

UNIVERSIDADE BRASIL
CAMPUS DESCALVADO

ANDERSON GUIMARÃES OLIVEIRA

AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE COPAÍBA E MELALEUCA EM
MICROORGANISMOS ENVOLVIDOS NA MASTITE SUBCLÍNICA DE
VACAS SOB SISTEMA ORGÂNICO DE PRODUÇÃO

COPAIBA AND MELALEUCA OIL ACTION ON MICROORGANISMS INVOLVED IN
SUBCLINICAL MASTITIS UNDER ORGANIC PRODUCTION SYSTEM

Descalvado, SP

2020

ANDERSON GUIMARÃES OLIVEIRA

AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE COPAÍBA E MELALEUCA EM
MICROORGANISMOS ENVOLVIDOS NA MASTITE SUBCLÍNICA DE VACAS SOB
SISTEMA ORGÂNICO DE PRODUÇÃO

Orientadora: Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Co-orientador: Dr Gabriel Maurício Peruca de Melo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Produção Animal da Universidade Brasil, como complementação dos créditos
necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Descalvado, SP

2020

A45a Oliveira, Anderson Guimarães
Ação dos óleos essenciais de copaíba e melaleuca em microrganismos envolvidos na mastite subclínica de vacas sob sistema orgânico de produção / Anderson Guimarães Oliveira. -- Descalvado: Universidade Brasil, 2020.
57f. : il. ; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.


Orientadora: Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia
Coorientador: Dr. Gabriel Maurício Peruca de Melo

1. Antimicrobiano. 2. Disco difusão. 3. Mastite. 4. Óleo essencial. 5. Pecuária orgânica. 6. Teatree. I. Título.

CDD 636.20896

**TERMO DE APROVAÇÃO****ANDERSON GUIMARÃES OLIVEIRA****“AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE COPAÍBA E MELALEUCA
EM MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA MASTITE
SUBCLÍNICA DE VACAS SOB SISTEMA ORGÂNICO DE
PRODUÇÃO”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof(a). Dr(a)  Liandra Maria Abaker Bertipaglia (Presidente)

Prof(a). Dr(a)  Cássia Maria Barroso Orlandi (Universidade Brasil)

Prof(a). Dr(a)  Karyne Oliveira Coelho (Universidade Federal de Goiás)

Descalvado, 14 de dezembro de 2020.



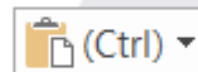
Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2008, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE COPAÍBA E MELALEUCA EM MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA MASTITE SUBCLÍNICA DE VACAS SOB SISTEMA ORGÂNICO DE PRODUÇÃO"



Autor(es):

Discente: Anderson Guimarães Oliveira

Assinatura:

Orientador: Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Assinatura:

Data: 14/dezembro/2020

Dedico

Primeiramente a Deus, por todas as graças recebidas, meus Pais e ao meu Avô Valdivino Pedro Guimarães (*in memoriam*).

E ao meu Pequeno: Pedro Guimarães Fernandes.

AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE COPAÍBA E MELALEUCA EM MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA MASTITE SUBCLÍNICA DE VACAS SOB SISTEMA ORGÂNICO DE PRODUÇÃO

RESUMO

A aplicação de óleos essenciais com propriedade antimicrobiana tem despertado interesse no setor industrial e nos sistemas de produção orgânico. Atualmente, observa-se maior aceitação do consumidor pelos produtos oriundos de sistemas orgânicos em função dos danos à saúde propiciados pelas substâncias sintéticas, como por exemplo, resíduos da antibioticoterapia sintética, no leite. Neste sentido, o presente estudo buscou contribuir com informações que futuramente possam ser incorporadas à produção de leite orgânico, no tratamento de mastite. Os óleos essenciais de copaíba (C) e melaleuca (M) foram avaliados *in vitro*, pelo método de antibiograma, para a determinação da sensibilidade de amostras bacterianas, estas identificadas através do leite proveniente de uma propriedade de produção orgânica de leite, testadas positivamente para o California Mastitis Test (CMT). Em função do diâmetro da zona de inibição (DZI), estimou-se a porcentagem de inibição do crescimento (I%), sendo que foi observada I% de 33,3% e 56,7% para o óleo puro de copaíba e para a mistura dos óleos de copaíba e melaleuca na proporção de (75%C para 25%M), respectivamente. Para o controle positivo usado (Ceftriaxona) foi observada I% igual a 100% e o controle negativo (óleo de canola) I% igual a 0%. Os microrganismos mais, frequentemente, observados nas amostras de leite foram *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus aureus*. Foi observado um efeito inibidor do crescimento (75%) do *Corynebacterium bovis*, com um efeito sinérgico entre os óleos de copaíba e melaleuca, quando se utilizou 75%C para 25%M. Concluiu-se que a associação dos óleos essenciais de copaíba e melaleuca apresentam potencial de sinergismo na inibição do crescimento dos microrganismos desafiados e apresenta potencial para uso no controle de mastite subclínica em vacas do sistema orgânico de produção de leite.

Palavras-chave: antimicrobiano, disco difusão, mastite, óleo essencial, pecuária orgânica, *teatree*

COPAIBA AND MELALEUCA OIL ACTION ON MICROORGANISMS INVOLVED IN SUBCLINICAL MASTITIS UNDER ORGANIC PRODUCTION SYSTEM

ABSTRACT

The application of essential oils with antimicrobial properties has aroused great interest in the industrial sector and in organic production systems. Currently, there is greater consumer acceptance for products from organic systems due to the damage to health caused by synthetic substances, such as residues of synthetic antibiotic therapy in milk. In this sense, the present study sought to contribute with information that in the future can be incorporated into the production of organic milk, in the treatment of mastitis. The association between the essential oils of copaiba and tea tree was evaluated in vitro, using the antibiogram method to determine the sensitivity of bacterial samples, these identified through milk from an organic milk production property, positively tested for CMT. Depending on the diameter of the inhibition zone (DZI), the percentage of growth inhibition (I%) was estimated, with I% of 33.3% and 56.7% being observed for pure copaiba oil and for the mixture of copaiba and tea tree oils in the proportion of (75% C to 25% M), respectively. For the positive control used (Ceftriaxone), I% equal to 100% was observed. A growth inhibitory effect (75%) of *Corynebacterium bovis* was observed, with a synergistic effect between copaiba and tea tree oils, when 75% C and 25% M were used. It was concluded that the association of the essential oils of copaiba and melaleuca has potential for synergism in inhibiting the growth of challenged microorganisms and has potential for use in the control of subclinical mastitis in cows of the organic milk production system.

Keywords: antimicrobial, diffusion disc, essential oil, mastitis, organic livestock, teatree

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Área sombreada com cocho para o descanso após a ordenha 29
- Figura 2:** Sala de ordenha tipo espinha de peixe 29
- Figura 3:** Exame *California mastitis test* nas vacas do rebanho do sistema orgânico de produção 30
- Figura 4:** Antibiograma realizado pela técnica de disco difusão, utilizando o óleo de copaíba e melaleuca nas proporções 100, 75, 50 e 25% para avaliação do crescimento do *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus aureus* 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos testes de diagnóstico	20
Tabela 2: Correlação entre o resultado do <i>Califórnia mastitis test</i> e contagem de células somáticas	21
Tabela 3: Classificação dos resultados das amostras de leite submetidas ao CMT (<i>California mastitis test</i>) em escores	31
Tabela 4: Caracterização das misturas individuais e binárias dos óleos essenciais de copaíba e melaleuca avaliadas	32
Tabela 5: Resultados dos exames microbiológicos e do CMT, associados ao patógeno isolado.	34
Tabela 6: Resultado do isolamento de bactérias, número absoluto de quartos mamários com o microrganismo isolado e a sua frequência relativa	35
Tabela 7: Atividade antimicrobiana, determinada pelo método de disco-difusão dos óleos essenciais de Copaíba (C) e Melaleuca (M) e suas misturas binárias sobre o microrganismo patogênico <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Tabela 8: Atividade antimicrobiana, determinada pelo método de disco-difusão dos óleos essenciais de Copaíba (C) e Melaleuca (M) e suas misturas binárias sobre o microrganismo patogênico <i>Corynebacterium bovis</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

C	Óleo essencial Copaíba
CCS	Contagem de Células Somáticas
CMT	<i>California mastitis test</i>
L/dia	Litros por dia
M	Óleo essencial Melaleuca
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
°C	Graus Celsius
WMT	Wisconsin Mastitis Test

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	Relevância do tema.....	14
1.2	Fundamentação	17
1.2.1	Diagnóstico da mastite	20
1.2.2	Métodos de Tratamento da Mastite Bovina	22
1.2.2.1	Tratamento convencional	22
1.2.2.2	Tratamento não convencional	23
1.2.3	Associação entre óleos essenciais	26
1.3.	Hipótese	28
1.4.	Objetivos geral e específico	28
2	MATERIAS E METODOS	29
2.1	Animais e manejo.....	29
2.2	Identificação dos animais experimentais e amostragem do leite	30
2.3	Estudos nos óleos essenciais	31
2.4	Testes microbiológicos.....	33
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1.	Triagem dos exames de CMT, CCS e identificação de animais experimentais .	34
3.2.	Estudo <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>isolado do leite orgânico</i>	36
3.3	Estudo <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana sobre <i>Corynebacterium bovis</i> , <i>isolado do leite orgânico</i>	41
4	CONCLUSÕES	44
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Relevância do tema

Segundo o Cadastro Nacional de Produtores Orgânicos no Brasil existem 96 unidades certificadas para a produção de leite orgânico, número bem inferior dos encontrados nos Estados Unidos (3000 fazendas), França (3387 fazendas) e Alemanha (3050 fazendas). O consumo de lácteos cresceu 90% desde a década de 90, projeções feitas para o ano de 2020 indicam um consumo de 173 litros de leite por brasileiro, número bem abaixo em relação à países desenvolvidos (250-300 L). O envelhecimento da população brasileira tem criado um nicho de consumo cada vez mais exigente e, no caso dos lácteos, querem saber sobre a rastreabilidade, bem-estar dos animais, se as fazendas preservam a natureza, sendo fatores esses diretamente ligados à - produção orgânica [1]

A questão orgânica e sustentável ganhou visão, principalmente, após a RIO-92, no qual a Agenda 21 foi redigida e ditou às nações do mundo um crescimento mais sustentável. O Brasil, - no ano de 1994, iniciou a certificação de produtos orgânicos através da portaria do Ministério da agricultura 178. Em outra portaria (190) do mesmo ano, foi criado o comitê para criar as normas que ditariam a certificação dos produtos. No ano de 1995, através da portaria 192 do Ministério da Agricultura, foram designados os membros que iriam compor a comissão nacional de produtos orgânicos - [2,3].

Através da Instrução Normativa (IN) 07, de abril de 1999, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou as normas de produção de produtos orgânicos vegetais e animais. Para ser considerada unidade de produção orgânica, a propriedade rural deve estar sob sistema orgânico de produção. Essas unidades devem obedecer aos seguintes critérios: a) respeitar o bem-estar animal; b) manter - um nível higiênico em todo o processo criatório, compatível com as normas de saúde pública vigentes; c) adotar técnicas sanitárias preventivas sem o emprego de produtos - proibidos; d) contemplar uma alimentação nutritiva, sadia e farta. Incluindo-se a água, - sem a presença de aditivos químicos e/ou estimulantes, conforme o Anexo IV, da presente - Instrução; e) dispor de instalações higiênicas,

funcionais e confortáveis; f) praticar um manejo capaz de maximizar uma produção de alta qualidade biológica e econômica; e g) - utilizar raças, cruzamentos e o melhoramento genético (não Organismo Geneticamente Modificado - OGM/transgênicos), - compatíveis tanto com as condições ambientais e como estímulo à biodiversidade [4]. Atualmente, a Lei 10.831 e suas IN, sobretudo a 46, ditam os processos de produção, industrialização, armazenamento, transporte e comercialização dos produtos orgânicos.

Estudos com propósito de obter novos medicamentos a partir de plantas, ou de aprimorar fitoterápicos já existentes, assumem papel importante, pois, cerca de um terço dos medicamentos produzidos pelos países desenvolvidos são provenientes de recursos naturais [40].

Na pecuária orgânica, fundamentalmente na produção de leite, a disponibilidade de produtos para o tratamento alternativo das doenças causadas, principalmente pela ação de bactérias, ainda é muito incipiente. Quando se pensa no desenvolvimento de um produto que ainda não está disponível comercialmente, um dos primeiros passos é realizar uma pesquisa nas bases de patentes para se identificar a existência de algum produto para a finalidade para a qual se deseja em, pelo menos, no país onde se fez a pesquisa de mercado. Sendo assim, dada esta condição, ao pesquisar na base Google® patentes (<https://patents.google.com/>), e ao aplicar o termo “copaíba” na janela de pesquisa da Base, encontrou-se 2.478 resultados, que compreenderam patentes concedidas segundo diferentes classes (<https://worldwide.espacenet.com/classification#!/CPC=C11>). No entanto, nenhuma especificadamente, em aplicação intramamária para tratamento de mastite.

Na mesma base de busca, segundo as palavras chaves “*fitoterápico e mastite*”, foram encontrados pedidos de patente, também sem a especificidade da aplicação intramamária. Chamou a atenção para a invenção BR102017020222A2 referente a “formulações pós-imersão à base de óleos essenciais, que são ativadas contra *Staphylococcus aureus* e outros microrganismos. Essas formulações podem ser usadas pela indústria farmacêutica do tipo pós-mergulho (*pós-dipping*) para prevenção e controle de animais com mastite bovina”. Reinvidica “Formulações farmacêuticas à base de óleos essenciais caracterizadas por compreender os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (Canela), *Coriandrum sativum* (Coentro),

Origanum vulgare (Orégano), *Syzygium aromaticum* (Cravo-da-índia) e *Thymus vulgaris* (Tomilho), sozinhos ou em combinações.”, no entanto, sem a inclusão da copaíba. Esse pedido foi apresentado pela Universidade Federal de Viçosa-UFV, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG, Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG em 2017/09/21, com outras duas complementações.

Outra invenção que chamou a atenção trata de “uma composição que contém nanopartículas de prata dispersas em um óleo, preferencialmente óleo de copaíba (*Copaifera ssp.*), apresentando conjuntamente os efeitos cicatrizantes de óleo de copaíba e bactericida de prata nanoestruturada. Os resultados da cicatrização epitelial com a aplicação da composição proposta são um efeito sinérgico, superam os efeitos isolados das duas substâncias e também os medicamentos comerciais. Uma composição gerada pode ser enviada em forma de óleo de copaíba puro com nanopartículas de prata dispersas ou incluídas em formulações, formas de sabonete, creme, pomada e gel. Também em formulações para embeber curativos.” (BR102013005468A2)

Segundo Aroeira et al. [39], “são necessárias ações de pesquisa que avaliem a relação custo/benefício das estratégias alternativas de controle de endo e ectoparasitos, e testes sobre a eficiência de produtos homeopáticos e fotoquímicos, na prevenção e tratamento de mastites”.

De modo geral, o interesse por plantas, seus extratos ou óleos advém do conhecimento e divulgação popular e, assim, avaliados cientificamente, comprova-se suas eficiências ou não [41].

1.2 Fundamentação

Na produção de leite orgânico os animais são criados sem a utilização de antimicrobianos, hormônios, vermífugos, promotores de crescimento. Neste exemplo de produção o produtor deve estar compromissado com a questão ambiental e, além disso, fornecer condições favoráveis de trabalho aos colaboradores [5].

Mesmo na atividade orgânica, doenças de grande relevância na produção convencional são entraves e, a mastite é uma delas. Em uma pesquisa realizada no estado do Rio de Janeiro com produtores de leite orgânico, cerca de 71% veem a mastite como preocupação [6].

Mastite é o processo pelo qual ocorre inflamação da glândula mamária, tendo as bactérias os principais agentes causadores, fungos, leveduras e algas agentes secundários [7,8]. O processo inflamatório inicia quando o microrganismo invade a glândula mamaria através do esfíncter do teto e se multiplica em seu interior. Devido à invasão, o organismo desloca leucócitos do sangue para o leite com o intuito de eliminar a infecção, levando a permeabilidade vascular e apresentando outros sinais do processo inflamatório [9].

Um estudo realizado por VISSIO et al.,[10], indicou uma perda de 2,8litros/vaca/dia e 0,12litros/vaca/dia em média, devido à mastite subclínica e mastite clínica respectivamente. Em média, foi gasto US\$ 0,059/vaca/dia para o controle e prevenção da mastite. GONÇALVES [11], avaliando o impacto da mastite subclínica observou uma perda na produção que varia de 0,07 a 2,9 kg/leite/quarto mamário/ordenha, sendo essa variação dependente do agente causador.

Em estudo realizado por DIESER et al., [12] detectaram que 54% dos animais foram diagnosticados com mastite subclínica, isto de um universo de 2296 vacas leiteiras em 51 rebanhos convencional de produção.

ACOSTA et al. [13], em função de um apanhado de dados observaram a prevalência de mastite subclínica em produção de leite convencional de 48,64%. BUSANELLO [14], citou de forma regionalizada, no Brasil, a prevalência de mastite subclínica variando de 15,6% (Pará); 38,5% (Bahia); 53% (Rio Grande do Sul,); 55,4% (Minas Gerais,); e 63,6% (São Paulo).

Ribeiro et. al. [], observaram que em um total de 148 vacas mantidas em produção de leite não convencional, duas (02) (1,35%) estavam acometidas com mastite clínica, 72 (48,64%) com mastite subclínica e 74 (50,34%) sem mastite.

A mastite pode ser classificada em dois tipos, a primeira quanto a forma de apresentação (clínica e subclínica), e a segunda, quanto ao agente causador, em ambiental e contagiosa [8].

A mastite clínica apresenta sinais clínicos característicos da inflamação, tais como: edema, aumento de temperatura e volume, dor à palpação da glândula, aparecimento de grumos no leite [15]. Na forma subclínica de apresentação não são observadas alterações macroscópicas no leite e úbere da vaca. Contudo ocorre diminuição na produção de leite e mudança na sua composição [16].

Comparando a prevalência dos dois tipos de mastite, a mastite subclínica possui prevalência de 90-95% dos casos de mastite nos rebanhos leiteiros, em relação à mastite clínica. Para cada caso de mastite clínica existem cerca de 15 a 40 casos de mastite subclínica [8].

Avaliando 584 quartos mamários GONÇALVES [11] observou que 375 (64,2%) foram cultura-negativa e os isolados bacterianos mais frequentes foram *Corynebacterium* spp. (7,9%), *Staphylococcus* cagulase negativa (5,8%), *Staphylococcus aureus* (5,3%), *Streptococcus uberis* (4,6%), *Streptococcus agalactiae* (3,9%), outros *Streptococcus* spp. (2,4%), Gram-negativos (2,4%), *Enterococcus* spp. (1,4%) e *Streptococcus dysgalactiae* (0,7%).

A mastite ambiental é aquela causada por microrganismos que vivem no ambiente em que a vaca vive, (esterco, urina, barro e cama). Tem como característica alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração. Tem maior incidência no pré e pós parto, sua erradicação é praticamente impossível. Sua transmissão ocorre através da exposição do teto a ambientes altamente contaminados ou equipamentos de ordenha [8,15].

Os Coliformes são os principais patógenos envolvidos na ocorrência de mastite clínica, dentro desse grupo podem ser citadas *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. que são microrganismos Gram negativos. Sua instalação ocorre entre as ordenhas ou no período seco. Tem maior incidência no início de lactação. Vacas no início de lactação,

mais velhas e de maiores produções são mais susceptíveis à mastite por coliformes [8,16]

A principal característica do *Streptococcus uberis* é a de sobreviver fora da glândula mamária, principalmente, no ambiente de ordenha. Sua incidência ocorre preferencialmente entre as vacas secas [15]. O *Streptococcus dysgalactiae* pode ser encontrado em qualquer ambiente em que a vaca vive e sua instalação se dá quando ocorre lesão do teto [17,18].

Na mastite contagiosa tem como característica a baixa incidência de casos clínicos e alta taxa da forma subclínica, a contagem de células somáticas (CCS) estará aumentada. Os microrganismos *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis* são exemplos, estes vivem principalmente no interior da glândula mamária e pele dos tetos. Sua transmissão ocorre preferencialmente durante a ordenha dos animais, por meio dos utensílios da ordenha e mãos do ordenhador [8,15].

O *Staphylococcus aureus* coloniza o interior e a pele do teto e interior da glândula mamária. A transmissão desse agente ocorre principalmente através de fômites. Uma vez que colonizou o interior da glândula mamária, este se fixa às células epiteliais e instaura uma infecção com a produção de toxinas, resultando em necrose e instalando nesse local um foco de infecção, com grande aumento na contagem de células sanguíneas. A necrose interfere na função secretora e como consequência reduz a produção de leite [8].

As infecções por *S. aureus* apresentam especialmente na forma subclínica e ocorre um grande aumento na contagem célula somática (CCS). Possui grande poder de invasão, geralmente há constituição de tecido fibroso no foco da infecção, formando “bolsões” de bactérias e, com isso, o antibiótico é impedido de acessar o local da infecção. As principais características do agente são: infecções de longa duração, com tendência a cornificar e baixa taxa de cura tanto espontânea como a utilização de antibióticos [8,15,19].

As mastites causadas por *S. agalactiae* geram grandes prejuízos, geralmente por alterar as características do leite, aumento da contagem de célula somática (CCS) e queda na produção [8,15].

Dentre o grupo dos *Staphylococcus* Coagulase negativo (SCN), destacam-se os *S. simulans* e *S. chromogenes*. Estes microorganismos vivem na pele dos bovinos. Possuem baixa patogenicidade, porém quando a infecção se torna persistente começa a aparecer sinais. Sua transmissão ocorre preferencialmente pelas mãos dos ordenadores. De antemão não alteram a produção de leite e nem a composição. Ocasionalmente ocasiona uma moderada elevação da CCS dos quartos infectados [8,38].

Dentro do gênero *Corynebacterium* se destaca a espécie *Corynebacterium bovis*, que vive preferencialmente no canal do teto e é considerado agente secundário, isso devido a sua virulência e capacidade de lesão, possuem baixa patogenicidade e por outro lado, é altamente contagioso, o que demonstra sua elevada ocorrência nos casos de mastite, com ligeiro aumento de CCS, segundo GONÇALVES [20]. De acordo com o autor, na avaliação de 190 quartos mamários infectados com o *Corynebacterium ssp.*, observou-se, em média, CCS de 690×10^3 células/mL. Não houve efeito de *Corynebacterium bovis* sobre a produção de leite, teor de gordura, proteína, caseína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado [20,21].

1.2.1 Diagnóstico da mastite

Para o diagnóstico da mastite subclínica, existem testes diretos e indiretos, conforme apresentado na Tabela 01 [8].

Tabela 01: Classificação dos testes de diagnóstico.

Teste Direto	Testes Indiretos
Análise Microbiológica do Leite	California Mastitis Test (CMT)
	Contagem de Células Somáticas (CCS)
	Wisconsin Mastitis Test (WMT)

Fonte: Adaptado Santos e Fonseca, 2019

A análise microbiológica do leite é um método padrão e direto para o diagnóstico da mastite, no qual isola-se o microrganismo, causador. É uma informação

disponível para a recomendação do tratamento e, também, um critério de descarte do animal. Os procedimentos para a coleta de amostra do leite para realizar a cultura são:

- a- Imersão do teto na solução de *pré-dipping*;
- b- Secagem do teto com papel toalha após 30 segundos;
- c- Desinfetar a extremidade do teto com álcool 70%;
- d- Coletar, identificar e resfriar a amostra em gelo para exame em até 48 horas ou congelar até o envio [21,24].

O CMT é um teste amplamente prático e utilizado para o diagnóstico da mastite subclínica, realiza-se uma estimativa da contagem de células somática no leite. Realizado antes da ordenha, após o descarte dos três ou quatro jatos de leite, baseia-se na utilização da mesma quantidade de leite e de reagente, (detergente aniônico neutro,) em uma bandeja apropriada, que rompe a membrana das células presentes na amostra do leite, liberando assim o material genético. O resultado é avaliado após 60 segundos, feito através do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura, que são observados em cinco escores (negativos, traços, +, ++ ou +++) (Tabela 02) [8,22].

Tabela 02: Correlação entre o resultado do *Califórnia mastitis test* e contagem de células somáticas

Escore	Viscosidade/Gelatinização	CCS (x1000 céls/mL)
0	Ausente	0-200
Traços	Leve	150-500
+	Leve/moderado	400-1500
++	Moderado	800-5000
+++	Intensa	>5000

Fonte: SANTOS e FONSECA, (2019)

As células somáticas, na sua maioria são de origem sanguínea, principalmente, leucócitos e células de descamação da glândula. Método que pode ser utilizado para avaliar a saúde da glândula mamária individual ou de um rebanho, detecta-se a presença de mastite subclínica. As amostras são submetidas à avaliação por métodos fluorimétricos, que se baseia na detecção da fluorescência emitida pela reação de um corante com o DNA das células somáticas, para isso utiliza equipamentos automáticos. Quanto maior for a CCS maior a chance do animal estar infectado. Em uma glândula mamária sadia, os níveis de CCS é de no máximo 200.000 céls/mL/leite, sendo que, para animais infectados esse valor estará superior [8,14,23].

1.2.2 Métodos de Tratamento da Mastite Bovina

1.2.2.1 Tratamento convencional

Utilizam-se, principalmente, antibióticos para o controle da mastite, seja ela durante a lactação ou na terapia da vaca seca. Seu objetivo é auxiliar o sistema imune na defesa do organismo frente à infecção instalada [8].

Vesco et al., [25] observaram que, de 611 amostras positivas para *Staphylococcus coagulase positivo* 92,96%, 84,78%, 84,78%, 82,32%, 82% e 81,51% foram resistentes a penicilinas, cefalexina, gentamicina, neomicina, tetraciclina e trimetopina, respectivamente. Isso pode ser explicado pela facilidade de aquisição de

antibióticos e uso indiscriminado, levando assim a criação de resistências das bactérias.

1.2.2.2 Tratamento não convencional

Alternativas naturais estão sendo estudadas como opção para o tratamento de mastite sendo ela clínica ou subclínica. Zafalon et al [26], aconselham a busca por alternativas para minimizar ou eliminar resíduo no leite causado pelo uso de antibiótico, sendo uma delas o uso de extrato de plantas com ação antimicrobiana.

A ação antimicrobiana dos compostos extraídos das plantas é verificada frente a uma gama de agentes causadores da mastite, sendo eles Gram-positivo ou Gram-negativos. Essa ação está vinculada a quantidade de compostos terpenos e fenólicos existentes [27,28,29].

Bastos Oyarzabal et al [34] avaliaram a ação *in vitro* do óleo de orégano frente a 71 bactérias isoladas do leite, dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium* e 3 cepas de *Pseudomona saeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O óleo de orégano demonstrou atividade bactericida frente a todas as bactérias estudadas.

Óleos essenciais de canela, cravo botão, tomilho branco, citronela e capim limão possuem uma excelente ação bactericida frente ao *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Resultados foram potencializados na combinação dos óleos de canela, capim limão e cravo botão [31].

Espécies do gênero *Copaifera* são as mais estudadas no ramo da medicina. As copaibeira como é chamada popularmente a árvore, é típica das regiões sudeste, centro-oeste e amazônica do Brasil. Sua altura pode variar de 25 a 40 m, casca lisa, folhagem densa pode produzir até 3kg de sementes [32]. A floração ocorre de janeiro a março, antes ocorre a mudança das folhas e os frutos, são coletados entre março a agosto [33].

Com uma incisão no tronco retira-se um líquido transparente, viscoso e de sabor amargo, chamado de óleo resina. Esse líquido é composto por duas partes sendo uma sólida, resinosa não volátil formada por ácidos diterpênicos responsável

por 55 a 60 % do líquido a outra parte formada por um óleo essencial, composto de sesquiterpenos. Os principais sesquiterpenos encontrados no óleo-resina da copaíba são β -cariophileno a β -bisaboleno. A parte resinosa é formada principalmente de ácido copálico. O óleo-resina, apresenta inúmeras propriedades farmacológicas, anti-inflamatória, diurética, antimicrobiana, antifúngica, analgésica [35].

Dentre as inúmeras ações farmacológicas a função antimicrobiana é uma das mais estudadas, ela afeta a permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana. Com isso, ele atua na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas [30].

Os óleos essenciais atuam modificando a permeabilidade da membrana citoplasmática para íons de hidrogênio e potássio, interrompendo os processos vitais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações que dependem de enzimas, resultando na perda do controle quimiosmótico da célula afetada, matando a bactéria [30].

Um estudo *in vitro* utilizando óleo essencial de Copaíba nas concentrações 50%,25%,12,5%,6,25%,3,125% e 1,56%, Rodrigues et al [36], avaliam a ação bactericida frente a bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. que foram divididas em *Staphylococcus* coagulase negativa (STAPHCN), *Staphylococcus aureus* (STAPHA) e *Staphylococcus* coagulase positiva (STACP). Aproximadamente 45% das amostras foram inibidas de seu crescimento natural em concentrações de 25% e 50% do óleo de Copaíba.

FARIA et al., [37] avaliaram a ação do óleo resina e do óleo essencial de *Copaifera* spp. frente a microorganismos isolados do leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica. O óleo resina apresentou boa atividade antimicrobiana frente aos *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo e *Corynebacterium* spp. O óleo essencial demonstrou boa inibição de *Staphylococcus* coagulase negativo e *Corynebacterium* spp.

Várias patentes são descritas utilizando o óleo de copaíba em sua base, porém todas para a medicina humana. Seguem alguns exemplos:

- PI0404266-2: “Método de fabricação de um gel de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) com atividade antibacteriana para controle de placa ou biofilme dental”;

- P11004276-8: “Composição farmacêutica à base de óleo de copaíba padronizada (*Copaifera ssp*) para tratamento de doenças ginecológicas”;
- MU8203234-3: “Tratamento de hemorroidas, com óleo vegetal extraído de plantas da espécie das copaíbas (copaíba);
- PI0404266-2: “Método de fabricação de um gel de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) com atividade antibacteriana para controle de placa ou biofilme dental”.

Dentre as espécies com potencial antimicrobiano, outro exemplo é a melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Cheel.), também conhecida por *tea tree*, árvore-ti e árvore-do-chá. É uma árvore aromática pertencente à família Myrtaceae, originária da Austrália, e com grande interesse econômico devido à presença de óleo volátil armazenado no tecido foliar [42].

O óleo é extraído das folhas da *Melaleuca alternifolia*, ou *Tea Tree*, árvore nativa da Austrália [43] entretanto, existem relatos de extração do óleo dos ramos e caule também. Esta árvore, de casca fina e folhas pontiagudas, é pertencente à família das mirtáceas (Myrtaceae), subfamília Leptospermoideae, gênero *Melaleuca* [44].

Segundo Castelo et al. [45], o padrão exigido para a comercialização internacional do óleo essencial de melaleuca é definido por duas instituições: *Standards Association of Australian* (AS 2782-85) e a *International Standard Organization* (ISO - 4730, 1996). Ambas as normativas estabelecem a qualidade comercial pelas concentrações dos seus compostos majoritários, o terpinen-4-ol e 1,8-cineol, o primeiro responsável pela atividade antimicrobiana sendo que sua concentração no óleo essencial deve ser no mínimo 30% e o segundo componente, 1,8 cineol, que possui propriedades irritantes à pele, deve ter uma concentração máxima de 15%.

De acordo com Carson et al.,[46] o componente principal do óleo essencial de melaleuca é o terpeno, especificadamente, terpinen-4-ol (mínimo de 30%) que detêm a principal atividade antimicrobiana, pois induz perda da membrana, interferindo na integridade e fisiologia bacteriana.

1.2.3 Associação entre óleos essenciais

O uso de mais de um óleo essencial com vistas ao efeito antimicrobiano pode resultar em efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos. A resposta obtida a partir da associação de dois ou mais compostos, cuja resultante é maior do que a simples soma dos efeitos isolados de cada um deles, é denominada de Sinergismo. O sinergismo pode ocorrer com medicamentos que possuem os mesmos mecanismos de ação (aditivo); que agem por diferentes modos (somação) ou com aqueles que atuam em diferentes receptores farmacológicos (potencialização). Quanto ao antagonismo, a resposta farmacológica é anulada ou reduzida na presença de outro, que pode ser dada pela competição destes pelo mesmo sítio receptor [47].

Uma maneira de se analisar o efeito da associação entre compostos é aplicando-se o índice de combinação (Icomb). Este índice usa o princípio de aditividade de *Loewe*, que estabelece relação quando os fármacos são administrados em associação e, no caso das doses capazes de causar 50% de dano quando os fármacos são administrados em monoterapia. O índice igual ao número um (01) indica aditividade, menor que o número um (01), indica sinergismo e, maior que o número um (01), antagonismo [48].

Segundo Vuuren e Viljoen (49), a combinação de compostos com efeito sinérgico pode aumentar a biodisponibilidade de substâncias ativas e/ou reduzir as doses e, por consequência, a toxicidade e efeitos adversos diminuem, para o aumento da eficácia terapêutica [49].

Combinando rifaximina (RIF) com óleo essencial (OE) de *Melaleuca armillaris*, e sendo avaliados em pH 7,4, 6,5 e 5,0, que representam condições intracelular onde o *Staphylococcus aureus* é usualmente alocado, foi observado um efeito sinérgico entre as duas substâncias, uma vez que a mistura de 0,004 µg / mL de RIF e 12,5 µL/mL de EO levou a um efeito de erradicação contra cepas de tipo selvagem do *Staphylococcus aureus* em pH 7,4. A condição de pH do meio melhora a atividade EO/RIF, então o EO seria um bom adjuvante para RIF para tratar infecções estafilocócicas e diminuir a resistência antimicrobiana BOULDAIN et al.,[50].

Mc Phee et al. [51] avaliaram o produto fitocêutico Phyto-Mast® que é vendido no mercado norte americano para tratamento de mastite. O Phyto-Mast® contém

quatro óleos essenciais de plantas em uma base de óleo de canola: Tomilho de jardim (princípio ativo é o Timol, que tem bioatividade como antiinflamatório e anti-séptico), Óleo de gaultéria (princípio ativo é o Salicilato de metila, que tem bioatividade como analgésico, antipirético), Alcaçuz chinês (princípio ativo é o Glycyrrhizin, que tem bioatividade como antiinflamatório e demulcente), Angelica chinesa (princípio ativo é o α -Pineno, que tem bioatividade como antiinflamatório e estimulante circulatório). O estudo avaliou o resíduo de timol no leite dos animais tratados com o produto. Os pesquisadores usaram cabras em lactação (infusão intramamária de 10 mL no total por animal) como um modelo de custo-benefício para estimar a cinética de eliminação do timol em vacas leiteiras. Com base na ausência de qualquer resposta sistêmica ou local à infusão do fitocênico e na ausência de qualquer alteração no CMT, concluíram que o produto não foi irritante; e que o produto não causou inflamação no úbere ou crescimento bacteriano. Detectaram timol em amostras de plasma a partir de 15 minutos após o tratamento, e abaixo do limite de quantificação (LOD), em 4 horas pós-tratamento. O timol foi detectado nas amostras de leite de 12 horas e não foi observado após 24 h pós-tratamento.

Sempre que a atividade potencial de um novo agente antimicrobiano é testada e comprovada, surgem preocupações em relação à toxicidade. Lahmar, et al., [52] ressaltam que a pele é a primeira barreira envolvida na administração de drogas. Os autores usaram células de queratinócitos humanos (HaCat) como modelo para examinar a citotoxicidade dos agentes antimicrobianos naturais atuais (*Pituranthos chloranthus*, *Teucrium ramosissimum* e *Pistacia lentiscus*) individualmente e em combinação com antibióticos, para inibir o crescimento de patógenos clínicos altamente resistentes. O resultado obtido sugere que óleos essenciais aplicados na concentração mínima inibitória não exibiu toxicidade.

Mason et al. [53] avaliaram a farmacocinética de 3 compostos (alho, timol e carvacrol) usados em bovinos leiteiros orgânicos saudáveis e mastíticos. Os pesquisadores usaram as informações para estimar o tempo de retenção do leite usando métodos consistentes com os requisitos do FDA dos EUA. Para a administração intra-mamária de timol e carvacrol intra-mamária ou tópica, todos os compostos foram parcialmente absorvidos para o corpo a partir do leite ou da pele. O timol e o carvacrol foram mensuráveis no plasma (a 0,0183 e 0,0202 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente) após a administração intramamária com semividas de eliminação

semelhantes de 1,7 h. As concentrações de timol e carvacrol no leite de bovinos saudáveis foram 7.367 e 4.487 µg/ mL, respectivamente. As concentrações de timol e carvacrol no leite de bovinos com mastite foram 5.563 e 7.353 µg/ mL, respectivamente. Apesar dos compostos serem produtos naturais, eles devem ter um tempo de retenção para o leite de pelo menos 24 horas após a administração. Para o alho, os níveis permaneceram abaixo do limite de detecção no leite e no plasma e, portanto, nenhum tempo de retirada parece ser necessário para o leite.

1.3. Hipótese

A hipótese do trabalho é de que em função da propriedade antimicrobiana e de sinergia entre os óleos essenciais de Copaíba e Melaleuca, o uso dos mesmos em combinação será eficiente no controle do crescimento das bactérias identificadas no leite proveniente de sistema orgânico de produção.

1.4. Objetivos geral e específico

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do óleo essencial de copaíba e de melaleuca no controle de microrganismos causadores de mastite subclínica em propriedade orgânica de produção de leite.

Especificadamente, os objetivos do trabalho foram:

- Verificar a prevalência de mastite subclínica no rebanho estudado;
- Identificar por meio de exame microbiológico, os microrganismos presentes no leite dos animais estudados;
- Avaliar a sensibilidade do microrganismo de maior prevalência no rebanho aos óleos essenciais de copaíba e melaleuca, em relação ao antimicrobiano sintético Ceftriaxona;

2 MATERIAS E METODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso Animal (CEUA) da instituição de origem, Universidade Brasil, com o número de protocolo N°1900017 (ANEXO 1).

2.1 Animais e manejo

Foram utilizados animais do rebanho comercial de produção orgânica, composto por 50 vacas leiteiras principalmente da raça Jersey, sendo 10 em lactação. As vacas leiteiras em lactação são manejadas em sistema de pastejo rotacionado, com disposição de área sombreada para o descanso e espera de ordenha (Figura 1). Após a ordenha, recebem dieta concentrada no cocho de alvenaria, em área de sombreamento natural. A ordenha dos animais é mecânica, em sala de ordenha com fosso e conjunto de ordenhadeira, modelo espinha de peixe (Figura 2).



Figura 1. Área sombreada com cocho para o descanso após a ordenha



Figura 2. Sala de ordenha tipo espinha de peixe.

Para o procedimento de *pre-dipping* utilizou-se solução de hipoclorito de sódio 2% e para o *pós-dipping* solução a base de iodo (Della Barrier®). Todos os produtos utilizados são recomendados para uso na atividade orgânica de produção de leite.

2.2 Identificação dos animais experimentais e amostragem do leite

Durante a coleta das amostras do leite que foi realizada na primeira ordenha do dia, os tetos foram higienizados pela imersão em solução antisséptica a base de hipoclorito de sódio, posteriormente secos com papel toalha, uma nova antissepsia foi realizada com lenço umedecido com álcool 70% que foi removida com álcool 70% e, secos com papel toalha. Após a higienização foi seguido o teste da caneca telada e o *California Mastitis Test* (CMT) (Figura 3).



Figura 3. Exame Califórnia Mastitis test nas vacas do rebanho do sistema orgânico de produção.

Desta maneira, selecionaram-se os 10 animais que revelaram casos positivos para mastite subclínica e utilizadas na amostragem, sendo os resultados classificados em escores de acordo com ausência ou presença de viscosidade conforme descrito na Tabela 03.

Tabela 03: Classificação dos resultados das amostras de leite submetidas ao CMT (*California Mastitis Test*) em escores e quantidade de quartos acometidos

Resultado da análise	Escore	Quartos acometidos
0	Negativo	0
+ (uma cruz)	Positivo	12
++ (duas cruces)	Positivo	17
+++ (três cruces)	Positivo	11

Foram coletados 10 mL de leite dos tetos positivos ao CMT, em frascos estéreis de 25 mL, abertos apenas no momento da coleta e fechados em seguida. As amostras foram transportadas refrigeradas até o laboratório para realização dos testes microbiológicos.

2.3 Estudos nos óleos essenciais

Os óleos essenciais de copaíba (C) e melaleuca (M) foram avaliados individualmente nas proporções 100, 75, 50 e 25% e em misturas binárias nas proporções 75, 50 e 25%, totalizando 11 misturas, avaliadas em triplicatas. A concentração de cada mistura foi de 90% v/v (90 µL do óleo ou mistura e 0,1 µL de acetona) (Tabela 04). As misturas foram avaliadas no teste de sensibilidade microbiana (antibiograma pelo teste de disco-difusão).

Tabela 04: Caracterização das misturas individuais e binárias dos óleos essenciais de copaíba e melaleuca avaliadas.

Tratamento	Copaíba (C)	Melaleuca (M)	Veículo (óleo de canola)	Acetona
100%C	1,00	0,00	0,00	0,10
75%C	0,75	0,00	0,25	0,10
50%C	0,50	0,00	0,50	0,10
25%C	0,25	0,00	0,75	0,10
100%M	0,00	1,00	0,00	0,10
75%M	0,00	0,75	0,25	0,10
50%M	0,00	0,50	0,50	0,10
25%M	0,00	0,25	0,75	0,10
75%C25%M	0,75	0,25	0,00	0,10
50%C50%M	0,50	0,50	0,00	0,10
25%C75%M	0,25	0,75	0,00	0,10

Foi estimado o Índice do Efeito Inibitório (IEI), com base nos diâmetros médios de zona de inibição de crescimento (DZI) dos microrganismos avaliados nos óleos individuais em relação aos DZIs apresentados nas misturas binárias, sendo o cálculo baseado nas equações 1, 2 e 3.

$$(1) EI_C = \frac{\text{Diâmetro da zona de inibição (C)}}{\text{Diâmetro da zona de inibição (mistura C+M)}}$$

$$(2) EI_M = \frac{\text{Diâmetro da zona de inibição (M)}}{\text{Diâmetro da zona de inibição (mistura C+M)}}$$

$$(3) IEI = \sum EI = EI_C + EI_M$$

Onde, EI_C = Efeito inibitório do óleo essencial da copaíba (C); EI_M = Efeito inibitório do óleo essencial de melaleuca (M); IEI (Índice do Efeito Inibitório) = somatório do Efeito inibitório do óleo essencial C e Efeito inibitório do óleo essencial M; $IEI < 1$ = sinergia; $IEI > 1$ = antagonismo e $IEI = 1$ = interação aditiva da mistura.

2.4 Testes microbiológicos

O isolamento bacteriano realizado das amostras coletas de leite foi realizado através de plaqueamento em ágar base acrescido de sangue ovino a 5% e ágar Levine; posteriormente as placas foram incubadas em aerobiose 37°C por até 120 horas, procedendo leituras às 24 e 48 horas-após a incubação.

O crescimento bacteriano foi analisado através das características macroscópicas das colônias (morfologia, tamanho, pigmentação, presença de hemólise) e características microscópicas morfotintoriais através de esfregaços corados pelo método de Gram. Posteriormente, foram utilizados testes bioquímicos específicos para identificação de bactérias [54].

Após a identificação microbiológica, foi utilizada a cepa da bactéria encontrada com a maior frequência nas amostras de leite dos animais e, da bactéria *Staphylococcus aureus* e aplicada a técnica de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton para avaliar a atividade antimicrobiana.

Realizou-se avaliação de sensibilidade pelo teste disco-difusão em meio Agar Mueller-Hinton, com alíquotas de 10µL do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) puro e de suas diluições (Tabela 4) utilizando como diluente óleo de canola e acetona. Com auxílio de pipeta de volume de 10µL, obteve-se a quantidade das misturas unitárias ou binárias dos óleos essenciais, que foram depositados sobre os discos estéreis de 11 mm de diâmetro e após a secagem dos discos em estufa de circulação forçada a 40°C por 30 minutos procedeu-se a realização dos testes [55] (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1998). Controles positivos foram realizados com discos do antibiótico Ceftriaxona e o controle negativo com o óleo de canola, que foi usado como veículo nas diluições realizadas nos óleos de copaíba e melaleuca. Este teste foi realizado em triplicata. A leitura da zona de inibição do crescimento foi feita com medição dos halos de inibição (diâmetro da zona de inibição) em milímetros e o resultado foi a média das medidas das triplicatas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Triagem dos exames de CMT, CCS e identificação de animais experimentais

Os resultados dos exames microbiológicos, escore do CMT (*California Mastitis Test*) e correspondente microrganismo isolado, dos quartos mamários de 10 vacas selecionadas do sistema de produção orgânico são apresentados na Tabela 05.

Tabela 05: Resultados dos exames microbiológicos e do CMT, associados ao patógeno isolado.

Contagem de Célula Somática (x 10 ³ /mL)	Escore de CMT	Patógeno isolado
1060	+++	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
1310	++	<i>Staphylococcus aureus</i>
131	++	<i>Corynebacterium bovis</i>
51*	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
371	++	<i>Trueperella pyogenes</i>
338	++	<i>Corynebacterium bovis</i>
160	+++	Negativo
1050	+++	<i>Staphylococcus aureus</i>
1024	+++	<i>Corynebacterium bovis</i>
59*	++	<i>Staphylococcus chromogenes</i>

*Duas não afetam a produção e as demais encontram-se bem acima do número considerado risco 200 x 10³/mL

Todos os animais amostrados apresentaram reação positiva ao teste de CMT, que está relacionado a altas contagens de células somáticas e a presença de patógenos relacionados à infecção da glândula mamária, com exceção de um caso negativo no isolamento do patógeno, no entanto, positivo ao teste de CMT.

A CCS do leite é uma ferramenta importante para o diagnóstico da mastite subclínica e é internacionalmente aceita como critério para avaliar a saúde da glândula mamária de uma vaca. Para confirmar a doença utiliza-se valor limite de 200 mil células somáticas/ mL (CCS/mL), portanto um animal com CCS acima deste valor é considerado com mastite subclínica [8].

Na Tabela 06, pode-se observar que em quarenta tetos amostrados, em 12 deles foi isolada a bactéria *Staphylococcus aureus*, correspondendo a 30% do total

de bactérias isoladas. Em 11 tetos, foi observada a presença do *Corynebacterium bovis*, correspondendo a 27,5% do total de bactérias.

Tabela 06: Resultado do isolamento de bactérias, número absoluto de quartos mamários com o microrganismo isolado e a sua frequência relativa

Bactéria isolada	Número de quartos com o patógeno identificado	Frequência relativa das bactérias isoladas (%)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	30
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2	5
<i>Corynebacterium bovis</i>	11	27,5
<i>Trueperella pyogenes</i>	3	7,5
Negativo	8	20
Total de quartos mamários	40	100

A presença da bactéria *Staphylococcus chromogenes* está associada a infecções persistentes e com alta contagem de células somáticas. Atualmente a espécie de SCN (*Staphylococcus coagulase negative*) mais frequentemente isolada de mastite bovina [72, 73].

De acordo com Bramley et al., [74], a identificação de vacas infectadas com *S. aureus* e *S. agalactiae* é importante para que medidas de controle direcionadas para agentes contagiosos da mastite sejam recomendadas. Sendo assim, no presente estudo, essa frequência relativa de bactérias *S. aureus* e *C. bovis* caracteriza a ocorrência de mastite contagiosa, indicando falhas de manejo no processo de ordenha, principalmente, e indica que medidas de manejo na higiene de ordenha devem ser adotadas.

Langoni et al., [77], observaram em 66 diagnósticos positivos para mastite subclínica realizados através do CMT, em propriedade orgânica de produção de leite, que em 37,90% encontrou-se *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* (18,20%), *S. epidermidis* (15,20%), *Streptococcus uberis* (3,00%) e *S. dysgalactiae* (3,00%), e isolamento de mais de um agente bacteriano em 7,60% das amostras.

3.2. Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, isolado do leite orgânico

O resultado da atividade antibacteriana dos óleos essenciais Copaíba (C) e Melaleuca (M), individualmente e em combinações binárias, sobre o *Staphylococcus aureus*, isolado de leite orgânico bovino, está apresentado na Tabela 07.

O óleo essencial de Melaleuca avaliado individualmente, nas diluições 75, 50 e 25% e, em 100%, não apresentou inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* e, foi classificado como não sensível pela classificação de [56].

Observou-se que, em função do diâmetro do halo (diâmetro da zona de inibição), de 10 mm promovido pelo tratamento 100%C, a porcentagem de inibição foi de 33,3%; de 10,3 mm pelo tratamento 75%C, a porcentagem de inibição foi de 34,4%. Nos óleos de copaíba 100% e 75%, o *Staphylococcus aureus* demonstrou perfil de sensibilidade moderada. No tratamento 75%C e 25%M, atingiu-se halo de 17 mm, e a porcentagem de inibição passou para 56,7%, revelando sensibilidade do microrganismo avaliado, a essa mistura entre os óleos. O antimicrobiano sintético usado como controle positivo foi caracterizado como causador de extrema sensibilidade ao *Staphylococcus aureus* (100,0% I) [56].

Tabela 07. Atividade antimicrobiana, determinada pelo método de disco-difusão, dos óleos essenciais de Copaíba (C) e Melaleuca (M) e suas misturas binárias sobre o microrganismo patogênico *Staphylococcus aureus*.

Tratamentos	<i>Staphylococcus aureus</i>			Sensibilidade à ação antibacteriana ³
	DZI ¹		% I ²	
100%C	10,0 ± 0,0	C	33,3 ± 0,0	C (+)
75%C	10,3 ± 0,6	C	34,4 ± 1,9	C (+)
50%C	0,0 ± 0,0	D	0,0 ± 0,0	D (-)
25%C	0,0 ± 0,0	D	0,0 ± 0,0	D (-)
100%M	0,0 ± 0,0	D	0,0 ± 0,0	D (-)
75%M	0,0 ± 0,0	D	0,0 ± 0,0	D (-)
50%M	0,0 ± 0,0	D	0,0 ± 0,0	D (-)
25%M	0,0 ± 0,0	D	0,0 ± 0,0	D (-)
75%C25%M	17,0 ± 0,0	B	56,7 ± 0,0	B (++)
50%C50%M	0,0 ± 0,0	D	1,8 ± 0,0	D (-)
25%C75%M	0,0 ± 0,0	D	0,0 ± 0,0	D (-)
Ceftriaxona	30,0 ± 0,0	A	100,0 ± 0,0	A (++++)
Testemunha	0,0 ± 0,0	D	0,0 ± 0,0	D (-)

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

100%C = óleo de copaíba; 75%C = 75% óleo de copaíba e 25% óleo vegetal; 50%C = 50% óleo de copaíba e 50% óleo vegetal; 25%C = 25% óleo de copaíba e 75% óleo vegetal; 100%M = óleo de melaleuca; 75%M = 75% óleo de melaleuca e 25% óleo vegetal; 50%M = 50% óleo de melaleuca e 50% óleo vegetal; 25%M = 25% óleo de melaleuca e 75% óleo vegetal; 75%C25%M = 75% óleo de copaíba e 25% óleo de melaleuca; 50%C50%M = 50% óleo de copaíba e 50% óleo de melaleuca; 25%C75%M = 25% óleo de copaíba e 75% óleo de melaleuca; Ceftriaxona = controle positivo; Testemunha = controle negativo.

DZI: Diâmetro da zona de inibição; %I: Inibição do óleo essencial em relação ao controle positivo (Ceftriaxona);

¹ Valores das médias ± desvio padrão de três repetições, expressas em mm

² Valores das médias ± desvio padrão de três repetições, expressas em %

³ Classificação: (++++) sensibilidade extrema, (++) sensível, (+) sensível moderadamente, (-) não sensível (Djabou et al., 2013)

Com base nos padrões pré-estabelecidos pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), responsável pela padronização dos antibiogramas, foi escolhido o diâmetro dos halos entre 22 a 28 como padrões da Ceftriaxona para inibição de *Staphylococcus aureus*, para comparação com os halos formados pela aplicação dos tratamentos avaliados. Muitos padrões aceitos e aprovados são publicados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para testes de bactérias e leveduras, embora nem todas as bactérias patogênicas possam ser testadas com precisão por este método, a padronização foi feita para testar certos patógenos bacterianos [57].

O desenvolvimento de tais padrões metodológicos não garante a relevância clínica de tais testes. No entanto, permite que o bioensaio seja realizado em uma abordagem padronizada, a fim de avaliar a relevância clínica dos resultados [58].

Na técnica de disco-difusão, geralmente, o agente antimicrobiano se difunde no ágar e inibe a germinação e o crescimento do microrganismo de teste e, em seguida, os diâmetros das zonas de inibição de crescimento são medidos (Figura 04).

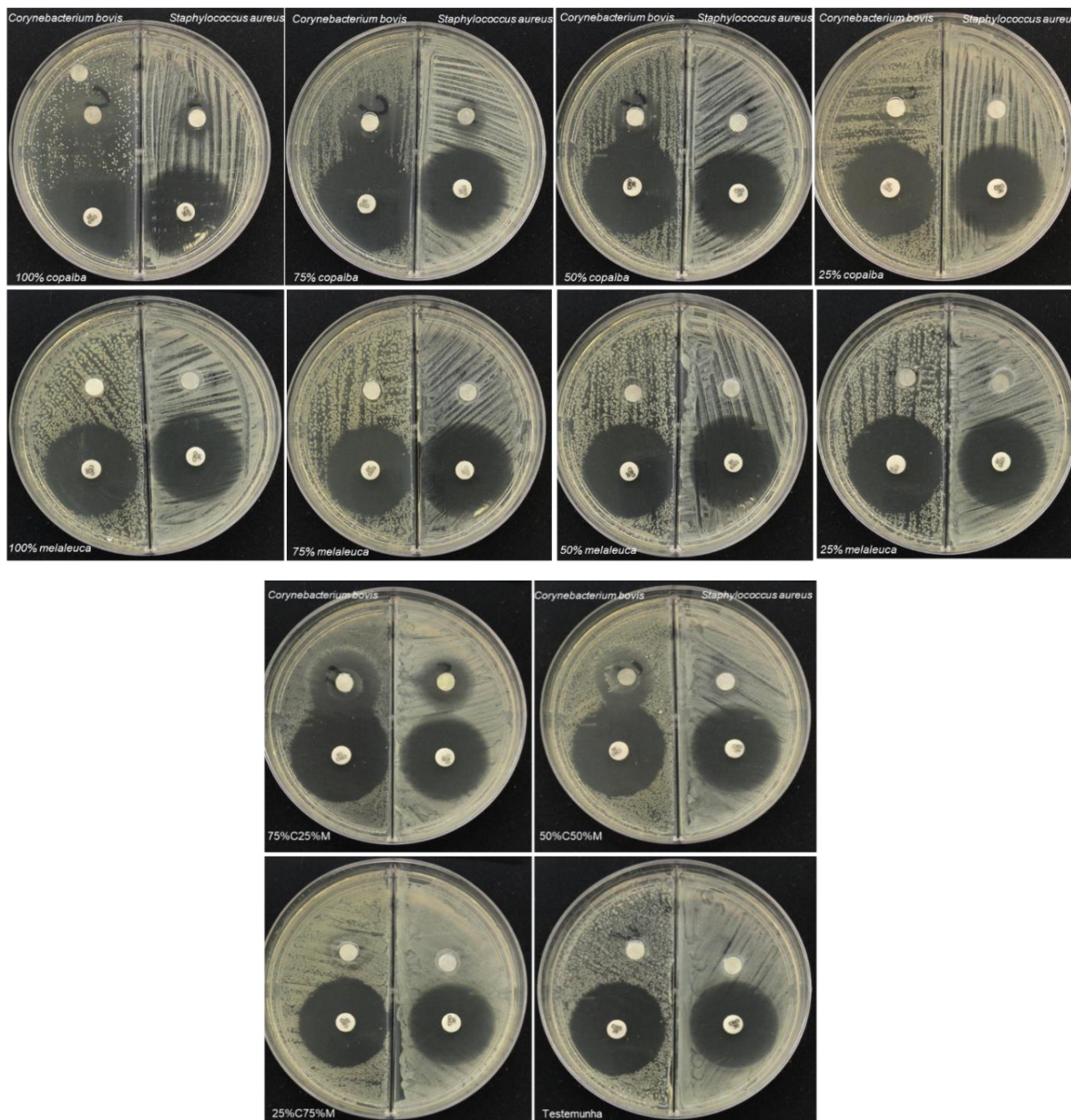


Figura 04: Antibiograma realizado pela técnica de disco difusão, utilizando o óleo de copaíba e melaleuca nas proporções 100, 75, 50 e 25% para avaliação do crescimento do *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus aureus*.

A partir da verificação dos tamanhos dos halos formados (diâmetro da zona de inibição) no teste de antibiograma (disco-difusão) do presente estudo, em comparação à ação antibacteriana de um antimicrobiano sintético e padrão como a Ceftriaxona, foi possível identificar que os óleos de copaíba (50 e 25%) e melaleuca

(100, 75, 50 e 25%) e nas combinações 50%C50%M e 25%C75%M, não apresentaram halos inibitórios satisfatórios para serem enquadrados como potencial antibacteriano.

O antibiograma fornece resultados qualitativos, categorizando as bactérias como suscetíveis, intermediárias ou resistentes [59]. Portanto, é uma ferramenta de tipagem baseada no fenótipo de resistência da cepa microbiana testada, seus resultados também orientam na seleção apropriada de tratamentos empíricos iniciais [60].

Por outro lado, vale ressaltar que não se tem disponível dados padronizados sobre as propriedades de difusão dos óleos de copaíba e melaleuca sobre o ágar Mueller-Hinton, usado na técnica de disco-difusão para avaliar a atividade antimicrobiana. A característica de difusão sobre o ágar, dos óleos impregnados nos discos de papel usados na técnica, pode interferir na dimensão do halo formado. Informações que podem ser corroboradas por Takarada et al. [61] e Nascimento et al. [62] pois indicam que a alta viscosidade da emulsão e a formação de micelas pelo uso do emulsificante Tween que foi utilizado, podem interferir durante a impregnação dos discos de papel utilizado na técnica de disco-difusão.

Um adendo que se deve fazer é sob o aspecto da solubilidade dos óleos essenciais em meios com água e ágar. Infelizmente, muitos dos compostos em óleo essencial têm baixa solubilidade aquosa. Geralmente, quanto menor a solubilidade em água de um composto, maior a solubilidade relativa [63]. Terrance e Lawrence [64] informaram que todos os componentes de óleo essencial terpênico incluídos em seu estudo apresentaram solubilidade aquosa reduzida à medida que a concentração de sólidos solúveis aumentava. Segundo os autores, de acordo com a solubilidade em água, os óleos essenciais são insolúveis devido aos ácidos graxos e, sendo assim, não podem ser dispersos uniformemente na água, ou meio que a contém, antes do uso ou aplicação nos testes de disco-difusão. Para Wang et al., [65], a não-uniformidade no uso de óleos essenciais cria o problema de dispersão sobre áreas, que pode ser na pele, pelo, ou em planta, representando a principal ineficácia da aplicação do óleo essencial, tão como a sua penetração, uma vez que, os óleos essenciais em uma forma pura não penetram, intensificando o problema, quando está exposto a interferências climáticas, por exemplo, lavado pela chuva ou evaporado rapidamente pelo ar.

Quanto à técnica de disco-difusão, deve ser levado em consideração aspectos da vantagem dessa técnica, pois segundo Balouri et al. (2016), dentre as vantagens destaca-se, principalmente, a simplicidade e o baixo custo, que têm contribuído para seu uso comum para a triagem antimicrobiana de extratos vegetais, óleos essenciais e outras drogas. De acordo com Reller et al., (2009), as vantagens são a simplicidade do teste que não requer nenhum equipamento especial, o fornecimento de resultados categóricos facilmente interpretados por todos os médicos e a flexibilidade na seleção dos discos para teste. É o menos caro de todos os métodos de suscetibilidade (aproximadamente \$ 2,50- \$ 5 por teste de materiais). As desvantagens do teste de disco são a falta de mecanização ou automação do teste.

Ao avaliarem extratos etanólicos, hexânico, clorofórmico e aquosos de plantas medicinais observaram que o extrato etanólico de aloe vera apresentou zona inibitória máxima contra o isolado padrão de *S. aureus*, mas não conseguiu suprimir o crescimento nas análises da concentração inibitória mínima (CIM), revelando que técnicas para a avaliação do potencial antimicrobiano devem ser complementares. O valor de CIM registrado é definido como a concentração mais baixa do agente antimicrobiano testado que inibe o crescimento visível do microrganismo testado e é geralmente expresso em µg/ mL ou mg/ L. Os autores indicam a possibilidade de haver, também, evaporação dos componentes ativos, foto oxidação ou quantidade insuficiente do componente ativo [67, 68].

Balouri et al., [66] evidenciam que o fato de um extrato de planta exibir atividade antimicrobiana é interessante, mas esta parte preliminar dos dados deve ser confiável e permitir aos pesquisadores comparar os resultados, evitando trabalhos em que os pesquisadores utilizem a investigação da atividade antimicrobiana apenas como complemento de um estudo fitoquímico.

Quanto ao fato do resultado da inibição do crescimento do *S. aureus* no tratamento 75%C e 25%M apresentar-se superior ($p < 0,05$) em relação aos óleos individuais, pode-se inferir a presença da ação sinérgica entre eles. No caso das combinações entre o óleo de copaíba e melaleuca em 50%C e 50%M e 25%C e 75%M, não foi observada inibição do crescimento do microrganismo avaliado, apresentando-se diferentes ($p < 0,05$) em relação ao tratamento 75%C e 25%M. É possível que essa diferença na inibição observada entre essas combinações (50%C e 50%M; 25%C e 75%M vs 75%C e 25%M) seja, provavelmente, devida a um ou mais compostos ativos que se sobrepõem na maior participação do óleo de copaíba e,

tenha ação sinérgica aditiva com componente de intensa atividade antimicrobiana no óleo de Melaleuca.

A atividade antimicrobiana do óleo de Melaleuca, segundo (FURNERI et al., [69]), foi atribuída, principalmente, a terpinen-4-ol e 1,8-cineole, principais componentes do óleo. Os principais constituintes foram terpinen-4-ol (41,98%), γ -terpinene (20,15%), α -terpinene (9,85 %), 1,8-cineole (6,03%) e terpinolene (4,15%). Essas substâncias indicaram algumas atividades, como antibacterianas, antifúngicas, antivirais, e atividades antiprotozoárias, todas promovendo o óleo como agente terapêutico. Os autores ressaltaram que o terpinen-4-ol, é uma-substância amplamente conhecida por apresentar intensa atividade antimicrobiana, tanto em bactérias quanto em fungos.

Carson et al.,[70] indicaram que interações entre componentes presentes nos óleos essenciais e as estruturas das bactérias desempenham um papel fundamental nas ações antimicrobianas, sendo especificadamente, o óleo de melaleuca, dotado de composição química rica em terpinen-4-ol, porém outros componentes podem ser importantes, como γ -terpinene, α -terpinene, 1,8-cineole, terpinolene, p -cymene, α -pinene, α -terpineol, aromadendrene, δ -cadinene, limoneno, sabinene, globuloleviridiflorol.

3.3 Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana sobre *Corynebacterium bovis*, isolado do leite orgânico

O resultado da atividade antibacteriana dos óleos essenciais Copaíba (C) e Melaleuca (M), individualmente e em combinações binárias, sobre o *Corynebacterium bovis*, isolado de leite orgânico bovino, está apresentado na Tabela 08.

Os óleos de copaíba avaliados isoladamente em 100 ou 75% apresentaram diâmetro da zona de inibição semelhantes entre si ($p < 0,05$) e foram classificados como promotores de sensibilidade moderada ao crescimento do *Corynebacterium bovis*. O óleo avaliado como 100%C apresentou porcentagem de inibição de 40,6% e em 75%C, de 35,4%. Ao ser avaliado em 50% observou-se porcentual de inibição maior, em relação ao 100%C e 75%C ($p < 0,05$), sendo o *Corynebacterium bovis* sensível a esta diluição. No entanto, o óleo de copaíba avaliado na diluição de 25%

não promoveu inibição de crescimento do microrganismo, sendo não sensível à ação do óleo, nesse tratamento.

Tabela 08: Atividade antimicrobiana, determinada pelo método de disco-difusão dos óleos essenciais de Copaíba (C) e Melaleuca (M) e suas misturas binárias sobre o microrganismo patogênico *Corynebacterium bovis*.

Tratamentos	<i>Corynebacterium bovis</i>			Sensibilidade à ação antibacteriana ³	
	DZI		% I		
100%C	13,0 ± 0,0	D	40,6 ± 0,0	D	(+)
75%C	11,3 ± 0,6	D	35,4 ± 1,8	D	(+)
50%C	18,3 ± 0,6	C	57,3 ± 1,8	C	(++)
25%C	0,0 ± 0,0	E	0,0 ± 0,0	E	(-)
100%M	0,0 ± 0,0	E	0,0 ± 0,0	E	(-)
75%M	0,0 ± 0,0	E	0,0 ± 0,0	D	(-)
50%M	0,0 ± 0,0	E	0,0 ± 0,0	E	(-)
25%M	0,0 ± 0,0	E	0,0 ± 0,0	E	(-)
75%C25%M	24,0 ± 1,0	B	75,0 ± 3,1	B	(+++)
50%C50%M	19,3 ± 1,5	C	60,4 ± 4,7	C	(++)
25%C75%M	0,0 ± 0,0	E	0,0 ± 0,0	E	(-)
Ceftriaxona	32,0 ± 0,0	A	100,0 ± 0,0	A	(+++)
Testemunha	0,0 ± 0,0	E	0,0 ± 0,0	E	(-)

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

100%C = óleo de copaíba; 75%C = 75% óleo de copaíba e 25% óleo vegetal; 50%C = 50% óleo de copaíba e 50% óleo vegetal; 25%C = 25% óleo de copaíba e 75% óleo vegetal; 100%M = óleo de melaleuca; 75%M = 75% óleo de melaleuca e 25% óleo vegetal; 50%M = 50% óleo de melaleuca e 50% óleo vegetal; 25%M = 25% óleo de melaleuca e 75% óleo vegetal; 75%C25%M = 75% óleo de copaíba e 25% óleo de melaleuca; 50%C50%M = 50% óleo de copaíba e 50% óleo de melaleuca; 25%C75%M = 25% óleo de copaíba e 75% óleo de melaleuca; Ceftriaxona = controle positivo; Testemunha = controle negativo.

DZI: Diâmetro da zona de inibição; %I: Inibição do óleo essencial em relação ao controle positivo (Ceftriaxona);

¹ Valores das médias ± desvio padrão de três repetições, expressas em mm

² Valores das médias ± desvio padrão de três repetições, expressas em %

³ Classificação: (+++) sensibilidade extrema, (++) sensível, (+) sensível moderadamente, (-) não sensível (Djabou et al., 2013)

Com o uso dos óleos de melaleuca em 100% ou nas diluições em 75, 50 ou 25% com o óleo vegetal (Canola), não houve efeito inibitório do crescimento do *Corynebacterium bovis*. Esse resultado pode ser atribuído à evaporação dos componentes ativos, foto oxidação ou quantidade insuficiente do componente ativo, sobretudo, no grupo terpeno. Gioppo et al. (2019), observaram composição em 73% de terpenos; sendo os compostos majoritários identificados como: terpinen-4-ol (45%), γ -terpineno (19,5%), α -terpineno (9,1%), α -terpineol (4,3%), terpinoleno (3,5%), p-cimeno (2,6%), α -pineno (2,2%), viridilorino (2,1%), limoneno (1,9%), cis-calameno (1,5%), b-gurjuneno (1,4%), 1,8-cineol (1,3%) e outros compostos minoritários

identificados como: α -thujeno (0,6%), sabineno (0,5%), β -pineno (0,6%), mirceno (0,6%), α -felandreno (0,5%) e outros (2,8%).

Quando comparado a outros estudos observou-se diferença na atividade inibitória, como Packer et al. [71], que observaram atividade bacteriostática do óleo essencial de *Melaleuca* contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e os halos de inibição obtidos foram de diâmetros maiores que 10 mm, diferindo assim deste estudo, talvez por ter sido abordado um método e meios de cultura diferentes aos empregados nesta pesquisa.

Foi observado um efeito inibidor do crescimento (75%) do *Corynebacterium bovis*, com um efeito sinérgico entre os óleos de copaíba e melaleuca, quando se utilizou 75%C e 25%M. Outros trabalhos de pesquisa sugeriram que a ação sinérgica ou antagônica dos componentes principais e secundários dos óleos essenciais deve ser levada em consideração para explicar suas propriedades antimicrobianas (CUTILLAS et al., [76]; FADLI et al., [77]).

Os óleos de copaíba e melaleuca, quando utilizados como 50%C e 50%M apresentaram diâmetro da zona de inibição do crescimento do *Corynebacterium bovis*, de 19,3 mm, representando uma porcentagem de inibição do crescimento deste microrganismo, de 60,4%, no entanto, menor que 75%C e 25%M ($p < 0,05$) que foi de 24,0 mm. Por outro lado, na composição 25%C e 75%M, não houve inibição do crescimento, o que também pode ser observado na Tabela 8.

4 CONCLUSÕES

Concluiu-se que o *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis* foram os microrganismos prevalentes nos casos de mastite do sistema orgânico de produção. A associação entre os óleos de copaíba e melaleuca, na proporção 75% C e 25% M, revela certo sinergismo, o que a torna potencial composição no tratamento de mastite em fazendas de sistema orgânico de produção, uma vez que inibe o crescimento do *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SIQUEIRA, KB. O Mercado Consumidor de Leite e Derivados. 120. ed. Juiz de Fora: Embrapa, 2019. 17 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199791/1/CT-120-MercadoConsumidorKennya.pdf> . Acesso em: 09 ago. 2020.
2. SOARES, JPG; AROEIRA, LJM; FONSECA, AH; FAGUNDES, GM; SILVA, JB. Produção Orgânica de Leite: Desafios e Perspectivas. *III Simpósio Nacional de Bovinocultura de Leite e 1st International-Symposium-of-Dairy-Cattle*. 2006. Disponível em:< <http://www.simleite.com/arquivosAnais/arquivo38> >. Acesso: 11 de ago 2020.
3. ALVES, ACO.; SANTOS, ALS; AZEVEDO, RMMC. Agricultura Orgânica no Brasil: Sua Trajetória para a Certificação Compulsória. 2012. *Revista Brasileira de Agroecologia*. 7(2): 19-27(2012). ISSN: 1980-9735. v.72, n.2, p.19-27, 2012. Disponível em:< http://orgprints.org/22814/1/Alves_Agricultura%20org%C3%A2nica.pdf> . Acesso: 11 ago 2020.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 007 de 17 de maio de 1999. - Normas disciplinadoras para a produção, tipificação, processamento, envase, distribuição, identificação e certificação da qualidade de produtos orgânicos, sejam de origem animal ou vegetal. Brasília, 1999a. Disponível <em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/produtosfito/ssanitarios/IN46.2011alteradapelaIN17.2014epelaIN35.2017.pdf> > . Acesso 13 de agosto de 2020
5. MANÇO, C. Pecuária orgânica leiteira. Rio de Janeiro: Sociedade Nacional de Agricultura. 34 p. 2017. Disponível em: <https://ciorganicos.com.br/wp->

- [content/uploads/2017/12/Pecuaria-Organica-Leiteira_web.pdf](#) . Acesso em: 10 ago. 2020.
6. GUATIMOSIM, P. Pesquisa revela detalhes da produção orgânica de leite no RJ. 2020. Disponível em: <http://www.faperj.br/?id=3939.2.8> . Acesso em: 10 ago. 2020
 7. LEIRA.; et al. Fatores que alteram a produção e a qualidade do leite: Revisão. Revista Pubvet. v.12, n.5, a85, p.1-13, Maio., 2018, [ISSN 1982-1263]. Disponível em < <https://www.pubvet.com.br/artigo/4780/fatores-que-alteram-a-produccedilatildeo-e-a-qualidade-do-leite-revisatildeo> > . acesso em 10 ago. 2020
 8. SANTOS, MV dos; FONSECA, LFL da. Controle da Mastite e Qualidade do Leite: Desafios e Soluções. 1º. ed. Pirassununga: [s. n.], 2019. 301 p.
 9. SILVA, LMV da. Caracterização Epidemiológica e Molecular de *Staphylococcus* Coagulase Negativa Resistentes aos Beta-Lactâmicos Isolados de Leite de Vacas com Mastite Subclínica. 2018. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Animal, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/ICAS-B8BFC7> . Acesso em: 10 jun. 2020.
 10. VISSIO, C *et al.* Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por lamastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. Archivos de Medicina Veterinaria, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 7-14, 2015. SciELO Comision Nacional de Investigacion Cientifica Y Tecnologica (CONICYT).<http://dx.doi.org/10.4067/s0301732x2015000100003>.
 11. GONÇALVES, JL. Impact of subclinical mastitis on milk yield and economic return of dairy cows. 2017. Tese (Doutorado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo,

- São Paulo, 2017. doi:10.11606/T.10.2017.tde-03052017-151813. Acesso em: 13 ago de 2020.
12. DIESER, AS. et al. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in Argentinean dairy herds. *Pakistan Veterinary Journal*. v. 34, n. 1, p. 124-126, 2014. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700001>. Acesso em 29 jun. 2020.
 13. ACOSTA, AC. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, n. 7, p. 565-573, 2016. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700001>. Acesso em 29 jun. 2020.
 14. BUSANELLO, M. Indicadores epidemiológicos de mastite subclínica, previsão da contagem de células somáticas do tanque e seu impacto relacionado ao pagamento por qualidade do leite em rebanhos leiteiros brasileiros [doi:10.11606/D.11.2017.tde-08062017-101341]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2017. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal e Pastagens. [acesso 2020-06-29].
 15. SILVA, N.. Doenças da Glândula Mamária/Mamite. In: MARQUES, D. C.. Criação de Bovinos. 7º Ed. Belo Horizonte: Consultoria Veterinária e Publicações, 2006. p. 435-450.
 16. RADOSTITS, OM. et al. Clínica Veterinária- Um tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Eqüinos. 9º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.541-587.
 17. TYLER, JW.; CULLOR, JS. Sanidade e Distúrbios da Glândula Mamária. In: SMITH, B. P.. Medicina Interna de Grandes Animais. 3º Ed. Barueri: Manole, 2006. p. 1019-1031.
 18. BRITO, JRF. et al. Controle da Mastite – ou Como Reduzir a Contagem de Células Somáticas do Rebanho Bovino Leiteiro. Disponível em:

- http://www.cnpqi.embrapa.br/nova/laboratorios/qualidade_leite/arquivos/contr_olarmastite.doc. Acesso em: 03 ago. 2020
19. SOUZA, FN. et al. Tratamento e Controle dos Principais Patógenos da Mastite Bovina. Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 60, n. 01, p.01-21, 2009
20. GONÇALVES, JL. Produção e composição do leite de vacas com mastite causada por *Corynebacterium* spp. 2012. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012. doi:10.11606/D.10.2012.tde-07062013-112423. Acesso em: 2020-08-17.
21. LANGONI, H; SALINA, A; OLIVEIRA, GC; JUNQUEIRA, NB; MENOZZI, BD; JOAQUIM, SF. Considerações sobre o tratamento das mastites. Pesquisa Veterinária Brasileira, [S.L.], v. 37, n. 11, p. 1261-1269, nov. 2017. Mensal. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2017001100011>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2017001101261 . Acesso em: 05 jul. 2020.
22. MASSOTE, Vitória Pereira *et al.* DIAGNÓSTICO E CONTROLE DE MASTITE BOVINA: uma revisão de literatura. Agroveterinária do Sul de Minas, Varginha/mg, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2019. Disponível em: <https://periodicos.unis.edu.br/index.php/agrovetsulminas/article/view/265/243> . Acesso em: 05 ago. 2020.
23. RUEGG, P.. Monitoramento da Mastite, Qualidade do Leite e Desempenho Leiteiro. In: XV Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, Uberlândia. Anais..., Uberlândia: CONAPEC, 2011
24. BRITO, MAVP.. Importância do Diagnóstico Microbiológico para a detecção da Mastite. In: III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, Recife. Anais..., Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008.

25. VESCO, J. da; SIEBEL, J.C.; SUZIN, G.O.; CERESER, N.D.; GONZALEZ, H.L. MONITORAMENTO DOS AGENTES CAUSADORES DE MASTITE E A SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS. *Expressa Extensão, Pelotas/rs*, v. 22, n. 1, p. 34-50, 29 jun. 2017. Quadrimestral. Universidade Federal de Pelotas. <http://dx.doi.org/10.15210/ee.v22i1>. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/expressaextensao/article/view/7886/7414>. Acesso em: 10 jul. 2020.
26. ZAFALON L.F.; NADER FILHO A.; OLIVEIRA J.V.; RESENDE F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibiótico terapia de vacas em lactação *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.3, p.577-585, 2007.
27. PANIZZI, L.; FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; MORELLI, I. Composition and antimicrobial properties of essential oils of 4 Mediterranean Lamiaceae. *Journal of Ethno pharmacology*, v. 39, p. 167-170, 1993.
28. HELANDER I.M.; ALAKOMI H.L.; LATVA-KALA K.; MATTILA-SANDHOLM T.; POL I.; SMID E.J.; GORRIS L.G.M.; VON WRIGHT A. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998.
29. CHAO, L.K. et al. Study on the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.7274-8, 2005.
30. SILVA, N.C.C. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010. Faltando informações.
31. PERINI, S. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente ao *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina.

- Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, 2013,71p. Faltando informações.
32. PORTO, AS. Desenvolvimento de nano emulsão O/A a base de óleo de copaíba, incorporadas com nano partículas magnéticas de zinco. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Nano ciência e Nano biotecnologia da Universidade de Brasília. Brasília-DF, 2015. Faltando informações.
33. YUNES, RA.; PEDROSA, RC.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, n.1, p. 48-56, 2001.
34. BASTOS OYARZABAL, ME et al. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas em leche de bovino. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Ciudad de la Habana, v. 16, n. 3, p. 260-266, sept.2011.
Disponível em http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962011000300006&lng=es&nrm=iso . Acesso em 15 agosto 2020
35. PIERI, FA.; MUSSI, MC.; MOREIRA, MAS. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.
Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S15160572200900040016&lng=en&nrm=iso. Acesso 10 agosto de 2020.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722009000400016>.
36. RODRIGUES, FG *et al.* Atividade bactericida da *Copaifera* sp. frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, Goiânia, v. 9, ed. 17, p. 293-301, 2013. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/CIENCIAS%20AGRARIAS/ATIVIDADE%20BACTERICIDA.pdf> . Acesso em: 11 ago. 2020.

37. FARIA, MJM. DE; BRAGA, CA DA S. B.; PAULA, JR. DE; ANDRÉ, MCDPB.; VAZ, BG.; CARVALHO, TC. DE; ROMÃO, W.; COSTA, HB. DA; CONCEIÇÃO, EC. DA. Atividade antimicrobiana de *copaifera* spp. Frente às bactérias isoladas de leite de vacas com mastite. *Ciência Animal Brasileira*, v. 18, n. online, p. 1-14 , mar. 2017.
38. SILVA, ATF; RIZZO, H. Efeitos da mastite por *Staphylococcus coagulase negativa* sobre a qualidade do leite: uma revisão. *REVISTA CIENTÍFICA DE MEDICINA VETERINÁRIA*, [s. l.], ed. 32, Janeiro v.2019 , n.32, p. , 2019. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/LSHI5j5duGogHs3_2019-4-4-19-11-31.pdf. Acesso em: 1 out. 2020.
39. AROEIRA, L.J.M.; CARNEIRO, J.; PACIULLO, D.S.C.; FERNANDES, E.N.; XAVIER, D.F.; FURLONG, J.; ALVIM, M.J. Tecnologias para Produção Orgânica de Leite, cap.29. In: Fernando Enrique Madalena, Leovegildo Lopes de Matos, Evandro Vasconcelos Holanda Jr. (Editores). *PRODUÇÃO DE LEITE E SOCIEDADE*. Uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil. 538p. 2001. Disponível em: http://www.iprociencia.org.br/livro_leite_sociedade.html Acesso: 14 mai 2019.
40. MASON SE, MULLEN KAE, WASHBURN SP, ANDERSON KL, BAYNES RE. Comparison of the pharmacokinetics of plant-based treatments in milk and plasma of USDA organic dairy cattle with and without mastitis. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2018;35(9):1716-1727.
41. VEIGA JUNIOR, VF.; PINTO, AC.; MACIEL, MA M.. Plantas medicinais: cura segura. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 28, n. 3, p. 519-528, June 2005 .
42. MARTINS, JA.S., et al., Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial in vitro de fungos fitopatogênicos. *Bioscience Journal (Online)*, v.27, p.49-51, 2011.

43. YADAV, E.; KUMAR, S.; MAHANT, S.; KHATKAR, S.; RAO, R. Tea tree oil: a promising essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, v.29, n.3, 2017.
44. OLIVEIRA, M. DE; SCHNEIDER, M.; DA ROSA, M.; DA SILVA, C. DA; MORAES, M.; SCHNEIDER, R.; KIST, L. Extração e caracterização do óleo essencial de melaleuca e desenvolvimento de uma formulação semi-sólida de uso tópico. *Revista Jovens Pesquisadores*, v.5, n.1, 2015.
45. CASTELO, A.V. M.; AFONSO, S.R.; MELO R.R. DE; DEL MENEZZI C.H.S.; CAMILLO, J.; VIEIRA, R.F.; Rendimento e composição química do óleo essencial de Melaleuca alternifolia Chell, na região do Distrito Federal. *Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.8, n.1, p.143-147, 2013.
46. CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. Melaleuca alternifolia (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*, v.19, n.1, p.50-62, 2006.
47. NIES AS, SPIELBERG SE. Principles of Therapeutics. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. New York: Mc Graw-Hill;1996. p. 43-62.
48. RAMAKRISHNAN R, JUSKO WJ. Interactions of aspirin and salicylic acid with prednisolone for inhibition of lymphocyte proliferation. *Inter Immunophar*, v.01, n.11, p.2035- 2042, 2001.
49. VANVUUREN, S.; VILJOEN, A. Plant-based antimicrobial studies – methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Médica*, v.77, n.11, p.302, 2011.

50. BULDAIN D, GORTARI CASTILLO L, BUCHAMER AV, et al. *Melaleuca armillaris* Essential Oil in Combination with Rifaximin Against *Staphylococcus aureus* Isolated of Dairy Cows. *Frontiers in Veterinary Science*, v.7, p.344, 2020. doi:10.3389/fvets.2020.00344
51. MCPHEE CS, ANDERSON KL, YEATTS JL, MASON SE, BARLOW BM, BAYNES RE. Milk and plasma disposition of thymol following intramammary administration of a phytoceutical mastitis treatment. *Journal Dairy Science*, v.94, n.4, p.1738-1743, 2011. doi:10.3168/jds.2010-3988
52. LAHMAR A, BEDOUI A, MOKDAD-BZEOUICH I, et al. Reversal of resistance in bacteria underlies synergistic effect of essential oils with conventional antibiotics. *Microbial Pathogenesis*, v.106, p.50-59, 2017. 106:50-59. doi: 10.1016/j.micpath.2016.10.018
53. MASON SE, MULLEN KAE, WASHBURN SP, ANDERSON KL, BAYNES RE. Comparison of the pharmacokinetics of plant-based treatments in milk and plasma of USDA organic dairy cattle with and without mastitis. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. v.35, n.9, p.1716-1727, 2018. doi:10.1080/19440049.2018.1502475
54. CARTER, C. G. *Fundamentos de Microbiologia e Micologia Veterinária*. São Paulo: Roca, 1998.
55. FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1998. p.V.4.2-4.2.2.
56. DJABOU N, LORENZI V, GUINOISEAU E, ANDREANI S, GIULIANI M-C, DESJOBERT JM, BOLLA JM, COSTA J, BERTI L, LUCIANI A, MUSELLI A. (2013). Phytochemical composition of Corsican *Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens. *Food Control* v.30, p.354-363. 2013.

57. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012
58. PFALLER, M.A.; SHEEHAN, D.J.; REX, J.H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clinical Microbiology Reviews*, v.17, p. 268–280, 2004.
59. JORGENSEN, J.H.; FERRARO, M.J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices, *Clinical Infectious Diseases*, v.49, p. 1749–1755, 2009.
60. CARON, F. Antimicrobial susceptibility testing: a four facets tool for the clinician, *Journal des Anti-infectieux*, v.14, p. 174-186, 2012.
61. TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N.; HONMA, K.; OKUDA, K.; KATO, T. 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiology and Immunology*, v.19, p. 61-64, 2004.
62. NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.31, n.4, p.247-56, 2000.
63. KOONTZ, J. Improved properties of natamycin upon formation of cyclodextrin inclusion complexes. Thesis, Virginia Tech: Blacksburg, VA, 2003

64. TERRANCE G, LAWRENCE GD. Solubilities of terpenic essential oil components in aqueous solutions. *Journal of Chemical & Engineering*, v.25, p.150-152, 1980.
65. WANG J, ZHU F, ZHOU XM, NIU CY, LEI CL. Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, v.42 p.339-347, 2006. doi: 10.1016/j.jspr.2005.06.001
66. BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutics Analysis*, v.6, n. 2, p. 71-79, 2016.
67. SADRNIA M, ARJOMANDZADEGAN M. Comparative Study on the Effects of Aloe Vera Extract in Clinical Strains of *Staphylococcus Aureus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus Epidermidis* and *Escherichia Coli* Compared to Antibiotics of Choice. *Journal of Arak University of Medical Sciences*, p.17, n.6, p. 39-46, 2014.
68. NAJEEB ULLAH, ABIDA PARVEEN, RAHAT BANO, IQRA ZULFIQAR, MUKHARMA MARYAM, SADIA JABEEN, AMNA LIAQAT, SOHAIL AHMAD, In vitro and in vivo protocols of antimicrobial bioassay of medicinal herbal extracts: A review, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, V. 6, n. 8, P. 660-667, 2016.
69. FURNERI, PIO MARIA & PAOLINO, DONATELLA & SAIJA, ANTONELLA & MARINO, ANDREANA & BISIGNANO, GIUSEPPE. (2006). In vitro antimycoplasmal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v.58. p.706-707, 2006. Doi:10.1093/jac/dkl269.

70. CARSON, C.F., HAMMER, K.A., RILEY, T.V., 2006. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Journal of Clinical Microbiology*, v.19, n.01, p.50-62, 2006.
71. PACKER JF, LUZ MMS 2007. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p.102-107, 2007.
72. SUPRÉ, K.; HAESEBROUCK, F.; ZADOKS, R.N. et al. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *Journal Dairy Science*, v.94, p.2329-2340, 2011.
73. TOMAZI, T.; GONÇALVES, J.L.; BARREIRO, J.R. et al. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, v.52, p.1658-1663, 2014.
74. BRAMLEY A.J., CULLOR J.S., ERSKINE R.J., FOX L.K., HARMON R.J., HOGAN J.S., NICKERSON S.C., OLIVER S.P., SMITH K.L.; & SORDILLO L.M. 1996. *Current Concepts of Bovine Mastitis*. 4th ed. National Mastitis Council, Madison. 64p.
75. CUTILLAS, A.-B.; CARRASCO, A.; MARTINEZ-GUTIERREZ, R.; TOMAS V.; TUDELA J.. Óleos essenciais de tomilho da Espanha: Perfil aromático determinado por GC – MS e suas atividades antioxidantes, anti-lipoxigenase e antimicrobiana. *Journal of Food and Drug Analysis*, v.26, p. 529 - 544, 2018. 10.1016 / J.JFDA.2017.05.004
76. FADLI M.; SAAD A.; SAYADI S.; CHEVALIER J.; MEZRIOUI NE; PAGES JM; HASSANI L. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais *Thymusmaroccanus* e *Thymusbroussonetii* contra a infecção nosocomial - bactérias e seu potencial sinérgico com antibióticos. *Phytomedicine*, v.19, p. 464 - 471, 2012. 10.1016 / j.phymed.2011.12.003

77. LANGONI, H et al. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.29, n.11, p.881-886, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009001100003> .
78. RIBEIRO, MG et al. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 29, n. 1, p. 52-58, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000100008>

ANEXO

1.RESOLUÇÃO – PARECER COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS – CEU/ UB



RESOLUÇÃO - PARECER COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS – CEUA

PROTOCOLO Nº 1900017

TÍTULO DO PROJETO

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO ÓLEO DE COPAÍBA E MELALEUCA COMO ANTIMICROBIANO AOS CAUSADORES DE MASTITE EM BOVINOCULTURA LEITEIRA ORGÂNICA.

RESPONSÁVEL

Nome completo	Liandra Maria Abaker Bertipaglia
Instituição	Universidade Brasil
Unidade	Descalvado
Departamento	Medicina Veterinária

RESOLUÇÃO – PARECER

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, na sua reunião de 12/06/2019

, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Assinatura – coordenadora da comissão

Cássia Maria Barroso Orlandi