bibliográfica sobre o uso de óleos essenciais e extratos vegetais contra bactérias causadoras da mastite bovina.
- Isolar e identificar os agentes causadores de mastite bovina em municípios da região da Serra Gaúcha.
- Determinar o perfil de resistência antimicrobiana *in vitro* desses isolados bacterianos.
- Avaliar a presença do gene *mecA* e seu homólogo *mecC* nos isolados pertencentes ao gênero *Staphylococcus*.
- Extrair e caracterizar os constituintes químicos dos óleos essenciais de capim-limão, tomilho, lavanda, eucalipto e hortelã-menta.
- Determinar a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos óleos essenciais sobre isolados com diferentes perfis de resistência antimicrobiana.

4 RESULTADOS

4.1 Capítulo I

Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis.

Artigo publicado eletronicamente na revista Research in Veterinary Science

Research in Veterinary Science 131 (2020) 186–193



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc



Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis

Tamiris Silva Lopes^a, Paula Scalabrin Fontoura^a, Alexandre Oliveira^a, Fábio Antunes Rizzo^b, Simone Silveira^a, André Felipe Streck^{a,*}



^a Diagnostic Laboratory of Veterinary Medicine, Biotechnology Institute, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Large Animal Clinic, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Antimicrobial
Essential oil
Mastitis
Pathogen
Plant extract

ABSTRACT

Bovine mastitis is the most important disease affecting dairy herds worldwide, causing direct impacts on farms' profitability and food safety issues. The prevention and treatment of this pathology is especially done through antimicrobials, but the increasing antimicrobial resistance of pathogens to this disease may affect the efficiency of conventional drugs. Besides, antimicrobials residues in milk and the environment are a potential threat to human health. Thereby, the use of plant extracts and essential oils may become promising alternatives for the control of bovine mastitis. Antimicrobial properties present in several plants are well described and plant extracts and essential oils are often considered safe to animals, humans and environment. This review summarizes the current problems encountered in the conventional treatment of mastitis, the possibilities of the use of plant extracts and essential oils as alternative agents for the control of these pathogens and the limitations found in the use of these plant derivatives. Finally, the perspectives to the use of plant extracts and essential oils for the treatment of bovine mastitis are presented.

Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis

Tamiris Silva Lopes^a, Paula Scalabrin Fontoura^a, Alexandre Oliveira^a; Fábio Antunes Rizzo^b, Simone Silveira^a and André Felipe Streck^a.

^a Diagnostic Laboratory of Veterinary Medicine, Biotechnology Institute, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

^b Large Animal Clinic, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT

Bovine mastitis is the most important disease affecting dairy herds worldwide, causing direct impacts on farms' profitability and food safety issues. The prevention and treatment of this pathology is especially done through antimicrobials, but the increasing antimicrobial resistance of pathogens to this disease may affect the efficiency of conventional drugs. Besides, antimicrobials residues in milk and the environment are a potential threat to human health. Thereby, the use of plant extracts and essential oils may become promising alternatives for the control of bovine mastitis. Antimicrobial properties present in several plants are well described and plant extracts and essential oils are often considered safe to animals, humans and environment. This review summarizes the current problems encountered in the conventional treatment of mastitis, the possibilities of the use of plant extracts and essential oils as alternative agents for the control of these pathogens and the limitations found in the use of these plant derivatives. Finally, the perspectives to the use of plant extracts and essential oils for the treatment of bovine mastitis are presented.

Keywords: antimicrobial;essential oil; mastitis;pathogen; plant extract.

HIGHLIGHTS

- Microbial resistance and antibiotic residues associated with dairy herds might be important public health concerns
- Plant extracts and essential oils may be promising alternatives for mastitis control
- There are still many issues to be explored regarding the use of plant extracts and essential oils for the development of associated biotechnology

1. Introduction

Milk is one of the most versatile products in the food industry. World milk production was 823 million tons in 2017 and it is expected to increase by 22% by 2027, largely led by developing countries (OECD, FAO, 2018). Beyond economic relevance, milk and dairy products are important to the human diet as sources of macro and micronutrients (Akin and Akin, 2018), providing calcium, potassium, vitamin D, proteins, fatty acids, riboflavins, vitamin B12 and phosphorus (Keast et al., 2013; O'Neil et al., 2018). According to Quann et al. (2015), the ingestion of these products is directly associated with an improved bone health, especially in children and adolescents, as also a reduced risk of cardiovascular disease, type 2 diabetes and high blood pressure in adults.

In order to obtain a high-quality milk, good udder health is not only important for the dairy farmer but also for the dairy production chain as a whole (Hogeveen et al., 2011). Further, increasing public awareness and regulatory attention directed toward food safety issues highlight the need for the dairy industry to proactively address and eliminate emerging food safety issues that may negatively impact the image of dairy products (Boor, 2001). Control of udder pathogens can reduce foodborne illnesses and provide consumers with safe, healthy and higher-quality food (Bajpai et al., 2013). As such, due to public health issues, as microbial resistance and antibiotic residues associated with dairy herds, animal agriculture must carefully examine how antimicrobials are used and adopt good

stewardship practices designed to reduce the risk of developing newly resistant bacteria that could be transmitted from animals to humans (Foutz et al., 2018).

The economic rise of the dairy market leads to studies to increase food security and ecologically sustainable production. From this perspective, the use of plant extracts and essential oils may represent a promising alternative to synthetic drugs. The aim of this review is to discuss the use of plant extracts and essential oils as alternatives for the control of mastitis in dairy cattle, with a focus on future trends and possible implications on the use of these products in the veterinary area.

2. Bovine mastitis and conventional treatment

Mastitis is the most expensive and prevalent disease in dairy cattle worldwide (Castelani et al., 2018), showing negative impact on both animal welfare and food security (Heikkilä et al., 2018). It is multifactorial, being influenced by several factors, including environment, management, udder physiology and cow health (Scott et al., 2011). The disease is characterized by inflammation of the mammary gland resulting in decreased milk production, which may be of short duration or extend to the end of the lactation period (Heikkilä et al., 2018). This decrease in production occurs due to the damage caused by the microorganisms in the mammary tissues, increasing the somatic cell count in the milk, as a consequence of the increase of leukocytes during infection and cell death.

According to the type of clinical manifestation, the disease has clinical and subclinical classification. In clinical mastitis, the infection is characterized by visible signs such as milk clots, hardness and swelling in the teats (Blowey and Edmondson, 2010), identified by visual investigation and palpation (Sadek et al., 2016). In the subclinical infection, there are no visible external changes (Blowey and Edmondson, 2010) and

diagnosis is done through auxiliary tests such as the *California Mastitis Test* (CMT) or by laboratory analysis of somatic cell counts (Sadek et al., 2016).

The etiological agents of mastitis are separated into two groups: contagious and environmental. Contagious pathogens usually live in the udder or teat skin and are transferred to the teat during milking, then grow and spread through the mammary gland. On the other hand, environmental agents survive in the cow's environment and enter the udder by propulsion through the teat canal (e.g. during milking, by capillary action, insertion of antibiotic tube for insertion of teat cannula) or by passive penetration of the teat canal immediately after milking (Scott et al., 2011). Although there are some divergences in the classification of these microorganisms and this list varies according to the author, they are usually grouped as contagious pathogens: non-aureus *Staphylococcus*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*; whereas the environmental agents more usual are: *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus uberis*, yeasts and molds (Blowey and Edmondson, 2010). Due to its ability to provide a wide range of virulence factors that contribute to bacterial invasion, *Staphylococcus aureus* is still considered one of the most common etiologic agents (Saei et al., 2012; Marques et al., 2017) and can be associated with subclinical, acute, chronic, and toxic cases of bovine intramammary infections, leading to considerable financial losses (Käppeli et al., 2019).

Antimicrobial agents have been used for many years in animal husbandry mostly for treatment and also for animal production purposes. In certain cases, antimicrobials are used for prophylaxis (EMA, EFSA, 2017). In dairy cattle, antimicrobials are largely used to treat mastitis in two different stages: therapy during the lactating phase and dry cow therapy (Blowey and Edmondson, 2010). A prolonged milk discard is required when antimicrobials

are used during the lactation phase, because the risk of drug residues is high, representing a potential threat to human health. These residues could be dangerous to consumers hypersensitive to antimicrobials, can promote microbial resistance and interfere with the manufacturing processes of milk derivatives (Blowey and Edmondson, 2010). On the other hand, dry cow therapy consists of drying all mammary quarters followed by the intramammary application of long-lasting antimicrobials. It is an important component of mastitis control programs, whose aim is to eliminate and to avoid the existing intramammary infections and the development of new cases during the dry period. However, due to the increase in cases of microbial resistance, prophylactic use of antimicrobials in livestock has been rethought in many countries (Derakhshani et al., 2018).

The use of antimicrobial drugs is an emerging concern to consumers and public health authorities. There is a need for additional research to define the appropriate use of antimicrobials that unify animal welfare with social concerns on antimicrobial resistance (Ruegg, 2017). Therefore, it is extremely important to isolate and identify these agents and to determine the antimicrobial susceptibility (Freitas et al., 2018). However, *in vitro* activity does not ensure *in vivo* efficacy because the bovine mammary gland is a difficult target and the penetration of substances when administered parenterally or intramammary depends on pharmacokinetic characteristics of the drug (Pyörälä, 2009).

In recent years, several studies indicated that mastitis pathogens are becoming resistant to antimicrobials and the cure rates of conventional treatments are low (Freitas et al., 2018). The mechanisms used by bacteria to become resistant are very versatile, influenced by the following conditions: (i) whether there are resistant variants in a population, (ii) whether differential reproductive success is experienced in the presence of

antibiotics, and (iii) whether the variation is hereditary. In these cases, population composition will change over time in favor of resistant variants (Baquero, 2011).

Staphylococcus aureus is often considered the most important microorganism associated with mastitis. Intramammary infections caused by this pathogen are difficult to cure and are particularly challenging, as they are prone to chronicity and resurgence (Peton and Le Loir, 2014). Strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) of animal origin have been reported in humans, and the epidemiology of this transfer has not yet been clarified (Juhász-Kaszanyitzky et al., 2007). Methicillin resistance is caused by *mecA* gene, which encodes for penicillin-binding protein 2a with decreased affinity for β -lactams antibiotics. MRSA should be considered resistant to all penicillins, cephalosporins, cepheids and other β -lactams such as ampicillin-sulbactam, amoxicillin-clavulanic acid, ticarcillin-clavulanic acid, piperacillin-tazobactam and carbapenems, regardless of the *in vitro* test results obtained with those agents (CLSI, 1997). These organisms are also frequently resistant to most of the commonly used antimicrobial agents, including the aminoglycosides, macrolides, chloramphenicol, tetracycline and fluoroquinolones (CLSI 2006; Türkyılmaz et al., 2010).

According to Munita and Arias (2016), bacteria have developed complex strategies to circumvent the antibiotic attack and to survive, in a process likely accelerated by the increased use of antimicrobials. Antibiotic resistance has become one of the greatest public health threats of the 21st century. This scenario has been worsened by a shortage of research and development on new antimicrobials. A complete understanding of the mechanisms by which bacteria become resistant to antibiotics is important to design novel strategies to counter this threat. Therefore, efforts to develop antimicrobials and to study mechanisms of resistance should be continuous in order to minimize the problem.

3. Plant extracts and essential oils

Some plants could be used for therapeutic purposes, also known as medicinal plants. These plants contain chemical compounds with biological properties that are considered beneficial to human or animal health (Paz et al., 2018). Recent positive empirical observations from use of medicinal plants have provided the impetus for research into these bioactive substances and potential for new products that may be developed.

All plants produce primary metabolites, which exert essential functions for their survival, such as amino acids, fatty acids, carbohydrates and organic acids (Tian et al., 2018). On the other hand, secondary metabolites are present at a lower concentration and are usually important for the plant's defenses (e.g. leading to the formation of bitter, detergent, toxic or pungent substances), protecting them against most herbivores, microorganisms and also acting on other plants that compete directly for resources.

These metabolites could be obtained through extracts of plants, which are preparations of various compositions and consistencies (Gouvea et al., 2017), which aim to recover and purify active ingredients from plant materials (Tan et al., 2013). General techniques to obtain those extracts include maceration, infusion, percolation, digestion, decoction, hot continuous extraction (Soxhlet), aqueous-alcoholic extraction by fermentation, countercurrent extraction, microwave extraction, ultrasonic extraction, extraction with supercritical fluid and distillation techniques (Pandey and Tripathi, 2014).

The hot continuous extraction process (known as Soxhlet, Figure 1a) is one of the more traditional methods based on extraction with organic solvents, in which the sample is placed in contact with the solvent at a relatively high temperature (Ghaderi and Ebrahimi, 2015). During the process, the solvents diffuse into the solid plant material and solubilize the compounds with similar polarity (Pandey and Tripathi, 2014), followed by removal operations. Ultrasonic assisted extraction also uses solvents and is a good method compared

to more traditional approaches, due to high efficiency, need for lower solvent volumes and shorter extraction time (Macías-Sánchez et al., 2009). On the other hand, the supercritical fluid extraction is another procedure widely applied, which uses supercritical fluids (temperature and pressure above the critical point) and presents advantages such as greater selectivity and milder temperatures, thus avoiding thermal degradation and residual solvents. One of the most serious drawbacks of supercritical fluids extraction is the higher equipment costs required compared to the traditional solvent extraction process (Yen et al., 2015).

Essential oils are aromatic and lipophilic oily liquids, consisting of a mixture of low molecular weight volatile compounds (Gouvea et al., 2017), which are classified into two chemical groups: terpenoids (monoterpenoids and sesquiterpenoids) and phenylpropanoids. These two groups originate from different precursors of primary metabolism and are synthesized through separate metabolic pathways (Calsamiglia et al., 2007). Steam distillation (see Figure 1b) is the most commonly used method for producing essential oils on a commercial basis (Burt, 2004). In this technique, water vapor crosses the tissues of the plant material, carrying with it the volatile aromatic substances contained within the glands secreting the raw material. When the condenser is reached, it forms a heterogeneous biphasic solution (hydrolate + oil). Subsequently, the solution is separated, resulting in essential oil and hydrolate (by-product).

An essential oil may contain from 20 to 60 components at quite different concentrations, with two or three major components in high concentrations (20-70%) compared to other components present in trace amounts (Bakkali et al., 2008). According to Burt (2004), there are evidences that the compounds present in smaller quantities in an essential oil play a fundamental role in the antimicrobial action together with the major

components. These combined compounds may in some cases have a greater activity than when added separately, exhibiting a synergistic effect (Gouvea et al., 2017).

Several properties have been demonstrated in extracts and essential oils, such as antimicrobial, antioxidant, insecticide and anticancer activity (Oh et al., 2016; Fekrazad et al., 2017; Seixas et al., 2018). However, the mechanism of action of most extracts and essential oils was not completely elucidated (Gouvea et al., 2017). Antimicrobial activity, for example, is attributed to various secondary plant metabolites, among them geranyl acetate, eugenyl acetate, trans-cinnamaldehyde, menthol, carvacrol, thymol, geraniol, eugenol, p-cymene, limonene, terpinene and carvone (Burt, 2004).

The plant extracts and essential oils act on the bacterial cell probably by promoting cell wall degradation, cytoplasmic membrane damage, damage to membrane proteins, leakage of cellular content, coagulation of the cytoplasm and destabilization of the proton motive force (Burt, 2004). The lipophilicity of the components plays an important role in the penetration of the lipid layer of the bacterial cell membrane, leading to loss of integrity and structural organization (Aiemsraad et al., 2011). These activities are also dependent on the characteristics of the microorganisms tested (Chouhan et al., 2017). As an example, Gram-positive bacteria are more susceptible to essential oils than Gram-negative ones, possibly because the latter have a thick layer of lipopolysaccharides in the outside membrane that covers the cell wall (Zhang et al., 2016), limiting the diffusion of hydrophobic compounds.

3.1. Use of plant extracts and essential oils as alternative treatments of bovine mastitis

To address the concern related to bacterial resistance due to the constant use of antibiotics in dairy herds, research on alternative treatments is on the rise. These treatments mainly use plant extracts and essential oils and have been shown to be promising in

controlling mastitis-causing pathogens at least *in vitro*. The natural origin, lower side effects (Kher et al., 2018) and low resistance after prolonged exposure (Montironi et al., 2016) compared to conventional drugs promote a great advantage for these compounds. In fact, many studies have confirmed the efficacy of these plant derivatives, such as the ethyl acetate extract of *Terminalia chebula* (Kher et al., 2018). This extract displayed a broad-spectrum antimicrobial activity against all bacterial isolates of milk samples from cows with subclinical mastitis and it was as effective as amoxicillin (100 µg/mL) on the microorganisms at 500 µg/mL. Another good result was found with the ethanolic extract of *Sanguisorba officinalis* L., traditionally used in the Chinese medicine, that was able to inhibit the biofilms formation of MRSA (Chen et al., 2015). To obtain a better view of the subject, the studies using plant extracts and essential oils against bovine mastitis microorganisms were summarized in Table 1.

Most studies using these techniques against bovine mastitis have focused on *S. aureus*. This bacteria is considered a main pathogen of bovine mastitis and it is difficult to control, in part because of the resistance to antibiotics observed in some strains. Plant extracts, essential oils and isolated compounds appear to act independently of antimicrobial resistance mechanisms, validating them as alternative candidates to be considered in mastitis treatments (Dal Pozzo et al., 2011). In addition, these plant derivatives were able to negatively affect the biofilms formation (Montironi et al., 2016; Cerioli et al., 2018). Biofilms are complex bacterial structures linked to polysaccharides or proteins, they provide many benefits to the bacteria such as: facilitate adhesion and multiplication; confer resistance to phagocytosis, antimicrobial agents and disinfectants, due to low diffusion through the matrix and alteration of cellular metabolism (Budri et al., 2015).

Intriguingly, most investigations observed lower antimicrobial effect against the isolates by using isolated compounds instead of essential oils (Aiemsard et al, 2011;

Montironi et al., 2016; Cerioli et al., 2018). This suggests that the main active components may not be the only factors responsible for the inherent activity of the essential oils and the interactions among them and secondary constituents are also important (Chouhan et al., 2017). Possibly the loss of activity after isolation, chemical instability, difficulty in purification and the possibility of acting on multiple targets at one time are among the reasons for the synergism among different compounds of complex mixtures to be more effective (Zorzi et al., 2015).

Some plants have already demonstrated their efficacy *in vivo*, such as *Ocimum sanctum* (L), whose aqueous extract applied through intramammary infusions increased significantly neutrophils, lymphocytes and lysosomal enzymes contents of the milk polymorphonuclear cells (Mukherjee et al., 2005), thus enhancing the mammary immunity. The administration of leaf powder at 600 mg/kg body weight daily (P.O.) for 7 days significantly reduced somatic cell count and ceruloplasmin concentration, decreasing udder inflammation, and showed immunomodulatory effects in cows with subclinical mastitis (Shafi et al., 2016). Intramammary infusions with hydromethanolic extract of *Azadirachta indica* also showed anti-inflammatory, antibacterial and immunomodulatory potential (De and Mukherjee, 2009).

Abboud et al. (2015) observed, in an *in vivo* study, a strong antibacterial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* against *Staphylococcus* sp. and *Streptococcus* sp. Besides, an intramammary application of these oils (10% solution in methanol) and of mixture of them caused a drastic decrease in bacterial count in the different samples of milk after 4 consecutive days of treatments. The stronger antibacterial activity was achieved by external application of these oils in vaseline with a rate of recovery of 100% with thymus essential oils. Reshi et al. (2017) also demonstrated the antibacterial activity of herbal extracts carried by intramammary infusion of aqueous

extracts (*Fumaria indica*, *Nepata cataria* and *Adiantum capillus*) in cows affected with subclinical mastitis, at a dosage of 750 mg/tube for 5 days. A significant improvement was observed after treatment with all extracts. Notwithstanding, the highest clinical recovery was reported in cows treated with *Fumaria indica* and *Adiantum capillus*. Those results summarize the potential and versatility of the biologically active principles present in some plants, which could be used as antimicrobials or as adjuvants in the control of bovine mastitis.

4. Obstacles in the use of plant extracts and essential oils

There are some aspects that are considered limiting in the use of plant extracts and essential oils. Therefore, future studies should mainly address (i) industrial scale extraction methods, (ii) formulation of plant extracts or essential oils in concentrated and consistent products, and (iii) best practices for the use of such products (Isman et al 2017).

Foremost, the composition and biological activity of plant extracts and essential oils is strongly associated to the extraction process, type of solvent, phenotypic composition of the plant, storage conditions and type of pre-treatment (Burt, 2004; Andrade et al., 2017). Even external factors such as climate, soil, management and phenological stage can cause variations in the composition of secondary metabolites, responsible for their biological and therapeutic properties.

Moreover, for commercial scale production, access to a large amount of plant biomass is required, which may become another obstacle to the applicability of these alternative techniques. It is also necessary to deal with the lack of an internationally standardized technique to evaluate the antimicrobial activity of plant extracts and essential oils in order to validate comparisons (Dal Pozzo et al., 2011), because different methods could have a high influence on the results obtained.

The toxicology and action of these plant derivatives also need to be studied in detail (Amber et al., 2018). Because of their possible adverse effects, laws and regulations to control the use of vegetable derivatives became a significant responsibility for these lawmaker organizations (Ismail et al., 2017). Other aspects that should be taken into account are the impact of cow's immune system and of some milk ingredients, such as casein, in the efficacy of these alternative antimicrobial agents (Abboud et al., 2015).

Although there are numerous articles discussing the potential of natural compounds as alternatives to antimicrobials in animal production, only a limited number of studies provide robust scientific evidence. Because only in a few cases the agent used is reported in more than one research and clinical assays are scarce or provide few data demonstrating efficacy, according the authorization guidelines, as veterinary medicinal products (EMA, EFSA, 2017).

5. Future perspectives

Unfortunately, there are still many barriers regarding the use of plant extracts and essential oils, which reduce their applicability in the industry. Among the available resources, nanotechnology techniques can provide effective tools to overcome many of these difficulties (Campos et al., 2018), emerging as promising possibilities for the development of new antimicrobial agents (Castelani et al., 2018).

Recent studies have demonstrated that encapsulation in nanometric particles is one of the most efficient methods for the formulation of bioactive oils, presenting a significant antimicrobial effect against multiresistant pathogens by potentiation of activity due to increased chemical stability and solubility, decreased evaporation and degradation of the active components, besides controlled and sustained release, increasing bioavailability (Chouhan et al., 2017). The reduced size of the particles increases the interactions between

the active compounds and biological membranes, facilitating the transfer through them (Moghimi et al., 2016) and interaction with the microorganisms (Chouhan et al., 2017). Moreover, when the active ingredients stay within the nanocapsules, they remain protected from oxidizing agents, enzymes or even chemical interaction with other molecules, a particularly relevant feature in the case of products intended for the treatment of bovine mastitis, since in inflammatory processes of the mammary gland there are a number of physico-chemical changes that often interfere with the action of drugs (Troncarelli et al., 2013).

Another emerging technique is based on therapeutic combinations of non-traditional agents with conventional antimicrobials to obtain better effectiveness against infections and to avoid resistance to the usual medications (D'Arrigo et al., 2010). In this context, plant extracts and essential oils are considered appropriate alternatives with well-known antibacterial activities, being able to act synergistically with validated drugs and possessing new mechanisms of action (Zengin et al., 2018). Pharmacodynamic interactions between essential oil of *Melaleuca armillaris* and cloxacillin against *S. aureus* isolated from cows with subclinical mastitis have been reported. A marked decrease of the concentration of antibiotic necessary to inhibit bacterial growth was observed when in the presence of oil (Buldain et al., 2018). Furthermore, the synergism among different essential oils could be exploited in order to maximize antibacterial activity and minimize concentrations needed to achieve the expected effect (Burt, 2004).

A global trend towards more ecological management of farm animals is currently motivated by a better consumer acceptance and public health concerns. In the case of bovine mastitis, there is an immediate need for alternative treatments due to high levels of antibiotic resistance in pathogens. Plant derivatives are promising sources of new

antimicrobial agents, proving to be efficient *in vitro* and in some cases *in vivo*, against resistant microorganisms and are considered safer for animals, plants and the environment.

Declarations of interest

None.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) for their financial support, finance code 001.

References

1. Abaineh, D., Sintayehu, A., 2001. Treatment trial of subclinical mastitis with the herb *Persicaria senegalence* (Polygonaceae). Trop. Anim. Health. Prod. 33,511–519.
2. Abboud, M., El Rammouz, R., Jammal, B., Sleiman, M., 2015. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of two essential oils *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* against bovine *Staphylococcus* and *Streptococcus* mastitis pathogen. Middle East. J. Agric. Res. 4, 975–983.
3. Aiensaard, J., Aiumlamai, S., Aromdee, C., Taweechaisupapong, S., Khunkitti, W., 2011. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. Res. Vet. Sci. 91,e31–e37.
4. Akin, I., Akin, T., 2018. Economic impact of digital dermatitis treatment on a dairy farm: an application of the break-even analysis. Cienc. Rural. 48, e20170791.

5. Amber, R., Adnan, M., Tariq, A., Khan, S.N., Mussarat, S., Hashem, A., Al-Huail, A.A., Al-Arjani, A.F., 2018. Antibacterial activity of selected medicinal plants of northwest Pakistan traditionally used against mastitis in livestock. *Saudi J. Biol. Sci.* 25, 154–161.
6. Andrade, K.S., Poncelet, D., Ferreira, S.R.S., 2017. Sustainable extraction and encapsulation of pink pepper oil. *J. Food Eng.* 204, 38–45.
7. Bajpai, V.K., Sharma, A., Baek, K.H., 2013. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control* 32, 582–590.
8. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.
9. Baquero, F., 2011. The 2010 Garrod Lecture: the dimensions of evolution in antibiotic resistance: *ex unibus plurum et ex pluribus unum*. *J. Antimicrob. Chemothe.* 66, 1659–1672.
10. Blowey, R., Edmondson, P., 2010. *Mastitis Control in Dairy Herds*. second ed. Cabi, Wallingford.
11. Boor, K.J., 2001. Fluid dairy product quality and safety: Looking to the future. *J. Dairy Sci.* 84, 1–11.
12. Budri, P.E., Silva, N.C.C., Bonsaglia, E.C.R., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J.P., Doyama, J.T., Gonçalves, J.L., Santos, M.V., Fitzgerald-Hughes, D., Rall, V.L.M., 2015. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *J. Dairy Sci.* 98, 5899–5904.

13. Buldain, D., Buchamer, A.V., Marchetti, M.L., Aliverti, F., Bandoni, A., Mestorino, N., 2018. Combination of cloxacillin and essential oil of *Melaleuca armillaris* as an alternative against *Staphylococcus aureus*. *Front. Vet. Sci.* 5,177.
14. Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94,223–253.
15. Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., Ferret, A., 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90, 2580–2595.
16. Campos, E.V.R., Proença, P.L.F., Oliveira, J.L., Bakshic, M., Abhilashc, P.C., Fracetoa, L.F. 2018. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. *Ecol. Indic.* 1–13.
17. Castelani, L., Arcaro, J.R.P., Braga, J.E.P., Bosso, A.S., Moura, Q., Esposito, F., Sauter, I.P., Cortez, M., Lincopan, N., 2018. Short communication: Activity of nisin, lipid bilayer fragments and cationic nisin-lipid nanoparticles against multidrug-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 102, 678–683.
18. Castro, K.N. de C., Lima, D.F., Vasconcelos, L.C., Santos, R.C., Pereira, A.M.L., Fogaça, F.H. dos S., Canuto, K.M., Brito, E.S. de, Calvet, R.M., 2016. Composição química e eficácia do óleo essencial e do extrato etanólico de *Alpinia zerumbet* sobre *Staphylococcus aureus*. *Arq. Inst. Biol.* 83, 1–7.
19. Cerioli, M.F., Moliva, M.V., Cariddi, L.N., Reinoso, E.B., 2018. Effect of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling and limonene on biofilm production in pathogens causing bovine mastitis. *Front. Vet. Sci.* 5, 146.
20. Chen, X., Shang, F., Meng, Y., Li, L., Cui, Y., Zhang, M., Qi, K., Xue, T., 2015. Ethanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. inhibits biofilm formation of

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an ica-dependent manner. J. Dairy Sci. 98,1–6.
21. Chouhan, S., Sharma, K., Guleria, S., 2017. Antimicrobial activity of some essential oils — Present status and future perspectives. Medicines 4, 1–21.
 22. [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute, 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standards – Fourth Edition. CLSI document M7-A4. CLSI, Wayne, PA.
 23. [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S16. CLSI, Wayne, PA.
 24. Dal Pozzo, M., Santurio, D.F., Rossatto, L., Vargas, A.C., Alves, S.H., Loreto, E.S., Viegas, J., 2011. Activity of essential oils from spices against *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 63, 1229–1232.
 25. D’Arrigo, M., Ginestra, G., Mandalari, G., Furneri, P.M., Bisignano, G., 2010. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Phytomedicine 17, 317–322.
 26. De, U.K., Mukherjee, R., 2009. Expression of cytokines and respiratory burst activity of milk cells in response to *Azadirachta indica* during bovine mastitis. Trop. Anim. Health Prod. 41, 189–197.
 27. Derakhshani, H., Plaizier, J.C., De Buck, J., Barkema, H.W., Khafipour, E., 2018. Composition of the teat canal and intramammary microbiota of dairy cows subjected to antimicrobial dry cow therapy and internal teat sealant. J. Dairy Sci. 101, 10191–10205.

28. Diaz, M.A.N., Rossi, C.C., Mendonça, V.R., Silva, D.M., Ribon, A. de O.B., Aguilar, A.P., Muñoz, G.D., 2010. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. Rev. Bras. Farmacogn. 2520, 724–728.
29. European Medicines Agency (EMA), European Food Safety Authority (EFSA), 2017. EMA and EFSA joint scientific opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). EFSA J 15.
30. Faria, M.J.M. de, Braga, C.A. da S.B., de Paula, J.R., André, M.C.D.P.B., Vaz, B.G., Carvalho, T.C. de, Romão, W., Costa, H.B. da, Conceição, E.C. da., 2017. Antimicrobial activity of *Copaifera* spp. against bacteria isolated from milk of cows with mastitis. Ciênc. Anim. Bras. 18, 1–14.
31. Fekrazad, R., Afzali, M., Pasban-Aliabadi, H., Esmacili-Mahani, S., Aminizadeh, M., Mostafavi, A., 2017. Cytotoxic effect of *Thymus caramanicus* Jalas on human oral epidermoid carcinoma KB cells. Braz. Dent. J. 28, 72–77.
32. Foutz, C.A., Godden, S.M., Bender, J.B., Diez-Gonzalez, F., Akhtar, M., Vatulin, A., 2018. Exposure to antimicrobials through the milk diet or systemic therapy is associated with a transient increase in antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* of dairy calves. J. Dairy Sci. 101, 10126–10141.
33. Fratini, F., Casella, S., Leonardi, M., Pisseri, F., Ebani, V.V., Pistelli, L., Pistelli, L., 2014. Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. Fitoterapia 96, 1–7.
34. Freitas, C.H., Mendes, J.F., Villarreal, P.V., Santos, P.R., Gonçalves, C.L., Gonzales, H.L., Nascente, P.S., 2018. Identification and antimicrobial susceptibility

- profile of bacteria causing bovine mastitis from dairy farms in Pelotas, Rio Grande do Sul. *Braz. J. Biol.* 78, 661–666.
35. Ghaderi, A., Ebrahimi, B., 2015. Soxhlet extraction and gas chromatography mass spectrometry analysis of extracted oil from *Pistacia atlantica kurdica* Nuts and optimization of process using factorial design of experiments. *Sci. J. Analyt. Chem.* 3, 122–126.
36. Gonçalves, C.L., Schiavon, D.B.A., Mota, F.V., Faccin, A., Schubert, R.N., Schiedeck, G., Schuch, L.F.D., 2013. Actividad antibacteriana de los extractos de *Cymbopogon citratus*, *Elionuru* ssp. y *Tagetes minuta* contra bacterias que causan mastitis. *Rev. Cubana Plant. Med.* 18, 487–494.
37. Gouvea, F. dos S., Rosenthal, A., Ferreira, E.H. da R., 2017. Plant extract and essential oils added as antimicrobials to cheeses: a review. *Cienc. Rural* 47, e20160908.
38. Heikkilä, A.M., Liski, E., Pyörälä, S., Taponen, S., 2018. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 101, 9493–9504.
39. Hogeveen, H., Huijps, K., Lam, T.J.G.M., 2011. Economic aspects of mastitis: New developments. *N. Z. Vet. J.* 59, 16–23.
40. Ismail, E., Khaneghah, A.M., Akbariirad, H., 2017. Global regulation of essential oils. In: *Essential Oils in Food Processing*, first ed. Wiley-Blackwell, New Jersey, pp. 327–338.
41. Isman, M.B., 2017. Bridging the gap: Moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. *Ind. Crops Prod.* 110, 10–14.

42. Juhász-Kaszanyitzky, É., Jánosi, S., Somogyi, P., Dán, Á., Bloois, L. van der G., Duijkeren, E. van, Wagenaar, J.A., 2007. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 630–632.
43. Käppeli, N., Morach, M., Corti, S., Eicher, C., Stephan, R., Johler, S., 2019. *Staphylococcus aureus* related to bovine mastitis in Switzerland: Clonal diversity, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of isolates collected throughout 2017. *J. Dairy Sci.* 102, 3274–3281.
44. Keast, D.R., Fulgoni, V.L.III, Nicklas, T.A., O'Neil, C.E. 2013. Food sources of energy and nutrients among children in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2006. *Nutrients* 5, 283–301.
45. Kher, M.N., Sheth, N.R., Bhatt, V.D., 2018. *In vitro* antibacterial evaluation of *Terminalia chebula* as an alternative of antibiotics against bovine subclinical mastitis. *Anim. Biotechnol.* 1–8.
46. Macías-Sánchez, M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., Ossa, E.M. de la, Lubián, L.M., Montero, O., 2009. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophylls from *Dunaliella salina*. *Talanta* 77, 948–952.
47. Marques, V.F., Motta, C.C. da, Soares, B. da S., Melo, D.A. de, Coelho, S. de M. de O., Coelho, I. da S., Barbosa, H.S., Souza, M.M.S. de., 2017. Biofilm production and beta-lactam resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Braz. J. Microbiol.* 48, 118–124.
48. Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., McClements, D.J., 2016. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chem.* 194, 410–415.

49. Montironi, I.D., Cariddi, L.N., Reinoso, E.B., 2016. Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Rev. Argent. Microbiol.* 48, 210–216.
50. Moreira, G.M.B., Matsumoto, L.S., Silva, R.M.G., Domingues, P.F., Mello-Peixoto, E.C.T., 2014. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino. *Pesqui. Vet. Bras.* 34, 626–632.
51. Muhamed Mubarack, H., Doss, A., Dhanabalan, R., Venkataswamy, R., 2011. Activity of some selected medicinal plant extracts against bovine mastitis pathogens. *J. Anim. Vet. Adv.* 10, 738–741.
52. Muhamed Mubarack, H., Doss, A., Vijayasanthi, M., Venkataswamy, R., 2012. Antibacterial activity of some herbal extracts against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J. Pharm. Res.* 5, 2428–2430.
53. Mukherjee, R., Dash, P.K., Ram, G.C., 2005. Immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* (L) in bovine subclinical mastitis. *Res. Vet. Sci.* 79, 37–43.
54. Munita, J.M., Arias, C.A., 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* 4, 1–24.
55. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Food and Agriculture Organization (FAO), 2018. OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027. OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
56. Oh, N.S., Lee, J.Y., Joung, J.W., Kim, K.S., Shin, Y.K., Lee, K.W., Kim, S.H., Oh, S., Kim, Y., 2016. Microbiological characterization and functionality of set-type

- yogurt fermented with potential prebiotic substrates *Cudrania tricuspidata* and *Morus alba* L. leaf extracts. J. Dairy Sci. 99, 6014–6025.
57. O’Neil, C.E., Nicklas, T.A., Fulgoni III, V.L., 2018. Food sources of energy and nutrients of public health concern and nutrients to limit with a focus on milk and other dairy foods in children 2 to 18 years of age: National health and nutrition examination survey, 2011–2014. Nutrients 10, 1–37.
58. Pandey, A., Tripathi, S., 2014. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. J. Pharmacogn. Phytochem. 2, 115–119.
59. Paz, J.E.W., Contreras, C.R., Munguía, A.R., Aguilar, C.N., Inungaray, M.L.C., 2018. Phenolic content and antibacterial activity of extracts of *Hamelia patens* obtained by different extraction methods. Braz. J. Microbiol. 49, 656–661.
60. Peton, V., Le Loir, Y., 2014. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. Infect. Genet. Evol. 21, 602–615.
61. Pyörälä, S., 2009. Treatment of mastitis during lactation. Ir. Vet. J. 62, 40–44.
62. Quann, E.E., Fulgori III, V.L., Auestad, N., 2015. Consuming the daily recommended amounts of dairy products would reduce the prevalence of inadequate micronutrient intakes in the United States: diet modeling study based on NHANES 2007–2010. Nutr. J. 14, 1–11.
63. Reshi, I.A., Sarkar, T.K., Malik, H., Muhee, A., Shoukat, S., 2017. Efficacy of *Fumaria indica*, *Nepata cataria* and *Adiantum capillus* crude aqueous extracts in comparison to Cefuroxime in sub-clinical cases of bovine mastitis. Int. J. Livest. Res. 7, 100–107.
64. Ruegg, P.L., 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. J. Dairy Sci. 100,10381–10397.

65. Sadek, K., Saleh, E., Ayoub, M., 2016. Selective, reliable blood and milk biomarkers for diagnosing clinical and subclinical bovine mastitis. *Trop. Anim. Health Prod.* 49, 431–437.
66. Saei, H.D., 2012. *Coa* types and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis. *Comp. Clin. Path.* 21, 301–307.
67. Scott, P.R., Penny, C, D., Macrae, A.I., 2011. *Cattle Medicine*, first ed. Manson Publishing Ltd, London, pp. 216–218.
68. Seixas, P.T.L., Demuner, A.J., Alvarenga, E.S., Barbosa, L.C.A., Marques, A., Farias, E. de S., Picanço, M.C., 2018. Bioactivity of essential oils from *Artemisia* against *Diaphania hyalinata* and its selectivity to beneficial insects. *Sci. Agric.* 75, 519–525.
69. Shafi, T.A., Bansal, B.K., Gupta, D.K., Nayyar, S., 2016. Evaluation of immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* in bovine subclinical mastitis. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 40, 352–358.
70. Tan, M.C., Tan, C.P., Ho, C.W., 2013. Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. *Int. Food Res. J.* 20, 3117–3123.
71. Tian, M., Xu, X., Liu, F., Fan, X., Pan, S., 2018. Untargeted metabolomics reveals predominant alterations in primary metabolites of broccoli sprouts in response to pre-harvest selenium treatment. *Food Res. Int.* 111, 205–211.
72. Troncarelli, M.Z., Brandão, H. de M., Gern, J.C., Guimarães, A. de S., Langoni, H., 2013. Mastite bovina sob nano controle: A própolis nanoestruturada como nova perspectiva de tratamento para rebanhos leiteiros orgânicos. *Vet. e Zootec.* 20, 124–136.

73. Türkyılmaz, S., Tekbıyık, S., Oryasin, E., Bozdoğan, B., 2010. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses Public. Health* 57, 197–203.
74. Yen, H-W., Yang, S-C., Chen, C-H., Jesisca, Chang, J-S., 2015. Supercritical fluid extraction of valuable compounds from microalgal biomass. *Bioresour. Technol.* 184, 291–296.
75. Zeedan, G.S.G., Abdalhamed, A.M., Abdeen, E., Ottai, M.E., Abdel-Shafy, S., 2014. Evaluation of antibacterial effect of some Sinai medicinal plant extracts on bacteria isolated from bovine mastitis. *Vet. World* 7, 991–998.
76. Zengin, G., Menghini, L., Di Sotto, A., Mancinelli, R., Sisto, F., Carradori, S., Cesa, S., Franschetti, C., Filippi, A., Angiolella, L., Locatelli, M., Mannina, L., Ingallina, C., Puca, V., D’Antonio, M., Grande, R., 2018. Chromatographic analyses, *in vitro* biological activities, and cytotoxicity of *Cannabis sativa* L. essential oil: A multidisciplinary study. *Molecules* 23–3266.
77. Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., Quek, S., 2016. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control* 59, 282–289.
78. Zorzi, G.K., Carvalho, E.L.S., Poser, G.L. von, Teixeira, H.F., 2015. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. *Rev. Bras. Farmacogn.* 25, 426–436.

Figure caption

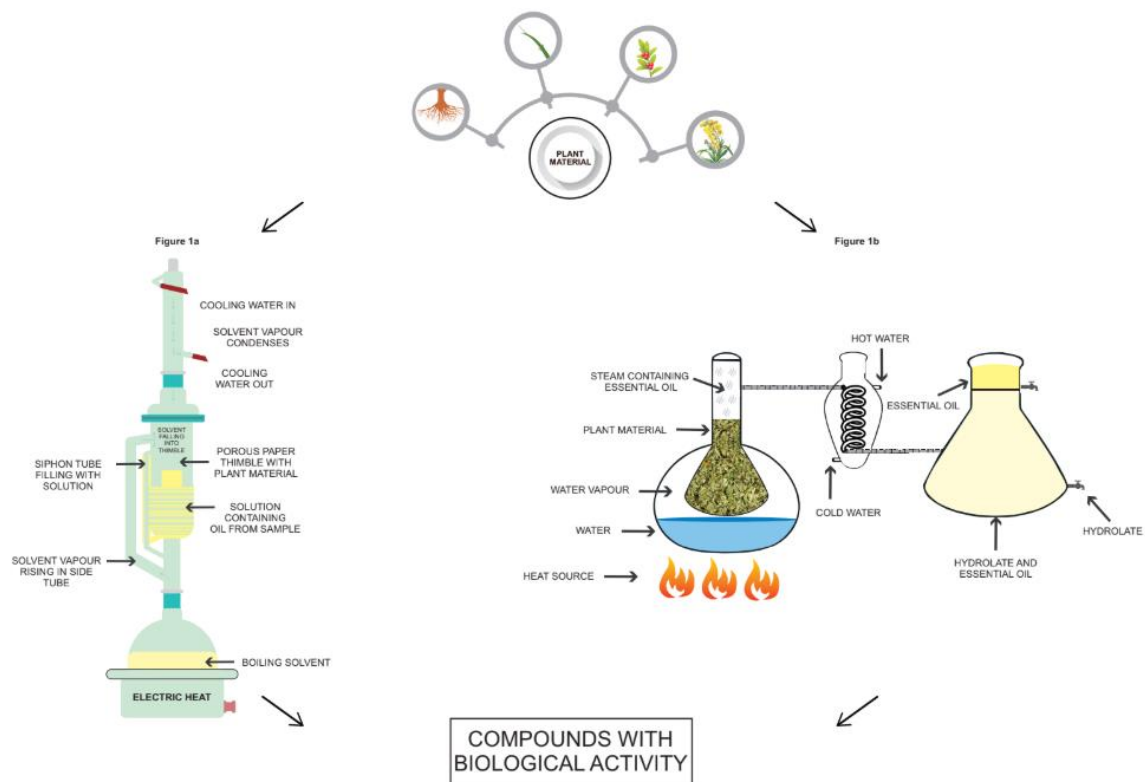


Figure 1. a) Soxhlet extraction, a classic technique for getting plant extracts. b) Steam distillation, a common technique to obtain essential oil.

Table 1

Activity of some plant extracts and essential oils against the microorganisms that cause bovine mastitis

Plant	Material	Microorganisms	Action	References
<i>Allium sativum</i> <i>Bunium persicum</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Triticum aestivum</i>	Methanolic extracts, alkaloids, flavonoids and saponins	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>A. sativum</i> showed strong zone of inhibition against all bacteria, followed by <i>B. persicum</i> , <i>T. aestivum</i> and <i>O. sativa</i> . The methanolic extracts and alkaloids presented the best results.	(Amberet et al., 2018)
<i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling	Essential oil and limonene	<i>E. coli</i> , <i>Bacillus pumilus</i> and <i>Enterococcus faecium</i>	Essential oil inhibited the growth of all isolates, while limonene had an inhibitory effect only on <i>B. pumilus</i> . Both agents affected the formation of biofilms.	(Cerioliet et al., 2018)
<i>Copaifera</i> spp.	Oleoresin and essential oil	Non-aureus staphylococci, <i>S. aureus</i> , <i>S. schleiferi schleiferi</i> , <i>S. hyicus</i> , <i>S. schleiferi coagulans</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., Group C, F, G <i>Streptococcus</i> and <i>E. coli</i> .	Oleoresin inhibited the growth in most strains, while essential oil showed low antimicrobial activity.	(Fariaet et al., 2017)
<i>Alpinia zerumbet</i>	Essential oil and ethanolic extract	<i>S. aureus</i>	The strains were extremely sensitive to essential oil at the concentration of 100 mg.mL ⁻¹ . At the same concentration, the strains were considered sensitive using the ethanolic extract.	(Castro et al., 2016)
<i>Minthostachys verticillata</i>	Essential oil and limonene	<i>Streptococcus uberis</i>	Essential oil had higher antibacterial activity than limonene. Both agents reduced the production of biofilms.	(Montironiet et al., 2016)
<i>Syzygium aromaticum</i> <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Essential oils and	<i>S. aureus</i>	The isolated compounds had lower MIC values, indicating a higher antibacterial activity. All agents affected biofilm formation.	(Budri et al., 2015)

	isolated compounds (eugenol and cinnamaldehyde)			
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> <i>Citrus bergamia</i> <i>Eucalyptus globulus</i> <i>Foeniculum vulgare</i> <i>Origanum majorana</i> <i>Origanum vulgare</i> <i>Rosmarinus officinalis</i> <i>Satureja montana</i> <i>Thymus vulgaris</i> L. ct. ¹ carvacrol <i>T. vulgaris</i> L. ct. thymol	Essential oils, isolated compounds and blends (thymol;p-cymene; carvacrol; <i>S. montana/T. vulgaris</i> ct. thymol; <i>S. montana/O. vulgare</i> ; carvacrol /thymol; carvacrol/thymol/ p-cymene)	<i>S. aureus</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. sciuri</i> and <i>E. coli</i>	Among the plant species, <i>S. montana</i> , <i>T. vulgaris</i> ct. thymol and <i>O. vulgare</i> presented the best results. The mixture <i>S. montana/T. vulgaris</i> ct. thymol exhibited the highest inhibitory activity against all bacterial strains.	(Fratini et al.,2014)
<i>Punica granatum</i>	Hydroalcoholic extract	<i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> and non-aureus staphylococci	<i>P. granatum</i> presented strong bacterial activity on all the isolates from the concentration 0.125 mg/mL ⁻¹ .	(Moreira et al., 2014)
<i>Jasonia montana</i> <i>Artemisia herb alba</i>	Methanol, petroleum ether, chloroform and acetone extracts	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp. and non-aureus staphylococci	The highest activity was observed with the acetone extract of <i>J. montana</i> on <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus</i> spp. and non-aureus staphylococci. <i>A. herb alba</i> had a moderate effect on Gram-positive bacteria. The extracts from both plants were less effective with the other solvents.	(Zeedan et al., 2014)
<i>Cymbopogon citratus</i> <i>Elionuru</i> ssp. <i>Tagetes minuta</i>	Essential oils and hydroalcoholic extracts	<i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> positive coagulase, <i>Staphylococcus</i> negative coagulase, <i>Streptococcus uberis</i> , <i>P. aeruginosa</i> and <i>E. coli</i>	All the plants have antimicrobial activity, and the essential oils showed more satisfactory results on all the bacteria.	(Gonçalves et al., 2013)
<i>Asteracantha longifolia</i> <i>Brachiaria</i> sp. <i>Trichodesma indicum</i> <i>Abutilon indicum</i>	Aqueous and methanol extracts	<i>S. aureus</i>	The methanolic extracts showed to be more effective than the aqueous ones. <i>A. longifolia</i> presented the highest inhibition halos and lower MIC.	(MuhamedMubarack et al., 2012)

<p><i>O. vulgare</i> <i>Thymus vulgaris</i> <i>Lippia graveolens</i> <i>R. officinalis</i> <i>Salvia officinalis</i> <i>Ocimum basilicum</i> <i>Zingiber officinale</i></p>	<p>Essential oils and isolated compounds (carvacrol, thymol and cineole)</p>	<p><i>Staphylococcus</i> spp.</p>	<p><i>Z. officinale</i>, <i>R. officinalis</i>, <i>O. basilicum</i>, <i>S. officinalis</i> and cineole did not show antibacterial activity at the concentrations tested. <i>O. vulgare</i>, <i>T. vulgaris</i> and <i>L. graveolens</i> were equally active, but less than carvacrol and thymol.</p>	<p>(Dal Pozzo et al., 2011)</p>
<p><i>C. citratus</i></p>	<p>Essential oil and isolated compounds (citral, geraniol and myrcene)</p>	<p><i>S. aureus</i>, <i>S. agalactiae</i>, <i>Bacillus cereus</i> and <i>E. coli</i></p>	<p><i>C. citratus</i> oil showed strong antimicrobial activity against all bacteria. Citral and geraniol were less effective, while myrcene did not show activity. Essential oil, citral and geraniol demonstrated an inhibitory effect on <i>S. aureus</i> biofilm formation.</p>	<p>(Aiemsaaed et al., 2011)</p>
<p><i>Brachiaria</i> sp. <i>Cenchrus ciliaris</i> <i>A. indicum</i> <i>Coccinia grandis</i></p>	<p>Methanolic and aqueous extracts</p>	<p><i>S. aureus</i>, <i>E. coli</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>Streptococcus agalactiae</i></p>	<p><i>C. ciliaris</i> and <i>C. grandis</i> showed significant antibacterial activity, while <i>A. indicum</i> and <i>Brachiaria</i> sp. showed moderate inhibition activity. The Best results were obtained using methanolic extracts.</p>	<p>(Muhamed Mubarak et al., 2011)</p>
<p><i>Artemisia absinthium</i> <i>Cymbopogon nardus</i> <i>Symphytum officinale</i> <i>Baccharis dracunculifolia</i> <i>Solanum asperolanatum</i> <i>S. officinalis</i> <i>Bauhinia forficata</i> <i>Calendula officinalis</i> <i>Chenopodium ambrosioides</i></p>	<p>Dichloromethane, n-hexane, ethanol/water and ethanol extracts</p>	<p><i>S. aureus</i></p>	<p><i>C. nardus</i> ethanol/water showed strong activity, while <i>S. macranthera</i> ethanol extract, <i>A. absinthium</i> dichloromethane extract and <i>B. dracunculifolia</i> ethanol/water showed moderate activity in <i>S. aureus</i> growth. These also affected biofilm formation. The other extracts did not show activity.</p>	<p>(Diaz et al., 2010)</p>
<p><i>Persicaria senegalense</i></p>	<p>Petroleum ether, acetone and methanol extracts. Leaf powder.</p>	<p><i>S. aureus</i>, <i>C. bovis</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>C. albicans</i></p>	<p>The three extracts showed activity against the microorganisms tested <i>in vitro</i>, but methanol was more efficient on all the isolates. Already <i>in vivo</i>, consumption of 0.77 kg leaf powder per day for 5 days resulted in a cure rate of 52.8%.</p>	<p>(Abainehand Sintayehu, 2001)</p>

¹ Chemotype

4.2 Capítulo II

**Identificação e resistência antimicrobiana *in vitro* de agentes causadores
de mastite em vacas leiteiras em municípios da serra gaúcha, Rio Grande do
Sul**

Manuscrito em elaboração que deverá ser enviado para a revista Brazilian Journal of
Microbiology após tradução ao idioma inglês

**Identificação e resistência antimicrobiana *in vitro* de agentes causadores
de mastite em vacas leiteiras em municípios da serra gaúcha, Rio Grande do
Sul**

Tamiris Silva Lopes, Caroline Fussieger, Simone Silveira, Fábio Antunes Rizzo, André
Felipe Streck

RESUMO

A mastite é considerada a enfermidade mais prevalente e que gera as maiores perdas econômicas para a indústria leiteira em todo mundo. Conhecer sobre suas etiologias e a resposta dessas ao tratamento disponível é fundamental para estabelecer um controle mais eficaz desta doença. O objetivo desse estudo foi caracterizar as espécies bacterianas presentes em casos de mastite em municípios da região da serra gaúcha, Rio Grande do Sul, assim como averiguar o perfil de resistência antimicrobiana genotípica e fenotípica desses patógenos. A maioria dos agentes causais da mastite foram classificados como *Staphylococcus* coagulase-negativa (65,8%), seguido de *Staphylococcus aureus* (17,1%). Os demais isolados foram identificados como pertencentes às espécies *Klebsiella variicola* (4,8%), *Streptococcus uberis* (4,8%), *Serratia marcescens* (2,4%), *Enterococcus faecalis* (2,4%) e *Staphylococcus pseudintermedius* (2,4%). Quanto à resistência antimicrobiana, foram detectadas elevadas taxas de resistência frente à penicilina (39,02%) e tetraciclina (34,14), além da presença de microrganismos multirresistentes. Apesar de não ter sido detectada a presença de *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRS), os altos percentuais de resistência no setor leiteiro preocupam devido ao prognóstico negativo dos animais e ao risco de transmissão de patógenos resistentes aos seres humanos.

Palavras-chave: Leite, saúde pública, suscetibilidade, úbere

Introdução

A mastite bovina é uma patologia caracterizada pela inflamação da glândula mamária, geralmente associada à presença de patógenos [1]. Pode ser dividida em mastite clínica e subclínica. A mastite clínica causa alterações visíveis no úbere como dor, aumento de vascularização, edema e temperatura elevada, além de alterações no leite, como a presença de grumos, mudanças na cor e aumento da contagem de células somáticas (CCS) [2]. Já a mastite subclínica não apresenta alterações físicas na glândula mamária, sendo sua principal alteração a composição química do leite [3] e a alta na CCS, estimada através de testes CMT (*California Mastitis Test*) ou calculada pelo método eletrônico fluorométrico [4].

A mastite é considerada a enfermidade mais prevalente e que gera as maiores perdas econômicas para a indústria leiteira em todo mundo, levando em consideração não somente o custo do tratamento, como também a queda na produção de leite, o leite descartado, serviços veterinários e despesas com manejo [5]. Embora haja divergências nessa classificação, os agentes da mastite são agrupados em ambientais, sendo os principais *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli*; ou contagiosos, como *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* [6,7]. Outros *Staphylococcus* spp., denominados *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN), têm sido tradicionalmente considerados patógenos oportunistas de menor importância por serem associados a casos leves de mastite [8,9]. No entanto, a relevância dos SCN vêm sendo reconsiderada em diversos países pela alta prevalência, com isolamento de espécies de origem ambiental ou do próprio úbere do animal, sendo associados principalmente à mastite subclínica [10,11].

As bactérias do gênero *Staphylococcus* merecem atenção especial não só pela sua alta prevalência em amostras de leites mastíticos [12,13,14,15] e seu perfil de resistência antimicrobiana, mas também pelo crescente aumento de MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). A resistência à meticilina é atribuído principalmente à aquisição de um elemento genético móvel, o cromossomo estafilocócico em cassete (SCC*mec*), que carrega o gene *mecA* ou a variante *mecC* recentemente descrita [16,17]. Os genes *mec* codificam uma proteína alterada de ligação à penicilina, essencial para a biossíntese da parede celular, que possui uma afinidade reduzida pelos antibióticos β-lactâmicos [17].

Os MRSA apresentam grande potencial patogênico e são resistentes à maioria dos tratamentos antimicrobianos, apresentando alta taxa de morbidade e mortalidade e sua transmissão através de alimentos é comum [12,18], além disso apresentam relevância no contexto hospitalar [19], sendo responsáveis pelo aparecimento de sinais clínicos crônicos que variam de lesões na pele à infecções sistêmicas [19], sendo também agentes etiológicos importantes em infecções de origem alimentar [20].

A proposta terapêutica para casos de mastite em geral se baseia no uso de antimicrobianos [21]. Contudo, falhas na identificação do agente causador, assim como o uso indiscriminado dessas drogas, levam a um aumento de resistência antimicrobiana e conseqüentemente, à baixa eficácia dos tratamentos [21,22]. Como exemplo, estudos já apontaram que bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas em propriedades leiteiras podem apresentar até 100% de resistência à trimetoprim [23], 66 - 95% de resistência à penicilina [23,24,25] e resultados de resistência variáveis para outros antimicrobianos.

Assim, o presente estudo teve como objetivo o isolamento e a identificação dos agentes causadores de mastite bovina em fazendas leiteiras situadas em municípios pertencentes à região da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul, além da determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana fenotípica e genotípica dos isolados.

Materiais e métodos

Coleta das amostras de leite

As amostras de leite foram coletadas de vacas leiteiras com mastite recorrente de diferentes idades e raças, oriundas de fazendas situadas nos municípios de Monte Belo do Sul, Nova Bassano, Nova Petrópolis e Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. Os tetos escolhidos para coleta apresentavam alterações visíveis no leite ou eram positivos ao teste CMT. A fim de realizar uma coleta estéril, os tetos coletados eram lavados, secos com papel toalha e desinfetados com álcool 70 [6]. Posteriormente, os três primeiros jatos de leite eram descartados e em seguida, dois a três jatos de leite eram coletados em frascos estéreis do tipo Falcon de 50 ml mantidos inclinados para evitar a entrada de sujidades. Após a coleta, o leite era imediatamente congelado e transportado ao laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária, situado na Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, em até 48 horas, para o diagnóstico bacteriológico (Anexo II). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Caxias do Sul, parecer 12/2018.

Cultivo bacteriológico

A cultura bacteriológica foi realizada seguindo as diretrizes descritas pelo National Mastitis Council [6]. De cada amostra de leite, 10 µL foram plaqueados em Ágar Sangue (Kasvi) e Ágar MacConkey (Kasvi). Após a semeadura, as placas foram incubadas em aerobiose a 37 ± 1 °C por 24 a 72 h. As amostras foram consideradas positivas quando uma ou mais colônias foram observadas. Quando três ou mais tipos distintos de colônias eram isoladas de uma mesma amostra, esta era considerada contaminada e o resultado desconsiderado.

A identificação preliminar das bactérias foi realizada de acordo com Quin et al. [26]. As colônias foram identificadas por sua aparência morfológica e atividade hemolítica, seguido de coloração de Gram e testes como catalase, coagulase, motilidade, fermentação de carboidratos, produção de indol, utilização de citrato, descarboxilação da lisina e produção de H₂S. Posteriormente, os isolados foram armazenados a -80°C em skim milk.

Identificação das bactérias por MALDI-TOF MS

A confirmação da identificação das bactérias foi realizada por Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) como previamente descrito por Nonnemman et al. [27]. O software Byotiper 4.0 foi utilizado para identificação dos perfis iônicos.

Caracterização fenotípica da suscetibilidade antimicrobiana

Para a determinação do perfil de suscetibilidade dos microrganismos foi utilizado o método de disco-difusão [28,29]. Em resumo, foram utilizadas culturas bacterianas crescidas em meio Ágar Sangue (Kasvi) com 24h de incubação a 37°C. Posteriormente, colônias puras selecionadas foram suspensas em solução salina 0,9% até a obtenção de uma turbidez correspondente a solução padrão de McFarland 0,5 ($\cong 10^8$ UFC/mL). A partir dessa suspensão, as amostras foram semeadas com *swabs* estéreis em Ágar Mueller-Hinton (Kasvi), o qual foi suplementado com 5% de sangue ovino quando necessário. Em seguida, os discos de antimicrobianos foram depositados sobre a superfície do meio e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica (37 \pm 1°C, 24 h). Os antimicrobianos escolhidos foram: ampicilina 10 μ g (AMP), amoxicilina 10 μ g (AMO), amoxicilina + ácido clavulânico 30 μ g (AMC), cefalexina 30 μ g (CEF), cefoxitina 30 μ g (CFO), ceftiofur 30 μ g (CTF), ceftriaxona 30 μ g (CRO), enrofloxacin 5 μ g (ENO), gentamicina 10 μ g (GEN),

neomicina 30 µg (NEO), penicilina G 10 UI (PEN), sulfametoxazol/trimetoprim 25 µg (SUT) e tetraciclina 30 µg (TET) (Cefar). Após o término do período de incubação, procedeu-se a leitura dos halos de inibição e, de acordo com os tamanhos, as bactérias foram classificadas em sensíveis, intermediárias e resistentes [29]. Foram considerados multirresistentes aqueles microrganismos resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos testados.

Extração do DNA e detecção dos genes *mecA* e *mecC* pela técnica de PCR

Todos os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* foram submetidos à técnica de Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) para detecção do gene *mecA* e *mecC*, os quais conferem resistência a meticilina.

Para isso, o DNA bacteriano foi extraído com o auxílio de um kit comercial (NewGene®), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, a técnica de PCR para o gene *mecA* foi realizada conforme descrito por Coelho et al. [30], utilizando os primers 5' AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C 3' e 5' AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C 3'. Já a PCR para o gene *mecC* seguiu as diretrizes descritas por Cuny et al. [31], com os seguintes primers: 5' GCT CCT AAT GCT AAT GCA 3' e 5' TAA GCA ATA ATG ACT ACC 3'.

O produto da PCR de ambos os genes foi visualizado em gel de agarose a 1,5% e o tamanho da banda foi comparado a de um marcador de 100pb.

Resultados e discussão

A identificação e o isolamento bacteriano tradicional dependem de testes bioquímicos e fisiológicos trabalhosos e demorados [27]. Para garantir o início rápido do tratamento correto e o uso prudente de antimicrobianos, a identificação oportuna e precisa

do agente causador da mastite bovina é de suma importância. A espectrometria de massa de ionização assistida por matriz (MALDI-TOF MS) representa uma alternativa econômica aos ensaios fenotípicos e bioquímicos clássicos e foi introduzida como uma nova ferramenta no laboratório de diagnóstico clínico para identificação rápida de bactérias e alguns fungos que causam infecções [27].

Mais de 137 espécies de microorganismos são capazes de causar mastite bovina [32], porém os casos de mastite geralmente são causados por um patógeno primário, sendo identificada apenas uma espécie bacteriana em amostras de leite de glândulas doentes [33]. No entanto, infecções concomitantes de duas espécies diferentes não são raras, porém a presença simultânea de três patógenos é bastante incomum [34]

No presente estudo, 51 bactérias foram submetidas à técnica de MALDI-TOF. Destas, 10 não obtiveram uma pontuação satisfatória para que fosse realizada a identificação do microrganismo presente. Isso pode ocorrer nos casos em que o software utilizado para realizar o teste não conta em sua base de dados com o espectro de referência para aquela amostra ou, quando o cálculo realizado apresentou um resultado muito distante da referência [27]. Das 41 bactérias que a identificação foi possível, constatou-se a presença de 27 SCN (65,8%), 7 *Staphylococcus aureus* (17,1%), 2 *Streptococcus uberis* (4,9%), 2 *Klebsiella variicola* (4,9%), 1 *Serratia marcescens* (2,4%), 1 *Enterococcus faecalis* (2,4%) e 1 *Staphylococcus pseudintermedius* (2,4%) (Figura 1). Estes resultados são consensuais com outros estudos brasileiros realizados nas regiões sul e norte do país [35,36] nos quais foi verificado maior prevalência de SCN seguida por bactérias da espécie *S. aureus* em casos de mastite clínica e subclínica, diferente das observações feitas por Saab et al, também na região sul do Brasil [37], onde encontrou-se maiores taxas de SCN seguida por *Streptococcus* spp. Em outros países também relata-se a prevalência de SCN

entre os principais agentes causadores de mastite bovina. [10,38] Os SCN causam principalmente mastite subclínica [39] e embora sejam considerados patógenos menores [38], eles influenciam negativamente a qualidade do leite por aumentarem a CCS [40], resultando em níveis menores de produção e alterações na composição química do leite [41].

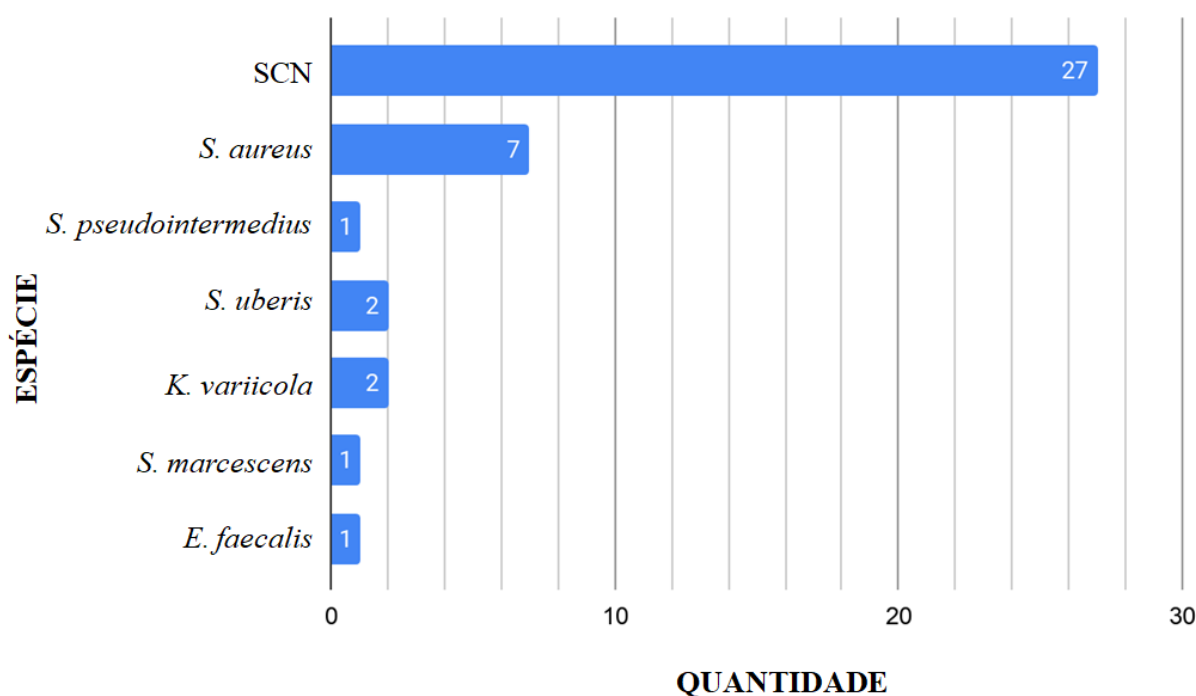


Figura 1: Prevalência dos agentes causadores de mastite bovina oriundos de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina na região da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul.

Dentre os SCN, foram identificadas as espécies *S. chromogenes* (62,96%), *S. xylosus* (11,11%), *S. epidermidis* (11,11%), *S. sciuri* (7,41%), *S. haemolyticus* (3,70%) e *S. warneri* (3,70%). Esses resultados foram similares a outros estudos realizados na África do Sul, Argentina e Canadá quanto à prevalência de *S. chromogenes*, *S. epidermidis* e *S. xylosus*. Houveram divergências quanto ao percentual de *S. haemolyticus*, visto que em alguns trabalhos avaliando a prevalência das espécies de SCN em casos de mastite clínica e subclínica, sua incidência foi mais elevada. Esta diferença pode ser justificada pela localização geográfica e maiores números amostrais utilizados por esses autores

[9,40,42,43,44]. No presente estudo não foi detectado a presença de *S. simulans*, um dos principais representantes do grupo SCN em casos mastíticos no Brasil [45].

Em relação ao perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos agentes causadores de mastite, foi possível observar um percentual elevado de microrganismos resistentes. Quanto aos isolados classificados como *Staphylococcus aureus*, não houve detecção dos genes *mecA* e *mecC* que caracterizariam os isolados como MRSA e, detectou-se uma amostra (14,3%) multirresistente, sensível apenas a 5 dos 13 antimicrobianos utilizados. Duas amostras (28,6%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Estes resultados divergem dos obtidos por Schmidt et al [9], onde a maioria das amostras apresentou sensibilidade à todas as classes utilizadas, no entanto, os resultados são similares aos encontrados por Titouche et al [18] quanto à baixa proporção de isolados MRSA (15,9%).

Entre as SCN, a classe de antimicrobianos para qual os isolados apresentaram maior taxa de resistência foi à tetraciclina, com 13 isolados resistentes (48,2%) (Figura 2). Em relação à sensibilidade, todas as amostras foram suscetíveis ao ceftiofur, gentamicina, amoxicilina + ácido clavulânico e cefalexina. Não foram identificadas amostras classificadas como MRS (Methicillin-resistant *Staphylococcus*). O percentual de MRS observado em estudos costuma ser baixo, como identificado na Argentina por Raspanti et al [44] e na Coreia do Sul por Moon et al [46] onde foram detectados, respectivamente, 13,7% e 2,4%. Apesar da escassez de relatos sobre a presença de MRS em gado leiteiro, esses microrganismos merecem atenção principalmente pelas suas características de virulência que influenciam negativamente no prognóstico dos animais acometidos [47]. Embora *in vitro* muitos MRS e MRSA apresentem suscetibilidade frente a alguns β -lactâmicos, eles devem ser consideradas resistentes a todos os antimicrobianos do grupo [29].

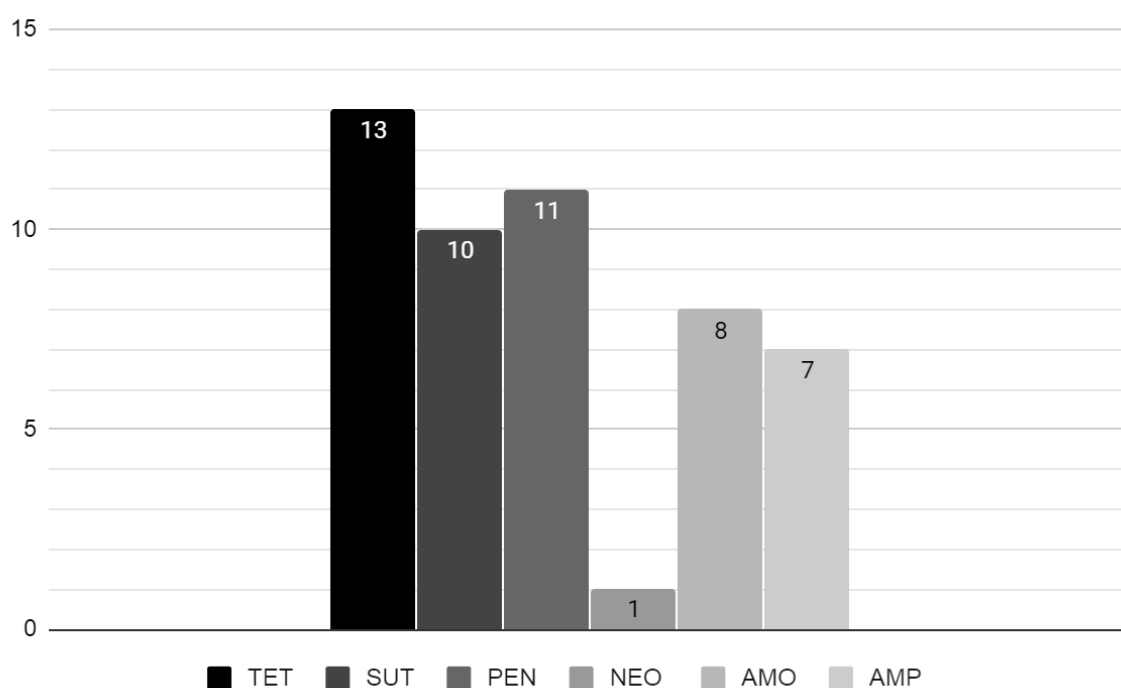


Figura 2: Perfil de resistência antimicrobiana dos agentes causadores de mastite bovina classificados como *Staphylococcus* coagulase-negativa frente aos principais antimicrobianos utilizados para tratamento da doença.

TET = tetraciclina, SUT = sulfametoxazol/trimetoprim, OXA = oxacilina, PEN = penicilina, NEO = neomicina, AMO = amoxicilina, AMP = ampicilina.

Dentre as bactérias identificadas como *S. chromogenes*, 29,4% apresentaram multirresistência, sendo as maiores taxas de resistência observadas frente ao sulfametoxazol/trimetoprim (58,8%) e à oxacilina (58,8%), seguido de tetraciclina (52,9%) e penicilina (41%). Esses resultados concordam com as afirmações de Taponem e Pyorala [48], que consideram os SCN isolados de mastite mais predispostos a apresentarem resistência aos antimicrobianos em comparação aos *S. aureus*, além da facilidade em adquirir multirresistência. O único *S. pseudintermedius* encontrado no estudo mostrou-se resistente à sulfametoxazol/trimetoprim, amoxicilina, ampicilina e penicilina, sendo sensível aos outros antimicrobianos.

A presença de espécies Gram-negativas no presente estudo foi baixa. Foi detectada a presença da espécie *K. variicola* e relatos dessa bactéria em casos mastíticos são escassos. Segundo Podder et al. [49], é possível que *K. variicola* não tenha sido detectada em

amostras de leite no passado devido à incapacidade de testes padrão de discriminá-la de outras espécies de *Klebsiella*, no entanto, ela mostrou-se 100% suscetível a todos os antimicrobianos utilizados. Porém, a amostra classificada como *Serratia marcescens* demonstrou resistência a todos os antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos e resultados intermediários para a neomicina e tetraciclina. Embora essa bactéria seja considerada pouco prevalente em casos de mastite, ela já foi relacionada a surtos da doença em fazendas leiteiras [50] e merece atenção pela facilidade em adquirir resistência e levar a falhas nos tratamentos [51]. Baixos percentuais de cura bacteriológica após tratamento foram observados por Nam et al [52] e Pinzón-Sánchez e Ruegg [53], em estudos conduzidos em rebanhos situados nos Estados Unidos e Coréia, quando o agente causador era do gênero *Serratia*.

O isolado definido como *E. faecalis* apresentou resistência à cefalexina, ceftriaxona e neomicina. Bactérias do gênero *Enterococcus* spp. estão presentes de maneira geral em laticínios devido à sua comensalidade no intestino de vacas leiteiras e resistência a processos de pasteurização, no entanto, podem representar um risco para humanos devido à sua patogenicidade e ascendente resistência antimicrobiana [54].

Os isolados pertencentes à espécie *S. uberis* foram suscetíveis à todos os antimicrobianos testados. Esse dado contraria informações encontradas acerca desse gênero em outras localidades do mundo, onde observou-se percentuais elevados de resistência [55,56], além da presença de isolados multirresistentes, no entanto, mesmo no estudo desenvolvido por Minst et al [55], houve divergências quanto ao percentual de resistência em diferentes regiões do país.

Entre os antimicrobianos frequentemente utilizados no país para o tratamento da mastite bovina estão a tetraciclina, enrofloxacina, gentamicina e β -lactâmicos, com variações regionais de indicação [23]. Os resultados obtidos em nosso estudo indicam altos

níveis de resistência aos grupos das tetraciclina e β -lactâmicos, entretanto, apresentou-se 100% de sensibilidade para a enrofloxacina e gentamicina indicando a possibilidade desses antimicrobianos não serem rotineiramente utilizados na região, sugerindo a necessidade de cautela quanto à sua prescrição para evitar surgimento de bactérias resistentes. A alta taxa de resistência aos β -lactâmicos levanta preocupações visto que os casos de mastite com espécies bacterianas resistentes a este grupo também apresenta menor resposta ao tratamento com outras classes de antimicrobianos [57].

O problema da resistência bacteriana afeta o prognóstico dos animais acometidos e aumenta os custos nas fazendas leiteiras, além de representar uma questão de saúde pública, uma vez que há o risco de veiculação de resíduos de antibióticos e cepas resistentes através do consumo de leite e derivados. Por isso, o uso prudente de antimicrobianos e o monitoramento constante dos percentuais regionais de resistência bacteriana são de suma importância, além da identificação e suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* prévia para a escolha do melhor tratamento.

Conclusões

Dentre os microrganismos causadores de mastite bovina na serra gaúcha, destacou-se o gênero *Staphylococcus*. A maioria dos isolados foi agrupada dentre os SCN, considerados patógenos menores da mastite, porém associados ao aumento de CCS e diminuição da qualidade do leite. Foi possível observar também altas taxas de resistência frente a classe dos β -lactâmicos, grupo de antimicrobianos amplamente utilizado em fazendas leiteiras. Esses achados salientam a necessidade de um uso criterioso de antimicrobianos em rebanhos leiteiros, contando sempre com a identificação do patógeno e análise do perfil de suscetibilidade *in vitro*.

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

Material suplementar

Tabela 1 - Perfil de resistência antimicrobiana dos 41 microrganismos isolados frente aos antimicrobianos frequentemente utilizados para tratamento da mastite bovina.

ID	Espécie	Antimicrobianos ¹											
		ENO	TET	SUT	CTF	CRO	NEO	GEN	PEN	AMC	AMO	AMP	CFE
1	<i>S. aureus</i>												
2	<i>S. aureus</i>			X			X		X		X	X	X
3	<i>S. aureus</i>		X										
4	<i>S. aureus</i>								X		X	X	
5	<i>S. aureus</i>								X		X	X	
6	<i>S. aureus</i>												
7	<i>S. aureus</i>												
8	<i>K. variicola</i>												
9	<i>K. variicola</i>												
10	<i>S. marscescens</i>								X	X	X	X	X
11	<i>E. faecalis</i>					X	X						X
12	<i>S. pseudintermedius</i>			X					X		X	X	
13	<i>S. uberis</i>												
14	<i>S. uberis</i>												
15	<i>S. sciuri</i>								X				
16	<i>S. sciuri</i>												
17	<i>S. xylosus</i>		X										
18	<i>S. xylosus</i>		X						X				
19	<i>S. xylosus</i>		X						X		X		
20	<i>S. epidermidis</i>		X						X		X	X	
21	<i>S. epidermidis</i>												
22	<i>S. epidermidis</i>												
23	<i>S. warneri</i>												
24	<i>S. haemolyticus</i>												
25	<i>S. chromogenes</i>		X										

26	<i>S. chromogenes</i>				X		X	X
27	<i>S. chromogenes</i>		X					
28	<i>S. chromogenes</i>	X	X		X		X	X
29	<i>S. chromogenes</i>	X	X		X		X	X
30	<i>S. chromogenes</i>	X	X					
31	<i>S. chromogenes</i>	X	X					
32	<i>S. chromogenes</i>	X	X					
33	<i>S. chromogenes</i>							
34	<i>S. chromogenes</i>	X	X	X	X		X	X
35	<i>S. chromogenes</i>							
36	<i>S. chromogenes</i>	X	X		X		X	X
37	<i>S. chromogenes</i>							
38	<i>S. chromogenes</i>	X	X		X			
39	<i>S. chromogenes</i>							
40	<i>S. chromogenes</i>				X		X	X
41	<i>S. chromogenes</i>		X					

¹AMP: ampicinina, AMO: amoxicilina, AMC: amoxicilina + ácido clavulânico, CFE: cefalexina, CTF: ceftiofur, CRO: ceftriaxina, ENO: enrofloxacin, GEN: gentamicina, NEO: neomicina, PEN: penicilina, SUT: sulfametoxazol + trimetoprim, TET: tetraciclina.

Referências

1. Alnakip ME, Quintela-Baluja M, Böhme K, Fernandez-No I, Caamaño-Antelo S, Calo-Mata P, Barros-Velásquez J (2014) The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *J Vet Med* 2014:65980. <https://doi.org/10.1155/2014/659801>
2. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2006) *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheeps, pigs and goats*. Elsevier, Canada.

3. de Sá JPN, Figueiredo CHA, Neto OLS, Roberto SBA, Gadelha HS, Alencar MCB (2018) Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva de leite. *Rev Bras Gest Ambient* 12: 8-20.
4. Srednik MA, Crespi E, Testorelli MF, Puigdevall T, Pereyra AMD, Rumi MV, Caggiano N, Gullone L, Mollerach M, Gentilini ER (2018) First isolation of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Argentina. *Vet Anim Sci* 7:100043. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2018.11.004>
5. Heikkilä A-M, Liski E, Pyörälä S, Taponen S (2018) Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *J Dairy Sci* 101:9493–9504. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14824>
6. NMC (National Mastitis Council) (2004) Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4.ed. Verona: National Mastitis Council
7. Oliveira L, Hulland C, Huegg PL (2013) Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. *J Dairy Sci* 96:7538-7549. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6078>
8. Tenhagen B-A, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W (2006) Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in 101 Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* 89:2542–2551. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72330-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72330-X)
9. Schmidt T, Kock MM, Ehlers MM (2015) Diversity and antimicrobial susceptibility profiling of staphylococci isolated from bovine mastitis cases and close human contacts. *J Dairy Sci* 98:6256-6269. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9715>
10. Sztachańska M, Barański W, Janowski T, Pogorzelska J, Zduńczyk S (2016) Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in

- nine dairy herds in North-East Poland. Pol J Vet Sci 19:119-124.
<https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0015>
11. Visscher de A, Pierpers S, Haesbrouck F, Supré K, De Vliegher S (2017) Coagulase-negative *Staphylococcus* species in bulk milk: prevalence, distribution, and associated subgroup- and species-specific risk factors. J Dairy Sci 100:629-642.
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11476>
 12. Kamal RM, Bayoumi MA, Abd El Aal SFA (2013) MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. Food Control 33:49-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.017>
 13. Mesquita AA, Rocha CMBM, Bruhn FRP, Custódio DAC, Braz MS, Pinto SM, Silva DB, Costa GM (2019) *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. Pesq Vet Bras 39:308-316.
<https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5821>
 14. Brito MAVP, Brito JRF, Ribeiro MT, Veiga VMO (1999) Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. Arq Bras Med Vet Zootec 51:129-135. <https://doi.org/10.1590/S0102-09351999000200001>.
 15. Waage S, Mørk T, Røros A, Aasland D, Hunshamar A, Ødergaard S (1999) A bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. J Dairy Sci 82:712-719.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75288-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75288-4)
 16. Garcia-Álvarez L, Holden MTG, Lindsay H, Webb CR, Brown DFJ, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RLR, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA (2011) Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a

- novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 11(8): 595–603. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70126-8](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70126-8)
17. Prenafeta A, Sitjà M, Holmes MA, Paterson GK (2014) *Short communication: Biofilm production characterization of mecA and mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Great Britain. *J Dairy Sci* 97:4838–4841. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7986>
 18. Titouche Y, Hakem A, Houali K, Meheut T, Vingadassalon N, Ruiz-Ripa L, Salmi D, Chergui A, Chenouf N, Hennekinne JA, Torres C, Auvray F (2019) Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST8 in raw milk and traditional dairy products in the Tizi Ouzou area of Algeria. *J Dairy Sci* 102:6876–6884. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16208>
 19. Lee AS, Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, Harbarth S (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* 4:18033. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
 20. Silva AC, Rodrigues MX, Silva NCC (2019) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food and the prevalence in Brazil: a review. *Braz J Microbiol* 51:347–356. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00168-1>
 21. Gentilini E, Denamiel G, Llorente P, Godaly S, Rebuelto M, DeGregorio O (2000) Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J Dairy Sci* 83:1224–1227. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74988-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74988-5)
 22. Ruegg PL (2017) A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci* 100:10381–10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>

23. Freitas CH, Mendes JF, Vilarreal PV, Santos PR, Gonçalves CL, Gonzales HL, Nascente PS (2018) Identificação e perfil de suscetibilidade antimicrobiana de bactérias causadoras de mastite bovina em propriedades leiteiras de Pelotas, Rio Grande do Sul. *Braz J Biol* 78:661-666. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.170727>
24. Cheng J, Qu W, Barkema HW, Nobrega DB, Gao J, Liu G, Buck, Kastelic JP, Sun H, Han B (2019) Antimicrobial resistance profiles of 5 common bovine mastitis pathogens in large Chinese dairy herds. *J Dairy Sci* 102:1-12. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15135>
25. Silva ER, Perreira AMG, Moraes WS, Santoro KR, Silva, TRM (2012) Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. *Rev Bras Saúde Prod Anim* 13:701-711. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402012000300010>
26. Quinn JP, Markey BK, Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S, Hartigan JP (2011) *Veterinary microbiology and microbial disease*. 2nd ed. J Wiley and Sons Ltd Publication, UK
27. Nonnemann B, Lyhs U, Svennesen L, Kristensen KA, Klaas IC, Pedersen K (2019) Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Dairy Sci* 102:2515-2524. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15424>
28. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45 (5325707): 493-496.
29. CLSI (2020) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI supplement M100*. Wayne, PA.
30. Coelho SMO, Moraes RAM, Soares LC, Pereira IA, Gomes LP, Souza MMS (2007) Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em

- Staphylococcus aureus e Staphylococcus intermedius oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. *Ciência Rural* 37(1), 195-200. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000100031>
31. Cuny C, Layer F, Strommenger B, Witte W (2011) Rare Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a Novel *mecA* Homologue in Humans in Germany. *PLoS ONE* 6(9), e24360. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024360>
32. Watts JL (1988) Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol* 16:41-66. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90126-5](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135(88)90126-5).
33. Watts JL, Yancey RJ (1994) Identification of veterinary pathogens by use of commercial identification systems and new trends in antimicrobial susceptibility testing of veterinary pathogens. *Clin Microbiol Rev* 7:346-356. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.7.3.346>
34. Rainard P (2017) Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction? *Vet Res* 48:25. <http://dx.doi.org/10.1186/s13567-017-0429-2>
35. Santos LL, Pedroso TFF, Guirro E (2010) Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira de Santa Izabel do Oeste, Paraná. *Ci Anim Bras* 11:860-866. <http://dx.doi.org/10.5216/cab.v11i4.3654>
36. Oliveira CMC, Sousa MGS, Silva NS, Mendonça CL, Silveira JAS, Oaigen RP, Andrade SJT, Barbosa JD (2011) Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq Vet Bras* 31. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011000200002>
37. Saab AB, Zamprogna TO, Lucas TM, Martini KC, Mello PL, Silva AV, Martins LA (2014) Prevalence and etiology of bovine mastitis in the Nova Tebas, Parana.

- Semina Ciên Agrá 35:835-844. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n2p835>
38. Vakkamäki J, Taponem S, Heikkilä AM, Pyörälä S (2017) Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta Vet Scan* 59:33. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0301-4>
39. Simojoki H, Salomäki T, Taponem S, Iivanainen A, Pyörälä S (2011) Innate immune response in experimentally induced bovine intramammary infection with *Staphylococcus simulans* and *S. epidermidis*. *Vet Res* 42:49. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-49>
40. Fry PR, Middleton JR, Dufour S, Perry J, Scholl D, Dohoo I (2014) Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. *J Dairy Sci* 97:4876-4885. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7657>
41. Sert D, Mercan E, Aydemir S, Civelek M (2016) Effects of milk somatic cell counts on some physicochemical and functional characteristics of skim and whole milk powders. *J Dairy Sci* 99:5254-5264. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10860>
42. Thorberg BM, Danielsson-Tham ML, Emanuelson U, Persson Waller K (2009) Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci* 92:4962-4970. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2184>
43. Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vliegher S (2014) Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. *The Vet J* 203:44-51. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.11.001>
44. Raspanti CG, Bonetto CC, Vissio C, Pellegrino MS, Reinoso EB, Dieser SA, Bogni CI, Larriestra AJ, Odierno LM (2015) Prevalence and antibiotic susceptibility of

- coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina. *Rev Argent Microbiol* 48:40-56. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.12.001>
45. Machado TRO, Correa MG, Marin JM (2008) Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec*. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352008000100041>
46. Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, Joo YS, Koo HC (2007) Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J Dairy Sci* 90:1176-1185. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71604-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71604-1)
47. Seixas R, Santos JP, Bexiga R, Vilela CL, Oliveira M (2014) *Short communication:* Antimicrobial resistance and virulence characterization of methicillin-resistant staphylococci isolates from bovine mastitis cases in Portugal. *J Dairy Sci* 97:340-344. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7130>
48. Taponen S, Pyorala S (2009) Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet Microbiol* 134:29–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.011>.
49. Podder MP, Rogers L, Daley PK, Keefe GP, Whitney HG, Tahlan K (2014) *Klebsiella* species associated with bovine mastitis in Newfoundland. *PLoS ONE* 9: e106518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106518>
50. Friman MJ, Eklund MH, Pitkälä AH, Schultz PJR, Rantala MHJ (2019) Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Vet Scand* 61:54. <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0488-7>

51. Ohnishi M, Sawada T, Hirose K, Sato R, Hayashimoto M, Hata E, Yonezawa C, Kato H (2011) Antimicrobial susceptibilities and bacteriological characteristics of bovine *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* isolates from Mastitis. *Vet Microbiol* 154:202-207. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.06.023>
52. Nam HM, Lim SK, Kang HM, Kim JM, Moon JS, Jang KC, Kim JM, Joo YS, Jung SC (2009) Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *J Dairy Sci* 92:2020–2026. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1739>
53. Pinzón-Sánchez C, Ruegg PL (2011) Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. *J Dairy Sci* 94:3397–3410. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3925>
54. Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A, García-Solache M (2020) Ready-to-eat dairy products as a source of multidrug-resistant *Enterococcus* strains: phenotypic and genotypic characteristics. *J Dairy Sci* 103:4068-4077. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17395>
55. Minst K, Märtlbauer E, Miller T, Meyer C (2012) Short communication: *Streptococcus* species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. *J Dairy Sci* 95:6957-6962. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5852>
56. Pitkälä A, Koort J, Björkroth J (2008) Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. *J Dairy Sci* 91:4075-4081. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1040>
57. Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN (2006) Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine

Staphylococcus aureus mastitis. J Dairy Sci 89:1877-1895.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72256-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1)

4.3 Capítulo III

Óleos essenciais como alternativas no controle de microrganismos causadores de mastite bovina

Manuscrito em fase de elaboração que será enviado para revista Journal of Dairy Science
após tradução para o idioma inglês

Óleos essenciais como alternativas no controle de microrganismos causadores de mastite bovina

Tamiris Silva Lopes; Caroline Fussieger; Simone Silveira; Gustavo Aver; Renata Dal
Corno; Gabriel Paulette; Mariana Roesch Ely; Fábio Antunes Rizzo; André Felipe Streck

RESUMO

A mastite bovina é a doença infecciosa mais comum em vacas leiteiras e causa grandes prejuízos econômicos além de impactar no bem-estar do animal. A estratégia terapêutica usada no tratamento desta enfermidade se baseia no uso de antimicrobianos, porém a eficácia deste método tem diminuído conforme aumentam os casos de resistência bacteriana, sendo necessário buscar alternativas para o controle desta doença. Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de plantas e têm atividade antimicrobiana reconhecida frente a diversos grupos bacterianos. Objetivou-se, neste estudo, determinar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (OECC), *Eucalyptus grandis* W .Mill ex Maiden (OEEG), *Lavandula dentata* L. (OELD), *Mentha x piperita* L. (OEMP) e *Thymus vulgaris* L (OETV) em 16 patógenos da mastite bovina com diferentes perfis de resistência antimicrobiana, mais *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 25929) e *Escherichia coli* (ATCC[®] 25922), através da técnica de microdiluição em caldo. A análise dos constituintes químicos presentes nesses óleos essenciais também foi realizada. O OECC e o OETV demonstraram maior atividade antibacteriana e atuaram independentemente da resistência antimicrobiana encontrada nos isolados. Já o OEEG foi o que apresentou pior desempenho. Em relação a composição química dos óleos, foi possível identificar que o OEEG e o OELD apresentaram, majoritariamente, 1,8-cineol em sua composição, com 76,91% e 45,22% respectivamente, já o OECC apresentou citral (67,48%) como principal composto, o OEMP teve o L-menthol (38,54%) como prevalente, enquanto o OETV apresentou em sua análise química principalmente timol (44,17%).

Palavras-chave: antimicrobianos, resistência, tratamentos alternativos

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a doença infecciosa mais comum em vacas leiteiras (Chehabi et al., 2019). Além de afetar a saúde e o bem-estar dos animais, provoca grandes prejuízos econômicos à indústria de laticínios (Nonnemman et al., 2019), em consequência da diminuição na produção de leite e menor qualidade do leite e derivados (Ruegg, 2017; Cunha et al., 2020). De acordo com a gravidade da inflamação, a mastite pode ser classificada como subclínica, clínica e crônica, e a severidade é dependente da natureza do patógeno causador e de fatores relacionados ao animal, como idade, raça, saúde imunológica e estágio de lactação (Viguiet et al., 2009).

Os patógenos causadores de mastite são frequentemente divididos em dois grupos, chamados contagiosos ou ambientais. Patógenos contagiosos são transmitidos principalmente de uma vaca para outra ou através de equipamento de ordenha, enquanto os patógenos ambientais têm como reservatório o ambiente da fazenda e a maior probabilidade de invadir a glândula mamária é no pós-ordenha, período no qual o esfíncter permanece aberto, ou ainda através de moscas e lesões no úbere (Chehabi et al., 2019).

As estratégias de tratamento e prevenção da mastite bovina envolvem o uso de antimicrobianos (Pieterse e Todorov, 2010). No entanto, a resistência antimicrobiana associada aos patógenos da mastite bovina é um problema recorrente documentado em diversos países (Pitkälä et al., 2008; Medeiros et al., 2009; Minst et al., 2012; Silva et al., 2012; Li et al., 2015a; Soares et al., 2017; Zhang et al., 2018; Kim et al., 2019; Mesquita et al., 2019; Cheng et al., 2019; Titouche et al., 2019; Ren et al., 2020; Chajęcka-Wierzchowska et al., 2020). Diante desse cenário, métodos alternativos, seguros, eficazes e com baixos efeitos colaterais são necessários no controle da mastite (Yadav et al., 2020).

Os óleos essenciais, que são substâncias naturais, voláteis e complexas, produzidas durante o metabolismo secundário de plantas aromáticas (Machado e Junior, 2011), apresentam-se como alternativas às drogas convencionais pela atividade antibacteriana bem estabelecida, inclusive com resultados promissores frente a agentes causadores da mastite bovina (Cerioli et al., 2018; Castro et al., 2016; Montironi et al., 2016; Budri et al., 2015; Fratini et al., 2014; Gonçalves et al., 2013; Dal Pozzo et al., 2011; Aiensaard et al., 2011). Assim, o objetivo do nosso estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de diferentes óleos essenciais frente a bactérias com perfis de resistência distintos, oriundas de leite de vacas diagnosticadas com mastite bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e identificação bacteriana

As bactérias utilizadas nos experimentos foram provenientes de um estudo anterior realizado por Lopes et al. (2020). Foram selecionadas 16 bactérias com diferentes perfis de resistência para a realização dos experimentos com óleos essenciais, mais duas bactérias ATCC® (Tabela 1), sendo: 6 isolados de *Staphylococcus aureus*, 5 *Staphylococcus chromogenes*, 2 *Klebsiella variicola*, 1 *Serratia marcescens*, 1 *Staphylococcus sciuri*, 1 *Enterococcus faecalis*, 1 *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25929) e 1 *Escherichia coli* (ATCC® 25922).

Tabela 1. Perfil de resistência dos 16 isolados selecionados para os experimentos com óleos essenciais.

Identificação	Antimicrobianos ¹											
	AMP	AMO	AMC	CFE	CTF	CRO	ENO	GEN	NEO	PEN	SUT	TET
<i>S. sciuri</i>										X		
<i>S. aureus</i>												
<i>S. aureus</i>					X				X	X	X	X
<i>S. aureus</i>												X
<i>S. aureus</i>										X		
<i>S. aureus</i>										X		
<i>S. aureus</i>												
<i>K. variicola</i>												
<i>K. variicola</i>												
<i>S. marcescens</i>	X	X	X	X						X		
<i>S. chromogenes</i>										X	X	X
<i>S. chromogenes</i>										X	X	X
<i>S. chromogenes</i>									X	X	X	X
<i>S. chromogenes</i>										X	X	X
<i>S. chromogenes</i>												
<i>E. faecalis</i>				X		X			X			

¹AMP: ampicinina, AMO: amoxicilina, AMC: amoxicilina + ácido clavulânico, CFE: cefalexina, CTF: ceftiofur, CRO: ceftriaxina, ENO: enrofloxacina, GEN: gentamicina, NEO: neomicina, PEN: penicilina, SUT: sulfametoxazol + trimetoprim, TET: tetraciclina.

Coleta dos materiais vegetais e obtenção dos óleos essenciais

As plantas escolhidas para obtenção dos óleos essenciais foram: *Cymbopogon citratus* (D.C.), *Eucalyptus grandis* W.Mill ex Maiden, *Lavandula dentata* L., *Mentha x piperita* L. e *Thymus vulgaris* L. A coleta dos materiais vegetais foi realizada na cidade de

Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, no período de janeiro a março de 2019. Após, exsiccatas dos materiais foram encaminhadas para o herbário da Universidade de Caxias do Sul para confirmação taxonômica. As partes aéreas das plantas foram separadas, desidratadas em secador de ervas com ventilação forçada (40°C) até peso constante e então submetidos à hidrodestilação, utilizando destilador tipo Clevenger. O percentual de rendimento foi calculado segundo Zenebon et al. (2008).

A caracterização dos compostos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID), conforme descrito por Correa et al. (2019).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

O método de microdiluição em caldo foi empregado para avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de acordo com a metodologia descrita por Budri et al. (2015), com algumas modificações. Para a realização dos experimentos, os inóculos bacterianos foram preparados para alcançar a solução padrão McFarland 0,5 ($\cong 10^8$ UFC/ml) em solução salina 0,9%. Em seguida, os mesmos inóculos foram diluídos para a concentração aproximada de 10^5 UFC/ml e incubados juntamente com os óleos de *C. citratus*, *E. grandis*, *L. dentata*, *M. x piperita* e *T. vulgaris* nas concentrações de 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 6,35 mg/ml, 3,12 mg/ml, 1,56 mg/ml, 0,78 mg/ml e 0,39 mg/ml suplementados com 1% de Tween 80 em 100 μ L de TSB (*Tryptone Soy Broth*), em triplicata. Foram incluídos controles positivos de crescimento bacteriano, do diluente e também controles de esterilidade (Anexo I).

Posteriormente, as placas foram incubadas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. A leitura dos resultados foi realizada em leitora de microplacas (Molecular Devices, SpectraMax M2) em 600 nm e após, foram adicionados 10 μ L de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01% a cada

poço para confirmação dos resultados. Assumiu-se como CIM a menor concentração do óleo essencial que foi bacteriostático, ou seja, impediu o crescimento visível das bactérias, indicado pela mudança de coloração de rosa para azul (Coban et al., 2012; Budri et al., 2015) (Anexo III).

Para a determinação da CBM, 100 µL dos poços sem crescimento bacteriano visível após o período de incubação foram inoculados em PCA (*Plate Count Agar*) e incubados a 37°C por 24h. A CBM foi determinada como a menor concentração de agente com ação bactericida em mais de 99,9% da população inicial, indicado por ausência de crescimento bacteriano nas superfícies das placas de PCA. O crescimento positivo de cada cultura de microrganismos sem os agentes testados foram plaqueados como controle positivo.

Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados utilizando o software SPSS 17.0. Os valores de densidade óptica (*optical density* - OD) para cada concentração testada em cada óleo foram comparados entre si através do teste *one-way* ANOVA com Tuckey pos hoc. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS

Análise química dos constituintes dos óleos essenciais por GC-MS e CG-FID

Detalhes dos constituintes químicos, bem como do rendimento dos óleos essenciais de *C.citratrus* (OECC), *E.grandis* (OEEG), *L.dentata* (OELD), *M. x piperita* (OEMP) e *T. vulgaris* (OETV) estão presentes na Tabela 2. O componente majoritário encontrado no OECC foi geranial (40,91%); nos OEEG e OELD foi o 1,8-cineol (76,91% e 45,22%,

respectivamente); no OEMP foi L-mentol (38,54%) e por fim o OETV apresentando maior quantidade de timol (44,17%) em sua composição.

Tabela 2. Composição química e rendimento dos óleos essenciais de capim-limão, eucalipto, lavanda, hortelã-menta e tomilho identificados através de GC-MS e GC-FID

Espécie vegetal	Rendimento (%)	Composição (%)
<i>C. citratus</i>	2,23%	Citral (67,48%)
		Mirceno (24,67)
		Geraniol (1,91%)
		Outros (4,77%)
<i>E. grandis</i>	1,98%	1,8-cineol (76,91%)
		α -pineno (8,21%)
		Ledeno (5,05%)
		Limoneno (2,61%)
		Outros (4,8%)
<i>L. dentata</i>	1,76%	1,8-cineol (45,22%)
		Cânfora (18,23%)
		Fenchona (14,62%)
		β -pineno (2,5%)
		Outros (15,24%)
<i>M. x piperita</i>	1,64%	L-mentol (38,54%)
		Mentofurano (16,3%)
		Citronelal (10,61%)
		1,8-cineol (7,3%)
		Acetato de mentila (6,33%)
		B-cariofileno (3%)
<i>T. vulgaris</i>	1,22%	Outros (16,99%)
		Timol (44,17%)
		p-cimeno (24,65%)
		1,8-cineol (9,89%)
		Linalol (2,92%)
	β -pineno (2,2%)	
	Outros (11,84%)	

CIM e CBM dos óleos essenciais

As médias de CIM e CBM para cada espécie bacteriana estão ilustradas na Tabela 3. É possível observar que as menores médias de CIM foram encontradas nos OECC e OETV. A maior atividade foi vista no OECC contra *S. aureus*, onde a CIM variou de <0,39 a 1,56mg/ml. O OETV também demonstrou alto potencial antimicrobiano, porém com CIM e CBM mais altas, sobre a maioria dos isolados. Já o pior desempenho foi encontrado no OEEG, que não apresentou atividade antibacteriana contra *E. faecalis* em nenhuma concentração testada e para *K. variicola* foi apenas bacteriostático.

Tabela 3. Determinação da média da CIM e CBM obtidas em cada óleo testado sobre as espécies bacterianas avaliadas.

Espécie bacteriana	Espécie vegetal	Concentração (mg/ml)	
		CIM	CBM
<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>C. citratus</i>	0,78	0,78
	<i>T. vulgaris</i>	0,78	1,56
	<i>E. grandis</i>	ND ¹	ND
	<i>L. dentata</i>	6,35 - 12,5	25
	<i>M. x piperita</i>	3,12	3,12
<i>Klebsiella variicola</i>	<i>C. citratus</i>	1,56 - 3,12	1,56 - 6,35
	<i>T. vulgaris</i>	0,39 - 25	0,39 - 50
	<i>E. grandis</i>	12,5 - 50	50
	<i>L. dentata</i>	12,5 - 25	ND
	<i>M. x piperita</i>	3,12	6,35
<i>Serratia marcescens</i>	<i>C. citratus</i>	0,78 - 1,56	1,56
	<i>T. vulgaris</i>	1,56	3,12
	<i>E. grandis</i>	25	25
	<i>L. dentata</i>	6,35	25
	<i>M. x piperita</i>	3,12	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>C. citratus</i>	< 0,39 - 1,56	< 0,39 - 1,56
	<i>T. vulgaris</i>	0,39 - 1,56	0,78 - 3,12
	<i>E. grandis</i>	6,35 - 25	25 - 50
	<i>L. dentata</i>	6,35 - 25	12,5 - 50
	<i>M. x piperita</i>	3,12 - 12,5	3,12 - 12,5
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	<i>C. citratus</i>	0,78 - 3,12	0,78 - 6,35
	<i>T. vulgaris</i>	0,39 - 1,56	0,39 - 3,12
	<i>E. grandis</i>	1,56 - 25	12,5 - 50

	<i>L. dentata</i>	6,35 - 25	6,35 - 50
	<i>M. x piperita</i>	3,12 - 25	3,12 - 50
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>C. citratus</i>	1,56	1,56
	<i>T. vulgaris</i>	0,78	6,35
	<i>E. grandis</i>	ND	ND
	<i>L. dentata</i>	12,5	25
	<i>M. x piperita</i>	50	50
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	<i>C. citratus</i>	0,39 - 0,78	0,78
	<i>T. vulgaris</i>	0,78	0,78
	<i>E. grandis</i>	6,35	6,35
	<i>L. dentata</i>	6,35	6,35
	<i>M. x piperita</i>	0,78 - 1,56	1,56

¹ ND: Não determinada

Já a média do crescimento bacteriano de todos os isolados em cada concentração testada de cada óleo essencial estão descritos na Tabela 4. É possível observar que houve diferenças significativas na maioria das médias de crescimento bacteriano em cada concentração, utilizando o mesmo óleo essencial. Isso pode ser explicado pela variedade de microrganismos e também pela diferença no número amostral de cada espécie bacteriana.

Tabela 4. Média do crescimento bacteriano de todos os isolados em cada concentração testada dos óleos essenciais de *C. citratus*, *M. x piperita*, *T. vulgaris*, *L. dentata* e *E. grandis*

Concentração (mg/ml)	<i>C. citratus</i>	<i>M. x piperita</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>L. dentata</i>	<i>E. grandis</i>
50	68,81 ^a ± 15,72	127,33 ^a ± 34,04	1638,96 ^a ± 167,08	70,23 ^a ± 19,81	124,73 ^a ± 123,59
25	58,46 ^a ± 5,30	90,42 ^a ± 17,98	1351,63 ^a ± 319,27	71,60 ^a ± 76,71	143,96 ^a ± 140,0
12,5	57,79 ± 11,49	79,63 ^a ± 37,06	909,25 ^a ± 335,62	115,40 ^a ± 110,26	206,60 ^a ± 169,24
6,35	51,38 ± 3,30	84,27 ^a ± 53,21	564,15 ^a ± 276,87	259,33 ^a ± 181,02	310,76 ^a ± 154,77
3,125	52,38 ^a ± 6,50	148,15 ^a ± 172,46	248,06 ^a ± 130,13	408,48 ^a ± 171,29	370,47 ^a ± 139,95
1,562	77,73 ^a ± 83,88	435,83 ^a ± 150,03	103,38 ^a ± 43,84	432,83 ^a ± 134,87	392,24 ^a ± 139,98
0,781	178,77 ^a ± 149,16	434,56 ^a ± 127,50	147,81 ^a ± 144,43	431,90 ^a ± 154,26	416,33 ^a ± 111,49
0,39	298,21 ^a ± 182,08	470,52 ^a ± 98,28	382,88 ^a ± 227,78	529,98 ^a ± 210,29	440,93 ^a ± 134,88

^ap < 0,05, conforme teste one-way ANOVA

DISCUSSÃO

A composição química encontrada no OECC foi similar às obtidas por outros autores. Os compostos mais prevalentes foram os isômeros geranial (40,91%) e neral (26,57%), que juntos formam o citral (67,48%), e mirceno (24,67%). Olayeme (2017) identificou os mesmos compostos como majoritários em plantas coletadas no norte da Nigéria, porém em concentrações inferiores. Em relação ao rendimento, o mesmo autor obteve maiores percentuais utilizando folhas secas, totalizando 2,6%. O percentual de geranial encontrado por Van et al. (2016) (40,09%) foi bem próximo ao obtido no presente estudo, porém o rendimento do óleo foi bem abaixo (0,81%), possivelmente pelo fato destes autores utilizarem folhas frescas. Quanto ao OEEG, o composto majoritário foi o 1,8-cineol (76,91%), diferente dos observados em plantas coletadas na Argentina e continente africano (Ogunwande et al., 2003; Lucia et al., 2007; Alzogaray et al., 2011; Soyngbe et al., 2013), onde os compostos prevalentes foram o α -pineno e β -pineno. Plantas cultivadas em diferentes localizações geográficas frequentemente apresentam quimiotipos distintos, justificando as divergências dos compostos majoritários. Já o rendimento foi próximo ao obtido por Soyngbe et al. (2013) (1,78%) e inferior ao encontrado por Ogunwande et al. (2003) (4,7%). No OELD, o composto prevalente foi o 1,8-cineol (45,22%) corroborando com os achados de Martins et al. (2019), que observaram valores bem aproximados (43,3%) do mesmo composto em plantas cultivadas em Minas Gerais, contudo o rendimento foi bem abaixo ao do presente estudo utilizando folhas frescas (0,44%). Em outro trabalho realizado na Tunísia com o óleo essencial da mesma espécie, rendimentos superiores foram encontrados (1,96%) e o linalol foi o composto predominante (47,3%) (Msaada et al., 2012).

O OEMP teve L-mentol como componente majoritário (38,54%), seguido de mentofurano (16,3%). Essa mesma dominância foi observada em um estudo brasileiro (Souza et al., 2006) nas concentrações de 34 a 42% e 24 a 30%, respectivamente. Por outro lado, um perfil químico totalmente distinto já observado em estudos também conduzidos no Brasil (Sartoratto et al., 2004), mostrando prevalência de linalol (51.0%), carvona (23.42%), 3-octanol (10.1%) e terpinen-4-ol (8.00%) e percentual de rendimento inferior (0,42%). Já o OETV apresentou timol como componente mais abundante (44,17%). Valores similares de timol e de rendimento já foram descritos em estudos conduzidos no Brasil e na Romênia (Porte e Godoy, 2008; Borugă et al. 2014)(44,7-1,1% e 47,59-1,25%, respectivamente). Shabnum e Wagay (2011) obtiveram quantidades similares de timol (46,21%), porém rendimento acima do encontrado no presente estudo. Segundo Olayeme (2017), variações no rendimento dos óleos essenciais e em suas composições podem ser explicadas pela atividade de enzimas responsáveis pela biossíntese de compostos voláteis (Olayemi, 2017). Além disso, é possível que variações intra-espécies ocorram devido a variações genéticas, sazonalidade, localização geográfica, tempo de colheita e partes de plantas utilizadas para extração do óleo (Burt et al., 2004; Budri et al., 2015).

Os resultados de CIM e CBM mais baixos encontrados neste estudo sobre todos os microrganismos testados foram com os OECC e OETV. Resultados de forte atividade antibacteriana já foram descritos anteriormente utilizando esses mesmos óleos essenciais contra um amplo espectro de microrganismos. Naik et al. (2010), em um estudo utilizando o OECC sobre *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, observou maior atividade contra microrganismos Gram-positivos, além disso encontrou valores de CIM e CBM próximos. Entretanto, no presente estudo, não houveram diferenças sobre a atuação do OECC sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas também foram obtidos valores de CIM e CBM próximos,

evidenciando o potencial bactericida desse óleo. Zulfa et al (2016) constatou que o OECC apresentou uma CIM de 0,31 mg/ml e CBM de 1,25 mg/ml em relação a bactéria *S. aureus*, além disso o mesmo óleo atuou sobre *Bacillus cereus*, *K. pneumoniae* e sobre a espécie fúngica *Candida albicans*. Resultados semelhantes de CIM foram encontrados no presente estudo frente a *S. aureus* e sobre alguns isolados, foi determinado que a CIM seria ainda mais baixa do que o menor valor testado (<0,39 mg/ml). Já os valores de CBM para o OECC ficaram entre 0,39 e 1,562 mg/ml. Resultados de CIM superiores foram obtidos por Bassolé et al. (2011) contra *S. aureus* e inferiores para *E. faecalis* (2,5 mg/ml e 1 mg/ml, respectivamente). Esse mesmo autor ainda demonstrou um efeito sinérgico quando o OECC era misturado com o óleo de *Cymbopogon giganteus*, aumentando as propriedades antimicrobianas.

Em nosso estudo, o OETV apresentou baixas CIM e CBM, porém mais elevadas sobre a maioria dos isolados, em comparação ao OECC. Resultados promissores já foram observados anteriormente utilizando o OETV sobre microrganismos causadores de mastite subclínica (*S. aureus*, *S. chromogenes* e *S. uberis*) com **inibição bacteriana completa em concentrações $\geq 2\%$** (Mullen et al. 2014). A atividade desse óleo essencial também já foi descrita sobre *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* resistentes e sensíveis à metilina (Man et al., 2019). Nesse último estudo, a CIM para *Staphylococcus* resistentes e sensíveis à metilina foi a mesma (3,1%), semelhante aos nossos achados sobre a atuação dos óleos essenciais independentemente da resistência antimicrobiana fenotípica. É possível que a alta atividade antibacteriana do OETV seja atribuída, em partes, a presença do composto p-cimeno. Segundo Castro (2016), esse composto apresenta sinergismo com outros constituintes do óleo, favorecendo a atividade antimicrobiana. Já o constituinte majoritário encontrado no OETV, o timol, é reconhecido por sua alta eficácia antibacteriana (Dorman e Deans, 2000).

Valores de CIM variáveis entre 0,625 mg/ml e 2,5 mg/ml já foram observados no OEMP. Em nossos estudos, a CIM e CBM desse mesmo óleo foram mais altas para praticamente todos os microrganismos testados, menos *E. coli* (CIM 0,781 - 1,562 e CBM 1,562 mg/ml). Essa amplitude de resultados pode ser explicada pelos diferentes locais de coleta das folhas da planta, alterando sua composição fitoquímica (İscan et al, 2002). Observou-se, também, em testes de disco-difusão em ágar que a *M. piperita* tem capacidade de inibir o crescimento de bactérias pertencentes às espécies *S. aureus*, *E.coli* e *S. pyogenes*, considerando o composto menthol como responsável pela atividade antimicrobiana (Kizil et al, 2010).

O OELD é reconhecido por suas propriedades antimicrobianas e apresenta maior eficácia inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas, como a *S. aureus*. (Prusinowska e Śmigielski, 2014). Em nosso estudo, o OELD não variou drasticamente entre Gram-positivos e Gram-negativos, porém para *K. variicola*, não foi possível determinar a CBM, sendo então considerado apenas bacteriostático frente a esse microrganismo. Resultados de CIM abaixo dos nossos foram observados por Bouazama et al. (2017). Essa divergência pode ser explicada pelo diferente composto majoritário (cânfora, 50,3%) encontrado por esses autores. Em nosso estudo também detectamos a presença de cânfora, porém em concentrações menores (18,23%)

Em relação ao OEEG, não foi possível determinar a CIM e CBM contra *S. sciuri* e *E. faecalis*, nem a CBM sobre *K. variicola*. Embora tenha sido considerado o pior tratamento, há relatos de que o OEEG possa ser utilizado em combinação com antimicrobianos, pela capacidade de aumentar a penetração cutânea de anti-sépticos devido à ação de seu composto majoritário, o 1,8-cineol, podendo atuar em em sinergismo com drogas convencionais, aumentando a porcentagem de eliminação de microrganismos presentes na pele como o *S. epidermidis* (Solórzano-Santos & Miranda-Novales, 2012).

De acordo com Van Vuuren e Rapper (2020), as bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular mais complexa quando comparadas às bactérias Gram-positivas, tornando-as mais resistentes aos efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais. No nosso estudo, entretanto, essas diferenças estruturais pareceram não interferir, assim como a resistência antimicrobiana fenotípica presente nesses isolados.

A microdiluição é frequentemente o método de escolha para avaliar a atividade antimicrobiana de óleos e extratos vegetais (Golus et al., 2016). Contudo, envolve muitas dificuldades e está frequentemente associado à interpretação incorreta dos resultados (Golus et al., 2016). Apesar desse método ser considerado mais acurado para derivados vegetais em comparação à técnica de disco-difusão, ele ainda apresenta desvantagens, como a dificuldade de determinação da CIM devido à interferência de compostos turvos ou altamente coloridos, tornando imprecisas as medições visuais ou espectrofotométricas, se não totalmente impossíveis (Tan e Lin, 2015). Por isso, os métodos de indicadores colorimétricos, como a resazurina, são uma solução alternativa para esse problema e também ajudam a minimizar a ambiguidade da observação visual (Ncube et al., 2008; Tan e Lin, 2015). No presente estudo, foi possível perceber a interferência que a coloração dos óleos essenciais têm na leitura da OD, principalmente nas concentrações mais altas. Esse comportamento foi observado especialmente no OETV. Sem a adição de resazurina, a comparação deste com os demais óleos essenciais seria impossível.

A presença de patógenos resistentes aos antimicrobianos na mastite bovina é um entrave para a bovinocultura leiteira. Os óleos essenciais são uma fonte potencialmente útil de compostos antimicrobianos e podem ser alternativas frente a microrganismos resistentes. Porém, os resultados de diferentes estudos são difíceis de comparar, principalmente devido aos diferentes métodos escolhidos, diferenças nas cepas bacterianas testadas, solventes e variedades de agentes antimicrobianas utilizados (Stojković et al., 2013). Devido a isto, o

presente estudo buscou realizar sua metodologia embasada em metodologias consensuais encontradas na literatura, agregando microrganismos variados e caracterizando os compostos presentes nos óleos essenciais.

CONCLUSÕES

Uma alta atividade antibacteriana foi encontrada nos OECC e OETV, enquanto uma atividade moderada foi observada no OELD e OEMP. Além disso, esses derivados vegetais parecem atuar independentemente da resistência fenotípica encontrada nesses microrganismos. Esses achados são promissores pela possibilidade desses compostos naturais serem utilizados no controle de patógenos resistentes da mastite bovina. Contudo, são necessários mais estudos acerca da citotoxicidade e aplicação desses óleos.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, código financeiro 001.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 5. Descrição completa dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *M. x piperita* analisados através de GC-MS e CG-FID

IR (min)	LRI		Provável composto	Área (%)
	FID	Literatura		
14,257	1020,441	1022	a-pineno	0,81
18,909	1106,629	1108	b-pineno	1,23
19,765	1122,261	1120	sabineno	0,64
22,304	1168,627	1166	mirreno	0,38
23,026	1181,812	1188	a-terpineno	0,24
24,067	1200,868	1199	limoneno	2,08
24,455	1208,348	1210	1.8-cineol	7,3
26,130	1240,640	1240	g-terpineno	0,51
26,621	1250,106	1251	cis-b-ocimeno	0,42
27,005	1257,509	1254	o-cimeno	0,12
33,843	1395,882	1395	nonanal	0,24
37,205	1470,055	1465	isomentona	1,03
37,386	1474,064	1478	mentofurano	16,3
38,323	1494,817	1491	citronelal	10,61
38,638	1501,906	1486	dl mentona	1,98
40,194	1538,527	1521	b-cubebeno	0,31
40,783	1552,389	1551	linalol	0,33
41,626	1572,229	1561	acetato de mentila	6,33
42,392	1590,257	1588	formiato de bornila	0,23
42,995	1604,716	1604	b-cariofileno	3
43,218	1610,279	1612	terpinen-4-ol	0,72
43,283	1611,901	1612	acetato de neoisomentila	1,08
44,335	1638,149	1646	neoisomentol	0,6
44,785	1649,376	1652	L-mentol	38,54
45,262	1661,277	1665	pulegona	1,61
45,764	1673,802	1672	g-selineno	0,13
45,847	1675,873	1675	criptona	0,19
46,078	1681,637	1680	butirato de linalila	0,19
47,053	1706,276	1710	a-terpineol	0,26
47,749	1724,554	1726	gamacreno-d	1,06
48,477	1743,671	1743	piperitona	0,31
48,698	1749,475	1749	carvona	0,15
58,818	2105,327	2104	viridiflorol	0,26

Tabela 6. Descrição completa dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *C. citratus* analisados através de GC-MS e CG-FID

IR (min)	LRI		Provável composto	Área (%)
	FID	Literatura		
22,330	1169,102	1166	mirreno	24,67
26,101	1240,081	1240	g-terpineno	0,43
26,979	1257,008	1254	o-cimeno	0,27
31,350	1344,300	1345	6-metil-5-hepten-2-ona	0,93
34,795	1416,678	1410	fenchona	0,18
35,309	1428,062	1422	a-tujona	0,18
39,348	1518,616	1531	cânfora	0,16
40,754	1551,706	1551	linalol	0,72
40,960	1556,554	1554	acetato de bornila	0,45
42,076	1582,819	1579	a-cedreno	0,41
43,027	1605,514	1604	b-cariofileno	0,34
46,586	1694,311	1692	neral	26,57
48,565	1745,982	1744	geranial	40,91
49,280	1764,758	1765	g-cadineno	0,17
49,505	1770,667	1766	acetato de geranila	0,21
51,257	1817,585	1810	nerol	0,2
52,547	1853,309	1853	geraniol	1,91
63,670	2359,971	2347	ácido gerânico	0,12

Tabela 7. Descrição completa dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *T. vulgaris* analisados através de GC-MS e CG-FID

IR (min)	LRI		Provável composto	Área (%)
	FID	Literatura		
14,752	1029,623	1025	a-tujeno	0,35
19,153	1111,085	1108	b-pineno	2,2
20,196	1130,131	1128	3-careno	1,53
21,501	1153,963	1149	4-careno	0,51
21,982	1162,747	1160	a-felandreno	1,16
24,745	1213,939	1210	1.8-cineol	9,89
26,391	1245,672	1270	p-cimeno	24,65
36,169	1447,110	1444	cis-óxido de limoneno	1,01
36,859	1462,392	1460	1-octen-3-ol	0,68
40,642	1549,070	1551	linalol	2,92
43,006	1604,990	1604	b-cariofileno	0,57
43,163	1608,907	1612	terpinen-4-ol	0,88
47,008	1705,095	1704	ledeno	0,24
47,251	1711,476	1715	borneol	0,94
52,589	1854,472	1853	geraniol	1,23
56,966	2006,897	2008	óxido de cariofileno	0,26
60,228	2182,757	2153	espatulenol	0,2
60,575	2201,750	2187	timol	44,17
60,926	2220,361	2225	carvacrol	0,15
61,167	2233,139	2233	d-cadinol	2,13

Tabela 8. Descrição completa dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *L. dentata* analisados através de GC-MS e CG-FID

IR (min)	LRI		Provável composto	Área (%)
	FID	Literatura		
14,252	1020,349	1022	a-pineno	1,67
16,602	1063,940	1065	canfeno	0,72
18,904	1106,538	1108	B-pineno	2,5
19,756	1122,096	1120	sabineno	0,16
24,075	1201,022	1199	limoneno	1,38
24,535	1209,890	1210	1.8-cineol	45,22
27,973	1276,171	1270	p-cimeno	0,4
34,269	1405,028	1410	fenchona	14,62
36,226	1448,372	1441	Cis-óxido de linalol	0,47
37,533	1477,320	1478	Trans-óxido de linalol	0,35
38,595	1500,894	1485	canfonelal	0,15
39,803	1529,325	1531	cânfora	18,23
40,771	1552,106	1551	linalol	0,86
42,059	1582,419	1579	acetato de lavandulila	0,4
42,468	1592,045	1597	fenchol	3,37
43,273	1611,652	1612	terpinen-4-ol	0,36
44,578	1644,212	1639	mirtenal	0,77
45,505	1667,340	1662	acetato de trans-pinocarvila	1,31
46,061	1681,213	1682	lavandulol	0,64
46,283	1686,751	1686	formiato de geranila	1,07
47,041	1705,961	1704	ledeno	0,62
47,292	1712,553	1710	a-terpineol	0,55
47,690	1723,004	1720	b-bisaboleno	0,23
48,183	1735,951	1735	a-muroleno	0,31
48,461	1743,251	1748	A-selineno	0,11
48,729	1750,289	1749	carvona	0,48
50,607	1799,606	1794	cuminal	0,38
50,770	1804,099	1807	mirtenol	0,55
52,280	1845,915	1838	Cis-carveol	0,3
52,821	1860,897	1877	Trans-carveol	0,28
56,949	2005,995	2008	óxido de cariofileno	0,28
57,193	2018,939	2021	pirelol	0,1
59,066	2118,946	2104	viridiflorol	0,12
61,669	2259,756	2249	b-eudesmol	0,22

Tabela 9. Descrição completa dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *E. grandis* analisados através de GC-MS e CG-FID

IR (min)	LRI		Provável composto	Área (%)
	FID	Literatura		
14,260	1020,497	1022	a-pineno	8,21
18,895	1106,373	1108	b-pineno	0,18
22,211	1166,928	1166	mirreno	0,19
22,288	1168,335	1166	mirreno	0,28
24,072	1200,964	1199	limoneno	2,61
24,540	1209,987	1210	1.8-cineol	76,91
27,965	1276,017	1270	p-cimeno	0,46
40,763	1551,918	1551	linalol	0,23
42,051	1582,231	1579	a-cedreno	0,38
43,265	1611,452	1612	terpinen-4-ol	0,18
43,584	1619,411	1618	dihidrocarvona	0,24
45,496	1667,116	1665	pulegona	0,62
47,049	1706,171	1704	ledeno	5,05
48,500	1744,275	1744	geranial	0,17
50,929	1808,502	1807	mirtenol	0,2
57,387	2029,231	2030	ledol	0,23
58,620	2094,642	2070	globulol	1,25
58,806	2104,668	2104	viridiflorol	0,19

REFERÊNCIAS

1. Aiemsaard, J., S. Aiumlamai, C. Aromdee, S. Taweechaisupapong, and W. Khunkitti. 2011. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. Res. Vet. Sci. 91:e31–e37. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.01.012>.
2. Alzogaray, R. A., A. Lucia, E. N. Zerba, and H. M. Masuh. 2011. Insecticidal activity of essential oils from eleven *Eucalyptus* spp. and two hybrids: lethal and sublethal effects of their major components on *Blattella germanica*. J. Econ. Entomol. 104: 595–600. <https://doi.org/10.1603/ec10045>.

3. Bassolé, I.H.M., A. Lamien-Meda, B. Bayala, L. C. Obame, A. J. Ilboudo, C. Franz, J. Novak, R. C. Nebié, and M. H. Dicko. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*. 18: 1070-1074. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.05.009>.
4. Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493–496.
5. Borugă, O, C. Jianu, C. Mișcă, I. Golet, A. T. Gruia, and F. G. Horhat. 2014. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *J. Med. Life.* 3:56–60.
6. Bouazama, S., Harhar, H., Costa, J., Desjobert, J.M., Talbaoui, A., Tabyaoui, M. 2017. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Lavandula pedunculata* and *Lavandula dentata*. *J. Mater. Environ. Sci.* 8: 2154-2160.
7. Budri, P. E., N. C. C. Silva, E. C. R. Bonsaglia, A. Fernandes Júnior, J. P. Araújo Júnior, J. T. Doyama, J. L. Gonçalves, M. V. Santos, D. Fitzgerald-Hughes, and V. L. M. Rall. 2015. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *J. Dairy Sci.* 98:5899–5904. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9442>.
8. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.

9. Castro, K. N. de C., D. F. Lima, L. C. Vasconcelos, R. C. Santos, A. M. L. Pereira, F. H. dos S. Fogaça, K. M. Canuto, E. S. de Brito, and R. M. Calvet. 2016. Composição química e eficácia do óleo essencial e do extrato etanólico de *Alpinia zerumbet* sobre *Staphylococcus aureus*. Arq. Inst. Biol. 83:1–7. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000192014>.
10. Cerioli, M. F., M. V. Moliva, L. N. Cariddi, and E. B. Reinoso. 2018. Effect of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling and limonene on biofilm production in pathogens causing bovine mastitis. Front. Vet. Sci. 5:146. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00146>.
11. Chajęcka-Wierzchowska, W., A. Zadernowska, and M. García-Solache, M. 2020. Ready-to-eat dairy products as a source of multidrug-resistant *Enterococcus* strains: Phenotypic and genotypic characteristics. J. Dairy Sci. 103: 4068–4077. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17395>.
12. Chehabi, C. N., B. Nonnemann, L. B. Astrup, M. Farre, and K. Pedersen. 2019. *In vitro* antimicrobial resistance of causative agents to clinical mastitis in Danish dairy cows. Foodborne Pathog. Dis. 1–11. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2560>.
13. Cheng, J., W. Qu, H. W. Barkema, D. B. Nóbrega, J. Gao, G. Liu, J. D. Buck, J. P. Kastelic, H. Sun, and B. Han. 2019. Antimicrobial resistance profiles of 5 common bovine mastitis pathogens in large Chinese dairy herds. J. Dairy Sci. 102: 1–12. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15135>.
14. CLSI. 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved Standard. 30th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

15. CLSI. 2018. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. 11th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
16. Coban, A. Y. 2012. Rapid determination of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates by colorimetric methods. *J. Clin. Microbiol.* 50:2191–2193. <https://doi.org/10.1128/JCM.01825-12>.
17. Correa, M. S., J. Schwambach, M. B. Mann, J. Frazzon, and A. P. G Frazzon. 2019. Antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil from dried leaves of *Eucalyptus staigeriana*. *Arq. Inst. Biol.* 86: e0202018. <https://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000202018>.
18. Cunha, A. F., H. M. Andrade, F. N. Souza, L. C. Fialho Júnior, D. L. S. O. Rosa, E. M. Ramos Sanchez, M. Gidlund, H. Goto, M. A. V. P. Brito, A. S. Guimarães, A. P. Lage, L. C. Reis, A. M. M. P. Della Libera, M. B. Heinemann, and M. M. O. P. Cerqueira. 2020. Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy and infected dairy cows with a distinct mastitis history and vaccinated with a polyvalent mastitis vaccine. *J. Dairy Sci.* 103. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17084>.
19. Dal Pozzo, M., D. F. Santurio, L. Rossatto, A. C Vargas, S. H. Alves, E. S. Loreto, and J. Viegas. 2011. Activity of essential oils from spices against *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63, 1229–1232.
20. Dorman, H. J.; S. G. Deans. 2008. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308-316. <https://doi.org/10.1046/j.13652672200000969.x>
21. Fratini, F., S. Casella, S., M. Leonardi, F. Pisseri, V. V. Ebani, L. Pistelli, and Pistelli, L. 2014. Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of

- their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. *Fitoterapia* 96: 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.04.003>.
22. Gonçalves, C. L., D. B. A. Schiavon, F. V. Mota, A. Faccin, R. N. Schubert, G. Schiedeck, and L. F. D. Schuch. 2013. Actividad antibacteriana de los extractos de *Cymbopogon citratus*, *Elionurus* sp. y *Tagetes minuta* contra bacterias que causan mastitis. *Rev. Cubana Plant. Med.* 18:487–494.
23. Golus, J., Sawicki, R., Widelski, J., Ginalska, G. The agar microdilution method – a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 121: 1291-1299. <https://doi.org/10.1111/jam.13253>.
24. Kalemba, D., Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10: 813-829.
25. Kim, S. -J., D. C. Moon, S. -C. Park, H. Y. Kang, S. H. Na, and S. -K. Lim. 2019. Antimicrobial resistance and genetic characterization of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk samples in Korea. *J. Dairy Sci.* 102:11439–11448. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17028>.
26. Kizil. S.; Hasimi, N.; Tolan, V.; Kilinc, E.; Yuksel, U. 2010. Mineral content, essential oil components and biological activity of two mentha species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.). *Turk. J. Field Crops* 15: 148-53.
27. Işcan, G., N. Kirimer, M. Kürküçlü, H. C. Başer, and F. Dermirci, F. 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 14: 3943-3946. <https://doi.org/10.1021/jf011476k>.
28. Li, L., L. Zhou, L. Wang, H. Xue, and X. Zhao. 2015. Characterization of methicillin-resistant and susceptible staphylococcal isolates from bovine milk in northwestern China. *PLoS ONE* 10:e0116699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116ManMan699>.

29. Lucia A., G.A. Audino, E. Seccacini, S. Licastro, E. Zerba, and H. Masuh. 2007. Larvicidal effect of *Eucaliptus grandis* and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.* 3:299-303.
30. Machado, B.F.M.T., and A. F. Junior. 2011. Óleos essenciais: aspectos gerais e uso em terapias naturais. *Cad. Acad.* 3: 105-127
31. Man, A., L. Santacroce, R. Jacob, A. Mare, and L Man. 2019. Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study. *Pathogens* 8: 15. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010015>.
32. Martins, R. de P., R. A. da S. Gomes, A. C. G. Malpass, and M. H. Okura. 2019. Chemical characterization of *Lavandula dentata* L. essential oils grown in Uberaba-MG. *Cienc. Rural* 49: e20180964. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180964>.
33. Medeiros, E. S., R. A. Mota, M. V. Santos, M. F. L. Freitas, J. W. Pinheiro Júnior, and J. A. A. 2009. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesq. Vet. Bras.* 29:569–574. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000700012>.
34. Mesquita, A. A., C. M. B. M. Rocha, F. R. P. Bruhn, D. A. C. Custódio, M. S. Braz, S. M. Pinto, D. B. Silva, and G. M. Costa. 2019. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 39:308–316. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5821>.
35. Minst, K., E. Märtilbauer, T. Miller, and C. Meyer. 2012. Short communication: *Streptococcus* species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. *J. Dairy Sci.* 95: 6957–6962. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5852>.

36. Montironi, I. D., L. N. Cariddi, and E. B. Reinoso. 2016. Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Rev. Argent. Microbiol.* 48:210–216.
37. Mullen, K.A.E., Lee, A.R., Lyman, R.L., Mason, S.E., Washburn S.P., Anderson K.L. 2014. Short communication: An *in vitro* assessment of the antibacterial activity of plant-derived oil. *J. Dairy Sci.* 97: 5587-5591. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7806>.
38. Msaada, K., N. Salem, S. Tammar, M. Hammami, M. Jamal Saharkhiz, N. Debiche, F. Limam, and B. Marzouk. 2012. Essential oil composition of *Lavandula dentata*, *L. stoechas* and *L. multifida* cultivated in Tunisia. *J. Essent. Oil-Bear. Plants* 15: 1030–1039. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2012.10662608>.
39. Mullen, K.A.E., A. R. Lee, R. L. Lyman, S. E. Mason, S. P. Washburn, and K. L. Anderson. 2014. Short communication: An *in vitro* assessment of the antibacterial activity of plant-derived oil. *J Dairy Sci* 97:5587-5591 <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7806>.
40. Naik, M.I., B. A. Fomda, E. Jaykumar, and J. A. Bhat. 2010. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. *Asian Pacific J. Trop. Med.* 7: 535-538. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60129-0](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60129-0).
41. NMC. 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4.ed. National Mastitis Council, Verona, IT.
42. Ncube, N. S., A. J. Afolayan, and A. I. Okoh. 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and

- future trends. *Afric. J. Biotechnol.* 7: 1797-1806.
<https://doi.org/10.5897/AJB07.613>.
43. Nonnemann, B., U. Lyhs, L. Svennesen, K. A. Kristensen, I. C. Klaas, and K. Pedersen, K.2019. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* 102:1–10. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15424>.
44. Ogunwande, I. A., N. O. Olawore, K. A. Adeleke, and W. A. Konig. 2003. Chemical composition of the essential oils from the leaves of three *Eucalyptus* species growing in Nigeria. *J. Essent. Oil Res.* 15: 297–301.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9698595>.
45. Olayeme, R.F. 2017. Comparative study of root, stalk and leaf essential oils of *Cymbopogon citratus* (lemongrass). *Chem. Search J.* 8:20–28.
<http://dx.doi.org/10.4314/cs.v8i1.3>.
46. Pieterse, R., and Todorov, S. D. 2010. Bacteriocins – exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. *Braz. J. Microbiol.* 41:542–562.
<https://doi.org/10.1590/s1517-83822010000300003>.
47. Pitkälä, A., J. Koort, and J. Björkroth. 2008. Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. *J. Dairy Sci.* 91: 4075–4081. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1040>.
48. Porte, A., and R. Godoy. 2008. Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. (Thyme) essential oil from the Rio de Janeiro state, Brazil. *J. Serb. Chem. Soc.* 73: 307–310. <https://doi.org/10.2298/jsc0803307p>.
49. Prusinowska, R., and K. B. Śmigielski. 2014. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). A review. *Herba Polonica* 60: 2 <https://doi.org/10.2478/hepo-2014-0010>.

50. Ren, Q., G. Liao, Z. Wu, J. Lv, and W. Chen. 2020. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. *J. Dairy Sci.* 103:3368–3380. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17420>.
51. Ruegg, P. L. 2017. A 100-year review: Mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci.* 100:10381–10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>.
52. Sartoratto, A. A. L. M. Machado, C. Delarmelina, G. M. Figueira, M. C. T. Duarte, and V. L. G. Rehder. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 35: 275–280. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>.
53. Shabnum, S., and M. G. Wagay. 2011. Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. *J. Res. Dev.* 83–94.
54. Silva, E. R., A. M. G. Pereira, W. S. Moraes, K. R. Santoro, and T. R. M. Silva. 2012. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 13:701–711. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402012000300010>.
55. Soares, B. S., D. A. Melo, C. C. Motta, V. F. Marques, N. B. Barreto, S. M. O. Coelho, I. S. Coelho, and M. M. S. Souza. 2017. Characterization of virulence and antibiotic profile and agr typing of *Staphylococcus aureus* from milk of subclinical mastitis bovines in State of Rio de Janeiro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 69: 843–850. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9260>.
56. Solórzano-Santos, F., and M. G. Miranda-Novales. 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23:136-141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.005>.

57. Souza, W. P., C. L. Queigora, A. Sartoratto, and S. L. Honório. 2006. Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* (L.) Huds durante o período diurno em cultivo hidropônico. *Rev. Bras. Pl. Med.* 8: 108–111.
58. Soyngbe, O. S., A. Oyedeji, A. K. Basson, and A. R. Opoku. 2013. The essential oil of *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden inhibits microbial growth by inducing membrane damage. *Chin. Med.* 4: 7–14. <https://doi.org/10.4236/cm.2013.41002>.
59. Stojković, D.; J. Glamočlija, A. Ćirić, M. Nikolić, M. Ristić, J. Šiljegović, and M. Soković. 2013. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. *Arch. Biol. Sci.* 65: 639–643.
60. Tan, J.L., and Y. Y. Lim. 2015. Critical analysis of current methods for assessing the *in vitro* antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food Chem.* 172: 814–822. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.141>.
61. Taponen, S., and S. Pyorala. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet. Microbiol.* 134: 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.011>.
62. Titouche, Y., A. Hakem, K. Houali, T. Meheut, N. Vingadassalon, L. Ruiz-Ripa, D. Salmi, A. Chergui, N. Chenouf, J. A. Hennekinne, C. Torres, and F. Auvray. 2019. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST8 in raw milk and traditional dairy products in the TiziOuzou area of Algeria. *J. Dairy Sci.* 102: 6876–6884. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16208>.
63. Van Vuuren, S., and S. de Rapper. 2020. Odoriferous therapy: Identifying the antimicrobial potential of essential oils against pathogens of the respiratory tract. *Chem. Biodiversity.* <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000062>.

64. Viguier, C., S. Arora, N. Gilmartin, K. Welbeck, and R. O’Kennedy. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.* 27:486–493. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.05.004>.
65. Yadav, R. K., M. Singh, R. Subhadeep, S. Gautam, J. K. Rawat, L. Singh, M. N. Ansari, A. S. Saeedan, and G. Kaithwas. 2020. Short communication: Evaluation of α -linolenic acid-based intramammary nanosuspension for treatment of subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 103:2701–2706. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16239>.
66. Zenebon, O., N. S. Piepers, and P. Tiglia. 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4th ed. Instituto Adolfo Lutz: São Paulo. p. 888.
67. Zhang, S., S. Piepers, R. Shan, L. Cai, S. Mao, J. Zou, T. Sli, S. Vlieghe, and B. Han. 2018. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine clinical mastitis in 5 provinces of China. *J. Dairy Sci.* 101:3344–3355. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14031>.
68. Zulfa, Z., C. T. Chia, and Y. Rukayadi. 2016. *In vitro* antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) extracts against selected foodborne pathogens. *Intern. Food Res. J* 23: 1262-1267.

5 DISCUSSÃO GERAL

A mastite bovina é o principal entrave dos rebanhos leiteiros no mundo inteiro. A dificuldade do manejo está fortemente associada à resistência dos agentes causadores. O uso exacerbado de antimicrobianos e muitas vezes de forma empírica e incorreta, favorece o surgimento desta resistência. O diagnóstico precoce, a identificação e suscetibilidade *in vitro* do agente causador e tratamento adequado são fundamentais para um prognóstico positivo da doença (Langoni et al., 2017). Contudo, o resultado da suscetibilidade *in vitro* não garante o sucesso do tratamento, uma vez que muitos outros fatores podem interferir na eficácia do antimicrobiano, como sua penetração no foco da infecção, sua ação efetiva na presença de leite, bem como na presença de produtos resultantes da inflamação e processo infeccioso que alteram o pH local (Ribeiro, 2008).

Em relação aos agentes causadores de mastite bovina, os estafilococos são as bactérias mais comumente isoladas e os SCN são predominantes sobre *S. aureus* na maioria dos países (Taponen e Pyorala, 2009). O grupo dos SCN, tradicionalmente considerado como patógenos menores, pareciam não ter a capacidade de causar mastite grave (Taponen e Pyorala, 2009). Porém, em nosso estudo, encontramos grande prevalência de SCN resistentes e multirresistentes, os quais devem ser monitorados devido a possibilidade de transferência de genes de resistência através da troca de material genético entre as bactérias. Além disso, os SCN são associados a um aumento moderado da CCS, afetando negativamente a qualidade do leite (Taponen e Pyorala, 2009).

Em relação a *S. aureus*, é indicado o tratamento de longa duração ou terapia estendida. Essa prática tem melhorado a resposta ao tratamento em casos de mastite causadas por esse patógeno, no entanto, as taxas de cura ainda são baixas (30-50%) (Langoni et al., 2017). Devido a alta contagiosidade deste patógeno, sua persistência no

rebanho e custo em função ao tratamento, o descarte do animal com úbere colonizado tem sido priorizado a fim de controlar os casos de mastite em propriedades (Langoni et al., 2017).

A presença de patógenos GN em nosso estudo foi rara e conseqüentemente, a mastite clínica foi menos incidente. A característica silenciosa da mastite subclínica favorece sua disseminação no rebanho e ainda proporciona ao produtor uma falsa tranquilidade, em relação à ocorrência de mastite. No entanto, estima-se que para cada caso clínico ocorram 35 casos subclínicos (Fonseca e Santos, 2001; Lopes et al., 2012).

Como alternativa às terapias convencionais, os OEs mostraram-se promissores pela vasta atividade biológica descrita, dentre elas a atividade antibacteriana. As plantas de *C. citratus*, *T. vulgaris*, *E. grandis*, *L. dentata* e *M. x piperita* são amplamente pesquisadas por diferentes grupos de pesquisa da Universidade de Caxias do Sul, para os mais variados fins. Por esse motivo, foram escolhidas para serem utilizadas no presente estudo, visto que ainda não haviam sido testadas para controle de doenças na área veterinária.

Estudos futuros devem ser focados principalmente em métodos de extração em escala industrial, formulação de óleos essenciais em produtos concentrados e consistentes e melhores práticas para o uso de tais produtos (Isman et al., 2017). Além disso, alguns obstáculos no uso dos OEs devem ser vencidos como sua instabilidade frente à fatores abióticos, rápida evaporação e degradação dos componentes ativos (Chouhan et al., 2017).

A fim de transpor esses desafios, a nanotecnologia emerge como possibilidade. Alguns estudos demonstraram que o encapsulamento dos OEs em partículas nanométricas potencializam a atividade antimicrobiana devido ao aumento da estabilidade e solubilidade química, diminuição da evaporação e degradação dos componentes ativos, além de liberação controlada e sustentada, aumentando a biodisponibilidade (Chouhan et al., 2017).

Por esse motivo, essa tecnologia emergente pode vir a ser utilizada em formulações utilizando OEs, com o objetivo de controlar os patógenos da mastite bovina.

6 CONCLUSÕES

Em municípios pertencentes à região da Serra Gaúcha, os agentes causadores da mastite bovina pertencem, na maioria, ao gênero *Staphylococcus*. Foi possível observar um perfil preocupante de resistência, além da presença de microrganismos multirresistentes. Por isso, a busca por tratamentos alternativos é urgente e os óleos essenciais mostraram-se fortes candidatos, principalmente os óleos essenciais de capim-limão e tomilho, por atuarem como bactericidas e bacteriostáticos, além de agirem independentemente da resistência fenotípica apresentada por essas bactérias. Contudo, ainda há um longo caminho a ser percorrido acerca da viabilidade desses derivados vegetais no leite, pesquisas sobre citotoxicidade e forma de aplicação.

7 PERSPECTIVAS

I– Testar blends dos óleos essenciais de capim-limão e tomilho.

II –Testar os componentes majoritários presentes nos óleos essenciais isoladamente e em combinações.

III –Nanoencapsular esses óleos e avaliar a atividade antibacteriana novamente e a estabilidade no ambiente.

IV– Desenvolver uma formulação de *dipping* utilizando óleos essenciais.

8 REFERÊNCIAS

1. Aćimović, M.; Čabarkapa, I.; Cvetković, M.; Stanković, J.; Kiprovski, B.; Gvozdenac, S.; Puvača, N. (2019). *Cymbopogon citratus* (DC.) STAPH: Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities, use in medicinal and cosmetic purpose. *J. Agron. Technol. Eng. Manag.* 2: 344-360.
2. Albrihy, J.L.; Tuckey, S.L.; Woods, G.T. (1961). Antibiotics in milk; A review. *J. Dairy Sci.* 44: 779-807.
3. Amber, R.; Adnan, M.; Tariq, A.; Khan, S.N.; Mussarat, S.; Hashem, A.; Al-Huail, A.A.; Al-Arjani, A.F. (2018). Antibacterial activity of selected medicinal plants of northwest Pakistan traditionally used against mastitis in livestock. *Saudi J. Biol. Sci.* 25: 154-161.
4. Andrews, A.H.; Blowey, R.W.; Boyd, H.; Eddy, R.G. (2008). *Medicina bovina: doenças e criação de bovinos.* 2 ed. São Paulo: Roca. 1080p.
5. Arakawa, T.; Osawa, K. (2000). Pharmacological study and application to food of mint flavour – antibacterial and anti allergic principles. *Aroma Res.* 1: 20-23
6. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446-475.
7. Bakkeren, E.; Diard, M.; Hardt, W. (2020). Evolutionary causes and consequences of bacterial antibiotic persistence. *Nat. Rev. Microbiol.*
8. Bassolé, I.H.N.; Lamien-Meda, A.; Bayala, B.; Obame, L.C.; Ilboudo, A.J.; Franz, C.; Novak, J.; Nebié, R.C.; Dicko, M.H. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine* 18: 1070-1074.

9. Barbosa, L.C.; Filomeno, C.A.; Teixeira, R.R. (2016). Chemical variability and biological activities of *Eucalyptus* spp. essential oils. *Molecules* 21: 1671.
10. Barreiros, R.M.; Gonçalves, J.L.M.; Sansígolo, C.A.; Poggiani, F. (2007). Modificações na produtividade e nas características físicas e químicas da madeira de *Eucalyptus grandis* causadas pela adubação com lodo de esgoto tratado. *R. Árvore* 31: 103-111.
11. Batista-Pereira, L.G.; Fernandes, J.B.; Silva, M.F.G.F.; Vieira, P.C.; Bueno, O.C.; Corrêa, A.G. (2006). Electrophysiological responses of *Atta sexdensrubropilosa* workers to EOs of *Eucalyptus* and its chemical composition. *Z. Naturforsch.* 61:749–755.
12. Beesley, A.; Hardcastle, J.; Hardcastle, P.T.; Taylor, C.J. (1996). Influence of peppermint oil on absorptive and secretory processes in rat small intestine. *Gut* 39: 214-219.
13. Bobbo, T.; Ruegg, P.L.; Stocco, G.; Fiore, E.; Giancesella, M.; Morgante, M.; Cecchinato, A. (2017). Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100: 4868-4883.
14. Boukhatem, M.N.; Ferhat, M.A.; Kameli, A.; Saidi, F.; Kebir, H.T. (2014). Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J. Med.* 9: 25431.
15. Bouazama, S.; Harhar, H.; Costa, J.; Desjobert, J.M.; Talbaoui, A.; Tabyaoui, M. (2017). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Lavandula pedunculata* and *Lavandula dentata*. *J. Mater. Environ. Sci.* 8: 2154-2160.

16. Bragg, R.R.; Meyburgh, C.M.; Lee, J.-Y.; Coetzee, M. (2018). Potential treatment options in a post-antibiotic era. *Infect. Dis. Nanomed.* III 51-61.
17. Brauner, A.; Fridman, O.; Gefen, O.; Balaban, N.Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* 14:320-330.
18. Brody, T.; Yavatkar, A.S., Lin, Y., Ross, J.; Kuzin, A.; Kundu, M.; Fann, Y.; Odenwald, W.F. (2008). Horizontal gene transfers link a human mrsa pathogen to contagious bovine mastitis bacteria. *PLoS ONE* 3: e3074.
19. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.
20. Cameron, M.; Keefe, G.P.; Roy, J.-P.; Stryhn, H.; Dohoo, I.R.; McKenna, S.L. (2015). Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Milk yield and somatic cell count in the subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 98: 2427-2436.
21. Campos, O.F.; Lizieire, R.S. (1993). Gado de leite: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, p.214, 1993
22. Castro, K.N. de C.; Lima, D.F.; Vasconcelos, L.C.; Santos, R.C.; Pereira, A.M.L.; Fogaça, F.H. dos S.; Canuto, K.M.; Brito, E.S. de; Calvet, R.M. (2016). Composição química e eficácia do óleo essencial e do extrato etanólico de *Alpinia zerumbet* sobre *Staphylococcus aureus*. *Arq. Inst. Biol.* 83, 1–7.
23. Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A.; García-Solache, M. (2020). Ready-to-eat dairy products as a source of multidrug-resistant *Enterococcus* strains: Phenotypic and genotypic characteristics. *J. Dairy Sci.* 103.

24. Cheng, J.; Qu, W.; Barkema, H.W.; Nobrega, D.B.; Gao, J.; Liu, G.; Buck, J.D.; Kastelic, J.P.; Sun, H.; Han, B. (2019). Antimicrobial resistance profiles of 5 common bovine mastitis pathogens in large Chinese dairy herds. *J. Dairy Sci.* 102: 1-12.
25. Chouhan, S.; Sharma, K.; Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—Present status and future perspectives. *Medicines* 4:1-21.
26. Clifford, C.B.; Pritchett-Corning, K.R. (2012). Bacterial infections of laboratory mice. *The Laboratory Mouse* 481–501.
27. Cohen, N.R.; Lobritz, M.A.; Collins, J.J. (2013). Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe*. 13: 632-642.
28. Cohen, S.M.; Eisenbrand, G.; Fukushima, S.; Gooderham, N.J.; Guengerich, F. P.; Hecht, S.S.; Rietjens, I.M.C.M.; Bastaki, M.; Davidsen, J.M.; Harman, C.L.; McGowen, M.M.; Taylor, S.V. (2019). FEMA GRAS assessment of natural flavor complexes: Mint, buchu, dill and caraway derived flavoring ingredients. *Food Chem. Toxicol.* 110870.
29. Coser, S.M.; Lopes, M.A.; Costa, C.M. (2012). Mastite bovina: Controle e prevenção. *Boletim Técnico UFLA, Lavras*, n. 93, 1-30.
30. Costa, G.M.; Mesquita, A.A.; Rocha, C.M.B.M.; Bruhn, F.R.P.; Andrade, R.S.; Custódio, D.A.C.; Braz, M.S.; Pinto, S.M. (2019). Risk factors for high bulk milk somatic cell counts in dairy herds from Campos das Vertentes region, Minas Gerais State, Brazil: a case-control study. *Pesq. Vet. Bras.* 39:606-613.
31. Côté-Gravel, J.; Malouin, F. (2018). Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. *J. Dairy Sci.* 102:1-14.

32. D'Costa, V. M.; King, C.E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W.W.L.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R.; Golding, G.B.; Poinar, H.N.; Wright, G.D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477:457-461.
33. de Sá, J.P.N.; Figueiredo, C.H.A.; Neto, O.L.S.; Roberto, S.B.A.; Gadelha, H.S.; Alencar, M.C.B. (2018). Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva de leite. *Rev. Bras. Gest. Ambient.* 12: 8-20.
34. De Vliegheer, S.; Ohnstad, I.; Piepers, S. (2018). Management and prevention of mastitis: A multifactorial approach with a focus on milking, bedding and data-management. *J. Integr. Agric.* 17: 1214-1233.
35. Derakhshani, H.; Fehr, K.B.; Sepehri, S.; Francoz, D.; De Buck, J.; Barkema, H.W.; Plaizier, J.C.; Khafipour, E. (2018). Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *J. Dairy Sci.* 101: 1-21.
36. Diaz, M.A.N.; Rossi, C.C.; Mendonça, V.R.; Silva, D.M.; Ribon, A. de O.B.; Aguilar, A.P.; Muñoz, G.D. (2010). Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2520: 724-728.
37. dos Santos, E.M.P.; Brito, M.A.V.P.; Lange, C.; Brito, J.R.F.; Cerqueira, M.M.O.P. (2007). *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. *Acta Sci. Vet.* 35: 17-27.
38. Elaissi, A.; Rouis, Z.; Salem, N.A.B.; Mabrouk, S.; ben Salem, Y.; Salah, K.B.H.; Aouni, M.; Farhat, F.; Chemli, R.; Harzallah-Skhiri, F.; Khouja, M.L. (2012). Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of

- their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC Complement. Altern. Med.* 12: 81.
39. Estanislau, A.A.; Barros, F.A.S.; Peña, A.P.; Santos, S.C.; Ferri, P.H.; Paula, J.R. (2001). Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. *Rev. Bras. Farmacogn.* 11:95–100.
40. EzzatAlnakip, M., Quintela-Baluja, M.; Böhme, K.; Fernández-No, I.; Caamaño-Antelo, S.; Calo-Mata, P.; Barros-Velázquez, J. (2014). The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *J. Vet. Med.* 1-31.
41. FDA. (2019). Code of Federal Regulations Title21: Part 182 - Substances generally recognized as safe:sec. 182.20. Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates). **Disponível (online):** https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#se21.3.182_120 (7 de abril).
42. Freitas, C.H.; Mendes, J.F.; Villarreal, P.V.; Santos, P.R.; Gonzales, C.L.; Nascentes, P.S. (2018). Identificação e perfil de suscetibilidade antimicrobiana de bactérias causadoras de mastite bovina em propriedades leiteiras de Pelotas, Rio Grande do Sul. *Braz. J. Biol.* 78: 661-666.
43. Fonseca, L.F.L.; Santos, M.V. (2001). **Qualidade do leite e controle da mastite.** 1 ed. São Paulo: Lemos. 314p.
44. Galeotti, N.; Ghelardini, C.; di Cesare Mannelli, L.; Mazzanti, G.; Baghiroli, L.; Bartolini, A. (2001). Local anaesthetic activity of (+)- and (-)-menthol. *Planta Med.* 67: 174–176.

45. Gasparin, P.P.; Alves, N.C.C.; Christ, D.; Coelho, S.R.M. (2014). Qualidade de folhas e rendimento de óleo essencial em hortelã pimenta (*Mentha x Piperita* L.) submetida ao processo de secagem em secador de leito fixo. Rev. Bras. Pl. Med. 16: 337-344.
46. Geromini, K.V.N.; Roratto, F.B.; Ferreira, F.G.; Polido, P.P.; Souza, S.G.H.; Valle, J.S.; Colauto, N.B.; Linde, G.A. (2012). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. Arq. Ciênc. Vet. Zool. 15: 127-131.
47. Giguère, F.; Prescott, J.F.; Dowling, P.M. (2013). **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**. 5 ed. New Jersey: John Wiley & Sons. 22p.
48. Gonçalves, S.; Romano, A. (2013). In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 31: 166–174.
49. Gouvea, F. dos S.; Rosenthal, A.; Ferreira, E.H. da R. (2017). Plant extract and essential oils added as antimicrobials to cheeses: a review. Cienc. Rural 47: e20160908.
50. Griffioen, K.; Hop, G.E.; Holstege, M.M.C.; Velthuis, A.G.J.; Lam, T.J.G.M. (2016). Dutch dairy farmers' need for microbiological mastitis diagnostics. J. Dairy Sci. 99:5551-5561.
51. Grumezescu, A.M.; Chifiriuc, C.M.; Marinaş, I.; Saviuc, C.; Mihaiescu, D.; Lazăr, V. (2012). *Ocimum basilicum* and *Mentha piperita* essential oils influence the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains. Lett. Appl. Nanobiosci. 1: 14-17.
52. Guerra, S.T.; Orsi, H.; Joaquim, S.F.; Guimarães, F.F.; Lopes, B.C.; Dalanezi, F.M.; Leite, D.S.; Langoni, H.; Pantoja, J.C.F; Rall, V.L.M.; Hernandez, R.T.; Lucheis, S.M.; Ribeiro, M.G. (2020). Short communication: Investigation of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes, bacterial motility, and multidrug

- resistance pattern of strains isolated from dairy cows with different severity scores of clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 103.
53. Hawthorn, M.; Ferrante, J.; Luchowski, E.; Rutledge, A.; Wei, X.Y.; Triggler, D.J. (1988). The actions of peppermint oil and menthol on calcium channel dependent processes in intestinal, neuronal and cardiac preparations. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2: 101-118.
54. Heikkilä, A.-M.; Liski, E.; Pyörälä, S.; Taponen, S. (2018). Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 101:9493–9504.
55. Hillerton, E.; Bryan, M.; Biggs, A.; Berry, E.; Edmondson, P. (2017). Time to standardise dry cow therapy terminology. *Vet. Rec.* 180: 301-302.
56. Hosseinzadeh, S.; Jafarikukhdan, A.; Hosseini, A.; Armand, R. (2015). The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: A review of *Thymus vulgaris*. *Int. J. Clin. Med.* 6: 635-642.
57. İşcan, G.; Kirimer, N.; Kürkcüoğlu, M.; Başer, H.C.; Demirci, F. (2002). Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3943-3946.
58. Isman, M. B. (2017). Bridging the gap: Moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. *Ind. Crops Prod.* 110: 10-14.
59. Justus, B.; Almeida, V.P.; Gonçalves, M.M.; Assunção, D.P.S.F.; Borsato, D.M.; Arana1, A.F.M.; Maia, B.H.L.N.S.; de Paula, J.F.P.; Budel, J.M.; Farago, P.V. (2018). Chemical composition and biological activities of the essential oil and anatomical markers of *Lavandula dentata* L. cultivated In Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 61: e18180111.
60. Kim, S.-J.; Moon, D.C.; Park, S.-C.; Kang, H.Y.; Na, S.H.; Lim, S.-K. (2019). Antimicrobial resistance and genetic characterization of coagulase-negative

- staphylococci from bovine mastitis milk samples in Korea. *J. Dairy Sci.* 102: 11439-11448.
61. Kizil, S.; Hasimi, N.; Tolan, V.; Kilinc, E.; Yuksel, U. (2010) Mineral content, essential oil components and biological activity of two mentha species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.). *Turk. J. Field Crops* 15:148-53.
62. Kurosawa, L.S.; Cézar, L.M.L.; Marques, F.A.; Oriani, M.R.G.; Araújo, M.E.M. (2020). Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. associado à mastite bovina. *Pubmev* 14:1-6.
63. Landers, T.F.; Cohen, B.; Wittum, T.E.; Larson, E.L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potencial. *Public Health Rep.* 127: 4-22.
64. Langoni, H.; Salina, A.; Oliveira, G.C.; Junqueira, N.B.; Menozzi, B.D.; Joaquim, S.F. (2017). Considerações sobre os tratamentos das mastites. *Pesq. Vet. Bras.* 37: 1261-1269.
65. Lee, A.; de Lencastre, H.; Garau, J.; Kluytmans, J.; Malhotra-Kumar, S.; Peschel, A.; Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* 4: 18033.
66. Leelahapongsathon, K.; Schukken, Y.H.; Srithanasuwan, A.; Suriyasathaporn, W. (2020). Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* intramammary infections: Persistent and transient patterns of infection in a dairy herd. *J. Dairy Sci.* 103.
67. Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 999-1007.
68. Li, X.; Atwill, E.R.; Antaki, E.; Applegate, O.; Bergamaschi, B.; Bond, R.F.; Chase, J.; Ransom, K.M.; Samuels, W.; Watanabe, N.; Harter, T. (2015a). Fecal indicator

- and pathogenic bacteria and their antibiotic resistance in alluvial groundwater of an irrigated agricultural region with dairies. *J. Environ. Qual.* 44: 1435-1447.
69. Li, L., L. Zhou, L. Wang, H. Xue, and X. Zhao. (2015b). Characterization of methicillin-resistant and susceptible staphylococcal isolates from bovine milk in northwestern China. *PLoS ONE* 10:e0116699.
70. Lopes, M.A.; Demeu, F.A.; Rocha, C.M.B.M. da; Costa, G.M. da; Franco Neto, A.; Santos, G. dos. (2012). Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. *Arq. Inst. Biol.* 79: 477-483.
71. Lucia, A.; Audino, P.G.; Seccacini, E.; Licastro, S.; Zerba, E.; Masuh, H. (2007). Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23: 299-303.
72. Lucia, A.; Licastro, S.; Zerba, E.; Audino, P.G.; Masuh, H. (2009). Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of *Eucalyptus* essential oils. *Bioresour. Technol.* 100: 6083-6087.
73. Machado, B.F.M.T.; Junior, A.F. (2011). Óleos essenciais: aspectos gerais e uso em terapias naturais. *Cad. Acad.* 3: 105-127.
74. McKay, D.L.; Blumberg, J.B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother. Res.* 20: 619-633.
75. Mandal, S.; DebMandal, M. (2016). Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Oils. In: Preedy, V.R. (1st ed.) **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. EUA: Academic Press. pp. 825-834.
76. Manion, C.R.; Widder, R.M. (2017). Essentials of essential oils. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 74: e153–e162.

77. Masetto, M.A.M.; Deschamps, C.; Mógor, A.F.; Bizzo, H.R. (2011). Teor e composição do óleo essencial de inflorescências e folhas de *Lavandula dentata* L. em diferentes estádios de desenvolvimento floral e épocas de colheita. Rev. Bras. Pl. Med. 13: 413-421.
78. Medeiros, E.S.; Mota, R.A.; Santos, M.V.; Freitas, M.F.L.; Pinheiro Júnior, J.W.; Teles, J.A.A. (2009). Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. Pesq. Vet. Bras. 29: 569-574.
79. Mehrzad, J.; Janssen, D.; Duchateau, L.; Burvenich, C. (2008). Increase in *Escherichia coli* inoculum dose accelerates CD8+ T-cell trafficking in the primiparous bovine mammary gland. J. Dairy Sci. 91: 193-201.
80. Mesquita, A.A.; Rocha, C.M.B.M.; Bruhn, F.R.P.; Custódio, D.A.C.; Braz, M.S.; Pinto, S.M.; Silva, D.B.; Costa, G.M. (2019). *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. Pesq. Vet. Bras. 39: 308-316.
81. Michiels, J.E.; Van den Bergh, B.; Verstraeten, N.; Michiels, J. (2016). Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. Drug Resist. Updat. 29: 76-89.
82. Minst, K.; Märtlbauer, E.; Miller, T.; Meyer, C. (2012). Short communication: *Streptococcus* species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. J. Dairy Sci. 95: 6957-6962.
83. Mohamad, O.A.A.; Ma, J.-B.; Liu, Y.-H.; Zhang, D.; Hua, S.; Bhute, S.; Hedlund, B.P.; Li, W.-J.; Li, L. (2020). Beneficial endophytic bacterial populations associated

- with medicinal plant *Thymus vulgaris* alleviate salt stress and confer resistance to *Fusarium oxysporum*. *Front. Plant. Sci.* 11: 1-17.
84. Moreira, G.M.B.; Matsumoto, L.S.; Silva, R.M.G.; Domingues, P.F.; Mello-Peixoto, E.C.T. (2014). Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino. *Pesqui. Vet. Bras.* 34: 626-632.
85. Muhamed Mubarack, H., Doss, A., Dhanabalan, R., Venkataswamy, R. (2011). Activity of some selected medicinal plant extracts against bovine mastitis pathogens. *J. Anim. Vet. Adv.* 10: 738–741.
86. Muhamed Mubarack, H.; Doss, A.; Vijayasanthi, M.; Venkataswamy, R. (2012). Antibacterial activity of some herbal extracts against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J. Pharm. Res.* 5: 2428–2430.
87. Nobrega, D.B.; De Buck, J.; Barkema, H.W. (2018). Antimicrobial resistance in non-aureus staphylococci isolated from milk associated with systemic but not intramammary administration of antimicrobials in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 101: 1-12.
88. Oliveira, C.M.C.; Sousa, M.G.S.; Silva, N.S.; Mendonça, C.L.; Silveira, J.A.S.; Oaigen, R.P.; Andrade, S.J.T.; Barbosa, J.D. (2011). Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 31.
89. Oliveira, M.C.; Roma Junior, L.C.; Vidal-Martins, A.M.C.; Balieiro, J.C.C. (2013). Diminuição da contagem de células somáticas em leite cru através de modelo experimental de fraude. *Ars Vet.* 29: 143-147.
90. Oliveira, J.R.de; de Jesus Viegas, D.; Martins, A.P.R.; Carvalho, C.A.T.; Soares, C.P.; Camargo, S.E.A.; Jorge, A.O.C.; de Oliveira, L.D. (2017). *Thymus vulgaris* L.

- extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. *Arch. Oral Biol.*, 82, 271–279.
91. Oliver, J.P.; Gooch, C.A.; Lansing, S.; Schueler, J.; Hurst, J.J.; Sassoubre, L.; Crossete, E.M.; Aga, D.S. (2020). Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. *J. Dairy Sci.* 103.
92. O’neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance. **Disponível (online):** [https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final paper_with cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf) (28 fev 2020).
93. Pan, M.; Chu, L.M. (2017). Leaching behavior of veterinary antibiotics in animal manure-applied soils. *Sci. Total Environ.* 579: 466-473.
94. Pegoraro, R.L.; Falkenberg, M.B.; Voltolini, C.H.; Santos, M.; Paulilo, M.T.S. (2010). Produção de óleos essenciais em plantas de *Mentha x piperita* L. var. *piperita* (Lamiaceae) submetidas a diferentes níveis de luz e nutrição do substrato. *Rev. Brasil. Bot.* 33: 631-637.
95. Peichel, C.; Nair, D.V.T; Dewi, G.; Donoghue, A.M.; Reed, K.M.; Johny, A.K. (2019). Effect of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil on the survival of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in contaminated poultry drinking water. *J. Appl. Poult. Res.* 28: 1121-1130.
96. Peng, S.; Dai, W.; Yu, H.; Wang, Y.; Wang, X.; Sun, S. (2014). Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of *Portulaca oleracea* L. and *Taraxacum mongolicum* against pathogenic bacteria of cow mastitis. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.* 12: 210-213.

97. Petzer, I.M.; Karzis, J.; Donkin, E.F.; Webb, E.C.; Etter, E.M.C. (2017). Validity of somatic cell count as indicator of pathogen specific intramammary infections. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 88: 1-10.
98. Pitkälä, A.; Koort, J.; Björkroth, J. (2008). Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. *J. Dairy Sci.* 91: 4075-4081.
99. Porto, B.C.; Fujimoto, G.; Borges, M. de F.; Bruno, L.M.; Carvalho, J.D.G. (2016). Determinantes de virulência em *Enterococcus* endógenos de queijo artesanal. *Cienc. Agron.* 47:69-76.
100. Prusinowska, R.; Śmigielski, K.B. (2014). Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L). A review. *Herba Pol.* 60: 56-66.
101. Rasooli, I.; Owlia, P.; Taghizadeh, M.; Astaneh, S.D.; Sharafi, S. (2010). Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. *Pharmacogn Mag* 6: 147.
102. Reddy, P.; Kandisa, R.V.; Varsha, P.V.; Satyam, S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Med. Aromat. Plants* 3: 1-3.
103. Ren, Q.; Liao, G.; Wu, Z.; Lv, J.; Chen, W. (2020). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. *J. Dairy Sci.* 103.
104. Reshi, A.A.; Husain, I.; Bhat, S.A.; Rehman, M.U.; Bilal, R.R.S.; Mir, M.R. (2015). Bovine mastitis as an evolving disease and its impact on the dairy industry. *Int. J. Curr. Res. Rev.* 7: 48-55.

105. Ribeiro, M.G. (2008). Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: Andrade, S.F. (3ª ed.) **Manual de Terapêutica Veterinária**. São Paulo: Roca. p.759-771.
106. Róžańska, H.; Lewtak-Piłat, A.; Kubajka, M.; Weiner, M. (2019) Occurrence of enterococci in mastitic cow's milk and their antimicrobial resistance. J. Vet. Res. 63:93-97.
107. Ruegg, P.L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. J. Dairy Sci. 100: 10381-10397.
108. Saab, A.B.; Zamprogna, T.O.; Lucas, T.M.; Martini, K.C.; Mello, P.L.; Silva, A.V.; Martins, L.A. (2014). Prevalence and etiology of bovine mastitis in the Nova Tebas, Parana. Semina Cien. Agra. 35:835-844.
109. Sahal, G.; Woerdenbag, H.J.; Hinrichs, W.L.J.; Visser, A.; Tepper, P.G.; Quax, W.J.; Mei, H.C.van der; Bilkay, I.S. (2020). Antifungal and biofilm inhibitory effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) essential oil on biofilm forming by *Candida tropicalis* isolates; an in vitro study. J. Ethnopharmacol. 246: 112188.
110. Samarth, R.M.; Goyal, P.K.; Kumar, A. (2001). Modulatory effect of *Mentha piperita* (Linn.) on serum phosphatases activity in Swiss albino mice against gamma irradiation. Indian J. Exp. Biol. 39: 479-482.
111. Samarth, R.M.; Goyal, P.K.; Kumar, A. (2002). Modulation of serum phosphatases activity in Swiss albino mice against gamma irradiation by *Mentha piperita* Linn. Phytother. Res. 16: 586-589.
112. Santos, M.V.; Fonseca, L.F.L. (2007). **Estratégias para controle de mastite e melhoria na qualidade do leite**. 1 ed. Barueri: Manole Ltda. pp 15-30.

113. Santos, L.L.; Pedroso, T.F.F.; Guirro, E. (2010). Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira de Santa Izabel do Oeste, Paraná. *Ci Anim Bras* 11:860-866.
114. Santos, M.V.; Tomazi, T. (2012). Vacinas e vacinações: uso de vacinas como ferramenta para controle da mastite bovina. **Disponível (online)** <http://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/vacinas-e-vacinacoes-uso-de-vacinas-como-ferramenta-para-controle-da-mastite-bovina> (24 de março).
115. Schukken, Y.H.; Günther, J.; Fitzpatrick, J.; Fontaine, M.; Goetze, L.; Holst, O.; Leigh, J.; Petzl, W.; Schuberth, H.J.; Sipka, A.; Smith, D.G.E.; Quesnell, R.; Watts, J.; Yancey, R.; Zerbe, H.; Gurjar, A.; Zadoks, R.N.; Seyfert, H.M. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144:270-289.
116. Schukken, Y.; Chuff, M.; Moroni, P.; Gurjar, A.; Santisteban, C.; Welcome, F.; Zadoks, R. (2012). The “other” gram-negative bacteria in mastitis. *Vet. Clin. Food Anim.* 28: 239-256.
117. Schwarz, S.; Loeffler, A.; Kadlec, K. (2016). Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Vet. Dermatol.*28: 82–e19.
118. Seegers, H.; Fourichon, C.; Beaudeau, F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34:475-491.
119. Sert, D.; Mercan, E.; Aydemir, S.; Civelek, M. (2016). Effects of milk somatic cell counts on some physicochemical and functional characteristics of skim and whole milk powders. *J. Dairy Sci.* 99: 5254-5264.
120. Shojaee-Aliabadi, S.; Hosseini, S.M.; Mirmoghtadaie, L. (2017). Antimicrobial activity of essential oil. In: Hashemi, S.M.B.; Khaneghah, A.M.;

- Sant'Ana, A.S. (1st ed.). **Essential Oils in Food Processing**. Nova Jersey: John Wiley & Sons Ltd. pp. 191-229.
121. Silva, E.R.; Pereira, A.M.G.; Moraes, W.S.; Santoro, K.R.; Silva, T.R.M. (2012). Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. Rev. Bras. Saúde Prod. Anim. 13: 701-711.
122. Silva, J.R.; Castro, G.A.C.; Gonçalves, S.M.; Custódio, D.A.P.; Mian, G.F.; Costa, G.M. (2017a). In vitro antimicrobial susceptibility and genetic resistance determinants of *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitic cows in Brazilian dairy herds. Semina: Ciênc. Agrár. 38:2581-2594.
123. Silva, S.M.; Luz, J.M.Q.; Nogueira, P.A.M.; Blank, A.F.; Sampaio, T.S.; Pinto, J.A.O.; Wisniewski, A. (2017b). Organo-mineral fertilization effects on biomass and essential oil of lavender (*Lavandula dentata* L.). Ind. Crops Prod. 103: 133-140.
124. Silva-Flores, P.G.; Pérez-López, L.A.; Rivas-Galindo, V.M.; Paniagua-Vega, D.; Galindo-Rodríguez, S.A.; Álvarez-Román, R. (2019). Simultaneous GC-FID quantification of main components of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula dentata* essential oils in polymeric nanocapsules for antioxidant application. J. Anal. Methods Chem. 1-9.
125. Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2010). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 1999.
126. Soares, B.S.; Melo, D.A.; Motta, C.C.; Marques, V.F.; Barreto, N.B.; Coelho, S.M.O.; Coelho, I.S.; Souza, M.M.S. (2017). Characterization of virulence and antibiotic profile and agr typing of *Staphylococcus aureus* from milk of

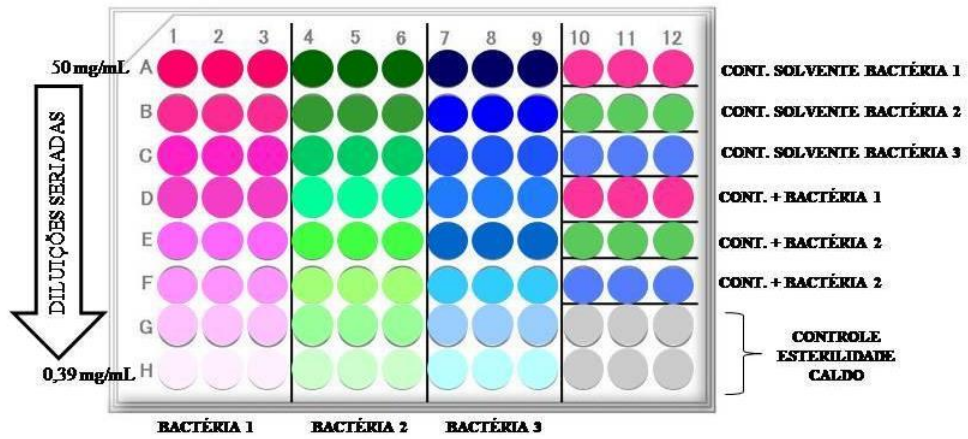
- subclinical mastitis bovines in State of Rio de Janeiro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 69: 843-850.
127. Soyngbe, O.S.; Oyedeji, A.; Basson, A.K.; Opoku, A.R. (2013). The essential oil of *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden inhibits microbial growth by inducing membrane damage. *Chin. Med.* 4: 7-14.
128. Steele, N.M.; Dicke, A.; De Vries, A.; Lacy-Hulbert, S.J.; Liebe, D.; White, R.R.; Petersson-Wolfe, C.S. (2020). Identifying gram-negative and gram-positive clinical mastitis using daily milk component and behavioral sensor data. *J. Dairy Sci.* 103.
129. Suclupe-Campos, D.-O.; Aguilar-Gamboa, F.-R. (2020). Persistencia bacteriana: un fenotipo celular de importancia clínica en infecciones crónicas y recurrentes. *Horiz. Med.* 20: 77-87.
130. Suriyasathaporn, W.; Heuer, C.; Noordhuizen-Stassen, E.N.; Schukken, Y.H. (2000). Hyperketonemia and the impairment of udder defense: A review. *J. Vet. Res.* 31: 397-412.
131. Su, Y.C.; Ho, C.L.; Wang, E.I.; Chang, S.T. (2006). Antifungal activities and chemical compositions of EOs from leaves of four *Eucalyptus*. *Taiwan J. Sci.* 21:49–61.
132. Svennesen, L.; Nielsen, S.S.; Mahmmod, Y.S.; Krömker, V.; Pedersen, K.; Klaas, I.C. (2018). Association between teat skin colonization and intramammary infection with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in herds with automatic milking systems. *J. Dairy Sci.* 102: 1-11.
133. Sztachañska, M.; Barañski, W.; Janowski, T.; Pogorzelska, J.; Zduñczyk, S. (2016). Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 19:119-124.

134. Tetens, J.L.; Billerbeck, S.; Schwenker, J.A.; Hölzel, C.S. (2019). Short communication: Selection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in dairy calves associated with antibiotic dry cow therapy—A cohort study. *J. Dairy Sci.* 102:11449-11452.
135. Titouche, Y.; Hakem, A.; Houali, K.; Meheut, T.; Vingadassalon, N.; Ruiz-Ripa, L.; Salmi, D.; Chergui, A.; Chenouf, N.; Hennekinne, J.A.; Torres, C.; Auvray, F. (2019). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST8 in raw milk and traditional dairy products in the TiziOuzou area of Algeria. *J. Dairy Sci.* 102: 6876-6884.
136. Tomazi, T.; Coura, F.M.; Gonçalves, J.L.; Heinemann, M.B.; Santos, M.V. (2018). Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from bovine clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 101: 1-13.
137. Tozzetti, D.S.; Bataier, M.B.N.; Almeida, L.R. (2008). Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas - revisão de literatura. *Rev. Eletr. Med. Vet.* 10.
138. Umezu, T.; Sakata, A.; Ito, H. (2001). Ambulation-promoting effect of peppermint oil and identification of its active constituents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 69: 383-390.
139. Verma, R.S.; Rahman, L.U.; Chanotiya, C.S.; Verma, R.K.; Chauhan, A.; Yadav, A.; Singh, A.; Yadav, A.K. (2010). Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *J. Serb. Chem. Soc.* 75: 343-348.
140. Vakkamäki, J.; Taponem, S.; Heikkilä, A.M.; Pyörälä, S. (2017) Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta Vet. Scan.* 59:33.

141. Wacher, V.J.; Wong, S.; Wong, H.T. (2002). Peppermint oil enhances cyclosporine oral bioavailability in rats: comparison with D-alpha-tocopherylpoly (ethylene glycol 1000) succinate (TPGS) and ketoconazole. *J. Pharm. Sci.* 91: 77-90.
142. Wiest, J.M.; Carvalho, H.H.; Avancini, C.A.M.; Gonçalves, A.R. (2009). Atividade antiestafilocócica em extratos de plantas com indicativo medicinal ou condimentar. *Rev. Bras. Pl. Med.* 11: 209-215.
143. Xie, W.; Shen, Q.; Zhao, F.J. (2018). Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: A review. *Eur. J. Soil Sci.* 69:181-195.
144. Yadav, R.K.; Singh, M.; Subhadeep, R; Gautam, S.; Rawat, J.K.; Singh, L.; Ansari, M. N.; Saeedan, A.S.; Kaithwas, G. (2020). Short communication: Evaluation of α -linolenic acid-based intramammary nanosuspension for treatment of subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 103.
145. Yang, F.; Zhang, S.; Shang, X.; Wang, X.; Yan, Z.; Li, H.; Li, J. (2018). Short communication: Antimicrobial resistance and virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. *J. Dairy Sci.* 102: 1-5.
146. Zhang, Y.; Yew, W.W.; Barer, M.R. (2012). Targeting persisters for tuberculosis control. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 2223-30.
147. Zhang, S.; Piepers, S.; Shan, R.; Cai, L.; Mao, S.; Zou, J.; Sli, T.; Vliegheer, S.; Han, B. (2018). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine clinical mastitis in 5 provinces of China. *J. Dairy Sci.* 101:3344-3355.

9 ANEXOS

Anexo I – Organização das placas de 96 poços para realização dos experimentos.



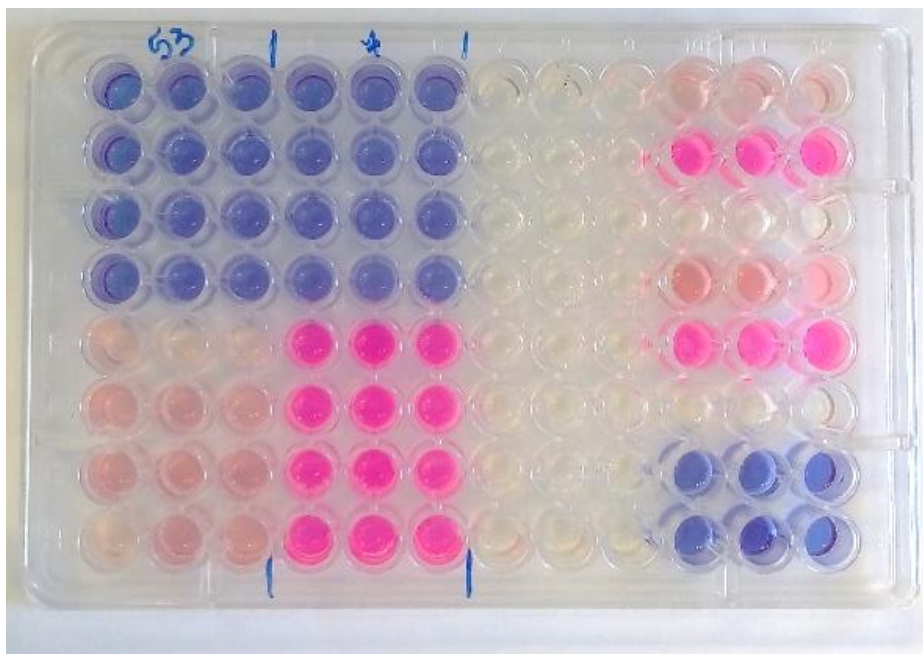
Anexo II – Protocolo de coleta enviado aos produtores juntamente com materiais estéreis para realização das coletas de leite.

Protocolo para coleta de Leite – Exame bacteriológico – Mastite

As amostras para diagnóstico bacteriológico não devem ser coletadas de vacas tratadas com antibiótico intra-mamário ou sistêmico nos últimos sete dias. Em caso de coleta nesses indivíduos, identificar no frasco que a vaca está passando por tratamento.

- 1 – Lavar o teto no qual será feita a coleta.
- 2 – Secar o teto com papel toalha. Não usar o mesmo papel toalha entre vacas.
- 3 – Passar algodão/papel embebido em álcool na porção final do teto, principalmente no orifício do teto. Usar um algodão/papel por vaca.
- 4 – Desprezar os 3 primeiros jatos de leite.
- 5 – Fazer a coleta em frascos estéreis, abertos somente no momento da coleta. Os frascos devem ser mantidos em posição quase horizontal para evitar a entrada de sujidades no interior do frasco. Não coloque a tampa do frasco de coleta no chão, procure segurar a tampa no momento da coleta.
- 6 – Coletar 2-3 jatos de leite e fechar o frasco imediatamente.
- 7- É possível coletar amostras compostas de leite (mais de um teto de uma mesma vaca em um frasco de coleta). Nesse caso, 2-3 jatos de cada quarto mamário suspeito será colhido no mesmo frasco e a amostra representará a vaca.
- 8 – A amostra deve ser congelada imediatamente após a coleta e enviada para o laboratório em caixas isotérmicas.

Anexo III – Óleo de lavanda frente a *S. chromogenes* e *Serratia marcescens*. As colunas 7, 8 e 9 foram deixadas para controle da cor do óleo essencial em cada concentração. Foto após adição de resazurina 0,01%.



Fonte: Arquivo pessoal.