

Universidade Brasil  
Campus Fernandópolis

BRUNO BENHOCCI SANTANA

AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii*  
*Desf.*) FRENTE AO AGENTE DA MASTITE: *Staphylococcus aureus*

ANTIMICROBIAL ACTION OF COPAÍBA OIL (*Copaifera langsdorffii* *Desf.*) AGAINST  
THE AGENT OF MASTITE: *Staphylococcus aureus*

Fernandópolis, SP  
2019

Bruno Benhocci Santana

AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera  
langsdorffii* Desf.) FRENTE AO AGENTE DA MASTITE: *Staphylococcus  
aureus*

Orientadora: Profª Drª. Liandra Maria Abaker Bertipaglia

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

Fernandópolis, SP  
2019

## Ficha catalográfica

S223a Santana, Bruno Benhocci.  
Ação antimicrobiana do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf) frente ao agente da mastite: *Staphylococcus aureus* / Bruno Benhocci Santana. São Paulo – SP: [s.n.], 2019.  
43 p.: il.; 29,5cm.

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

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia.

1. Disco-difusão. 2. Fitoterápico. 3. Leite. 4. Óleo comercial.  
I. Título.

CDD 636.2089819

**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 2006, 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 ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii* Desf.) FRENTE AO AGENTE DA MASTITE: *Staphylococcus aureus*"**

Autor(es):

Discente: Bruno Benhocci Santana

Assinatura: \_\_\_\_\_

Orientadora: Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: 11/abril/2019

TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNO BENHOCCI SANTANA

“AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii*  
Desf.) FRENTE AO AGENTE DA MASTITE: *Staphylococcus aureus*”

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



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



Prof(a). Dr(a). Káthery Brennecke (Universidade Brasil)



Prof(a). Dr(a). João Victor Marques Zoccal (Centro Universitário de Votuporanga)

Fernandópolis, 11 de abril de 2019.

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

## **DEDICATÓRIA**

“Aos meus pais, irmãos, minha esposa Maria Claudia, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que chegasse até esta etapa de minha vida.”

## AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos por DEUS, já que ele colocou pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta.

A minha orientadora Liandra e a professora Cátia Rezende, pelo apoio, dedicação, paciência. Vocês foram e são referências profissionais e pessoais para meu crescimento. Obrigada por estarem ao meu lado e acreditarem em mim.

Aos meus pais, Sueli e Santo, meu infinito agradecimento, pois sempre acreditaram em minha capacidade, isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser o melhor, mas a fazer o melhor de mim.

Obrigada a minha esposa, Maria Claudia, por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino, pois com o seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado.

Obrigado aos meus amigos, Maria Rosa e João Serezine, que participaram indiretamente deste trabalho, com ajuda deles é que esta dissertação se concretizou.

Vocês merecem meu eterno agradecimento.

Ninguém vence sozinho.

OBRIGADO A TODOS.

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii* Desf.) FRENTE AO AGENTE DA MASTITE: *Staphylococcus aureus***

**RESUMO**

A utilização de plantas medicinais como forma de terapia alternativa aos medicamentos sintéticos é cada vez mais estudada e difundida em vários sistemas produtivos. Na pecuária leiteira, o uso indiscriminado de antibacterianos no tratamento de enfermidades, principalmente da mastite, tem levado ao aumento da resistência de muitos microrganismos patogênicos aos principais fármacos disponíveis no mercado. Somando-se a este fato, o descumprimento do período de carência destes fármacos tem promovido o aumento de resíduo destes no leite produzido e disponibilizado ao consumidor, o que configura problema de saúde pública. Diante disso, objetivou-se, no presente trabalho, avaliar a ação antimicrobiana do óleo de copaíba sobre *Staphylococcus aureus*, isolado do leite de vacas positivas para a presença do microrganismo alvo. A hipótese da pesquisa é que, diluído ou na máxima concentração, o óleo de copaíba pode ser capaz de inibir o desenvolvimento do agente causador da mastite. A atividade antibacteriana foi determinada pelo teste de disco-difusão, utilizando-se o óleo de copaíba nas concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39% e 0,19%. Verificou-se que o óleo de copaíba apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações de 100% a 3,12%, sendo que o aumento da concentração de óleo provocou um aumento no halo de inibição. Conclui-se que o poder de inibição de desenvolvimento bacteriano do óleo de copaíba sobre o *Staphylococcus aureus*, causador da mastite subclínica em vacas leiteiras, existe e é dependente da diluição.

**Palavras-chave:** Disco-difusão, Fitoterápico, Leite, Óleo medicinal, Terapia-alternativa.



**ANTIMICROBIAL ACTION OF COPAÍBA OIL (*Copaifera langsdorffii* Desf.)  
AGAINST THE AGENT OF MASTITE: *Staphylococcus aureus***

**ABSTRACT**

The use of medicinal plants is increasingly studied as a form of alternative therapy to synthetic drugs. In dairy cattle, today, the indiscriminate use of antibacterial in treatment, mainly mastitis is a reality. In addition, was observed residue of these drugs on milk that was available for human consumption, which constitutes a public health problem. The objective of this work was to evaluate the minimum inhibitory concentration of copaiba oil on *Staphylococcus aureus* isolated from the milk of dairy cows positive for these microorganisms. The hypothesis was, diluted or at maximum concentration, copaiba oil may be able to inhibit the development of the agent causing mastitis. The antibacterial activity was determined by disk diffusion test, using copaiba oil at concentrations of 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78%, 0.39% and 0.19%. It was found that the copaiba oil showed antimicrobial activity at concentrations ranging 100% to 3.12%, and the increase in oil concentration increasing the inhibition halo. Conclude that the power bacterial inhibition of copaiba oil on *Staphylococcus aureus*, which causes subclinical mastitis in dairy cows, exists and is dependent on the dilution.

**Keywords:** Disco-diffusion, Herbal medicine, Milk, medicinal oil, Alternative therapy.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Arvore, folha e tronco de uma espécie de copaíba. ....	21
<b>Figura 2.</b> Constituintes ativos de sesquiterpenos presentes em óleos de copaíba. .	22
<b>Figura 3.</b> Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana. ....	23
<b>Figura 4.</b> Resultado do teste do crescimento em ágar manitol positivo na placa de petri à direita, com a formação da cor amarela ao redor das colônias. ....	30
<b>Figura 5.</b> Resultado do teste de coloração de Gram, com a presença de colônias de bactérias Gram positivas visto ao microscópio (100x).....	31
<b>Figura 6.</b> Halos de inibição antimicrobiana (mm) em função das diluições do óleo de copaíba.....	34

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana pelo método de difusão de placas do óleo de copaíba sobre o *Staphylococcus aureus* em função das concentrações avaliadas. .32

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1. Relevância do tema</b> .....	13
<b>1.2. Fundamentação</b> .....	15
1.2.1. Doenças no rebanho da produção Leiteira .....	15
1.2.2. Mastite e a Qualidade do Leite.....	15
1.2.3. Propriedades antimicrobianas dos extratos de plantas.....	18
1.2.4. Óleo de copaíba ( <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.).....	20
<b>1.3. Hipótese</b> .....	25
<b>1.4. Objetivos geral e específicos</b> .....	25
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
2.1. Amostragem e preparo das mostas.....	26
2.2 Identificação e caracterização fenotípica de <i>Staphylococcus</i> .....	26
2.2.1 Teste de sensibilidade antimicrobiana <i>Staphylococcus aureus</i> e óleo de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.....	28
2.3 Análise de Dados.....	28
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
3.1 Análise de identificação de <i>Staphylococcus</i> .....	30
3.2 Análise do Teste de sensibilidade antimicrobiana <i>Staphylococcus aureus</i> ao óleo de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf .....	31
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Relevância do tema

A qualidade do leite possui uma grande importância sob o ponto de vista da Saúde Pública. No Brasil, são comuns casos de doenças relativas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos com leite contaminado com microrganismos patogênicos. Uma das grandes causas é o fato de mais de 44% do leite consumido no país ser originário do mercado informal no qual é comercializado sem condição térmica adequada ou controle laboratorial[1].

No contexto da produção leiteira, a mastite configura-se, dentre outras doenças do rebanho, como de grande importância na produtividade e qualidade sanitária e tecnológica do leite[2].

A mastite é uma das doenças com efeitos significativos na indústria leiteira, por apresentar uma grande redução na produção e alterações na composição do leite. Esta enfermidade pode se manifestar na forma clínica ou subclínica; e ocorre por infecções microbiológicas causadas por microrganismos patogênicos que podem ser encontrados no leite e derivados. Dentre esses microrganismos destaca-se o *Staphylococcus aureus*[3,4,5].

Na alopatia, antimicrobianos são as principais substâncias empregadas para tratar a mastite e, associado ao fato do uso indiscriminado, a resistência dos microrganismos é crescente. Portanto, o emprego isolado ou associado de plantas medicinais no tratamento de doenças pode ser estratégico e, também, para melhorar os resultados clínicos na prática[6,7].

Cada vez mais as plantas medicinais têm se destacado no tratamento da saúde, especialmente para as populações mais carentes e seus rebanhos. O uso de determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem crescido, principalmente, devido aos grandes problemas associados aos antibióticos, como as reações de hipersensibilidade e a resistência microbiana. Assim, a utilização das plantas medicinais, é cada vez mais estudada como forma de terapia alternativa aos medicamentos sintéticos que são utilizados[8,9,10].

Estudos farmacológicos utilizando o óleo de copaíba mostram que o seu

uso vem demonstrando grande atividade anti-inflamatória, cicatrizante, antitumoral e bactericida[11]. A atividade antimicrobiana do óleo de copaíba, na forma de oleorresina e essencial foram verificadas sobre 55 microrganismos isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica. Observou-se que a oleorresina apresentou boa atividade antimicrobiana em amostras com *Staphylococcus* \_coagulase positivo, *Staphylococcus* \_coagulase negativo, *Streptococcus* do grupo C, F, G e *Corynebacterium* \_spp. Os autores concluíram que frente às bactérias isoladas, a oleorresina apresentou melhor atividade antimicrobiana do que o óleo essencial de *Copaifera* \_spp [12]. Sendo assim pode-se ressaltar o potencial que o óleo de copaíba apresenta em atividades antimicrobianas significativas para homens e animais[13].

Neste contexto, objetivou-se neste trabalho determinar o efeito da concentração do óleo de copaíba (*Copaifera* \_langsdorffii Desf.) na inibição do desenvolvimento do *Staphylococcus aureus*, importante agente causador da mastite subclínica em bovinos leiteiros em âmbito nacional, através da técnica de difusão em disco.

## **1.2. Fundamentação**

### **1.2.1. Doenças no rebanho da produção Leiteira**

O Brasil se encontra como um dos países com o maior rebanho bovino do mundo, aproximadamente 218 bilhões de cabeças, onde, esse tipo de criação faz parte das principais atividades do setor de agronegócio. Logo, o monitoramento da saúde animal é fundamental para assegurar os níveis de produtividade nos rebanhos com qualidade [14].

No entanto, a busca por maiores índices produtivos coloca em risco a saúde do rebanho, impactando no sistema imunológico dos animais e propiciando o surgimento de doenças de diversas naturezas: infecciosas, metabólicas, parasitárias, imunológicas, comportamentais, etc., exigindo o emprego de medicação sistemática para recuperar a sanidade do rebanho [14]. Entretanto, os fármacos terapêuticos usados na pecuária para combater doenças afetam na qualidade da carne e leite, e além de causarem a contaminação, prejuízos financeiros e grandes agravos à saúde humana [15].

São várias as doenças que podem afetar o rebanho tais como: a eimeriose ou coccidiose, as helmintoses, a dermatobiose, mastite, dentre outras.

Segundo Leira e colaboradores [16], a mastite é uma doença inflamatória da glândula mamária acometida por bactérias ou microrganismos como os fungos, vírus e até mesmo por lesões físicas e estresse. Essa doença é uma das mais relevantes no gado leiteiro e ocasiona prejuízos financeiros, devido a redução da produção de leite, gasto com remédios, descarte do leite contaminado, bem como o descarte dos animais [17].

### **1.2.2. Mastite e a Qualidade do Leite**

Um dos alimentos mais importante em todo o mundo é o leite, devido ao seu alto valor nutritivo, sendo por isso considerado um ótimo substrato para o crescimento de vários grupos de microrganismos, desejáveis e indesejáveis [18].

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), entende-se por leite como: “O produto oriundo da ordenha completa, e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas” [19].

São vários fatores que influenciam na qualidade do leite cru tais como: higiene da ordenha e dos utensílios, manejo, alimentação, genética dos rebanhos e também infecções como a da glândula mamária, conhecida como mastite, que compõem uma das principais causas que desempenham influência negativa sobre a qualidade e produção do leite [20].

Segundo Rezer [21], o leite apresenta qualidade em relação a suas proteínas e uma grande quantidade de cálcio, fósforo, magnésio, vitamina A, riboflavina e niacina. As alterações microbianas que ocorrem no leite devem-se, principalmente, pela sua composição química variada.

A contaminação e, por conseqüência, as alterações microbiológicas que podem ocorrer no leite, principalmente o destinado a indústria, que se utiliza como matéria prima para diversos produtos, apresenta perigo para o consumidor, uma vez que o leite e os produtos lácteos podem veicular microrganismos associados a surtos de origem alimentar, além de ocasionar prejuízos econômicos [21]. A microbiota que contamina o leite é geralmente composta por bactérias que se multiplicam no leite refrigerado, enquanto que leveduras e fungos são raramente encontrados [22].

De acordo com Martins et al. [23], a mastite é dividida em dois tipos, a clínica e a subclínica. Na mastite clínica os sintomas de inflamação são mais graves, com notáveis alterações na glândula mamária e no leite. Já a mastite subclínica é reconhecida por não apresentar alterações macroscópicas, havendo apenas modificações químicas e microbiológicas no leite (alta taxa de células imunológicas e células do epitélio descamado), dificultando a identificação e tratamento.

Schwarz e Santos [24] ressaltam que um controle eficaz e prevenção de mastites em uma propriedade devem alcançar níveis de ocorrência menores que 1% do rebanho leiteiro na sua forma clínica e menores que 15% para as manifestações subclínicas. Martins et al., em estudo publicado em 2010 [24], investigaram uma propriedade leiteira e verificaram que a presença de mastite clínica encontrada nos animais foi de 5,8% e subclínica 65,0%, ou seja,



conclui-se que a mastite subclínica é predominante em relação à mastite clínica.

A doença é transmitida por microrganismos que são divididos em dois grandes grupos: os patógenos contagiosos e os patógenos ambientais classificando-os conforme sua origem e meio de transmissão. Dentre os microrganismos pertencentes aos grupos patógenos contagiosos estão os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus ssp.* Já os patógenos ambientais são presentes no ar, na água, em fezes e na terra, na qual se encontram os microrganismos do tipo *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Pseudomonas ssp.*, como também, os fungos, principalmente leveduras e algas aclorofiladas, do gênero *Prototheca sp.* [25, 26].

Esses patógenos contagiosos têm a atividade de colonizar o epitélio dos tetos, especialmente se a pele estiver lesionada, o qual conseguem elevar a contagem de células somáticas (CCS) provocando a inflamação mastite subclínica de longa duração [20].

Para identificação da mastite existem testes como a contagem de células somáticas (CCS), exame físico do úbere, aparência do leite, *California Mastitis Test* (CMT), cultura e antibiograma [20].

O leite produzido na ordenha das vacas em lactação da fazenda é armazenado em um tanque, onde é colhida amostra para a verificação da CCS para investigar indícios da doença no rebanho. Normalmente, a contagem gira em torno de 100.000 cels/mL, já com a mastite, os índices são acima de 400.000 cels/mL. No entanto, a legislação brasileira diz que o leite deve apresentar médias geométricas trimestrais de Contagem Padrão em Placas de no máximo 300.000 UFC/mL (trezentas mil unidades formadoras de colônia por mililitro) e de Contagem de Células Somáticas de no máximo 500.000 CS/mL (quinhentas mil células por mililitro) [27].

O limite de 200.000 células somáticas/mL foi o mais indicado para estimar infecções intramamárias, parâmetro que pode ser utilizado para monitorar a dinâmica da mastite nos rebanhos leiteiros [28].

Devido às infecções que podem afetar a qualidade do leite, o uso de antibióticos é comum tanto para fins terapêuticos, quanto para a cura de mastite. No entanto, os antibióticos geram resíduos, colocando assim, em risco

a saúde do consumidor, logo, torna-se um sério problema na área econômica e de saúde pública [29]

Por muito tempo a preocupação com os resíduos gerados pelos antibióticos era presente em meios de pesquisa. Deaguayo, [30], isolaram inúmeras bactérias patogênicas em 231 amostras de leite pasteurizado, investigando a ocorrência de resistência a penicilina, polimixina, cloranfenicol, ampicilina, carbenicilina, eritromicina, gentamicina, canamicina e tobramicina. Constataram que o surgimento de múltipla resistência nestas bactérias, foi de 27,0% em coliformes fecais, 4,0% em *Salmonella* e 3,0% em de *S. aureus*.

Vasil [31], avaliou a sensibilidade de 320 linhagens de *S. aureus* isoladas de alimentos, inclusive leite, no período de 1993 a 1997. Observou que 27,0% das amostras foram resistentes a inúmeros antibióticos, ocorrendo com maior frequência para penicilina (22,5%), seguida de estreptomicina (14,7%), tetraciclina (7,2%) e ampicilina (6,9%).

Nos dias atuais buscam-se alternativas para acabar ou minimizar o risco de resíduos de antibióticos utilizados para tratar doenças no rebanho, umas das alternativas é o uso de substâncias com ação microbianas provenientes de plantas. Segundo Zafalon et al. [32], pode ser economicamente viável quando a qualidade do leite é um componente significativo do produto ou quando casos clínicos ou a transmissão de micro-organismos podem ser prevenidos.

### **1.2.3. Propriedades antimicrobianas dos extratos de plantas**

O uso de plantas e seus extratos com propriedades antimicrobianas começaram a ser frequente em meados do século XX. Isso aconteceu devido a uma necessidade de produzirem-se medicamentos sintéticos a um custo reduzido, e com isso também tinha a facilidade de identificar compostos químicos [33].

Essa facilidade de identificar compostos químicos estava aliada à segurança da saúde humana, pois assim reduzia-se o uso de substâncias e drogas artificiais. O interesse pelo uso de fitoterápicos foi renovado com a descoberta de bactérias a multidrogas e devido ao risco que isso representa a saúde do ser humano [34].

Para os tratamentos de parasitoses e enfermidades infecciosas, incluindo até mesmo tratamentos de mastite bovina, utilizam-se os extratos de plantas ou substâncias ativas [35].

A atividade antimicrobiana das plantas em seus compostos de metabólicos secundários é verificada contra uma variedade de microorganismos, como por exemplo, os Gram-positivos e Gram-negativos. Essa atividade antimicrobiana é bastante vinculada ao número de compostos terpenos e fenólicos indicativos de ação antimicrobiana [36, 37, 38].

Troncarelli [39] fez um estudo em rebanhos nos estados de Minas Gerais e São Paulo, com incidências de mastites clínica e subclínica, e enfatizou a importância do uso de medicamentos à base de fitoterapia e homeopatia para o controle da mastite nos rebanhos.

Ao avaliar o óleo essencial do orégano, a concentração mínima inibitória dos seus dois principais compostos (carvacrol e timol) para combater a atividade microbiana dos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, observou-se que o conjunto destes teve uma atividade antimicrobiana significativa em relação aos compostos isolados, concluindo que a ação antibacteriana aditiva do carvacrol e timol tiveram um efeito inibitório nos microorganismos avaliados [40]. Schneid [41] avaliou que na gentamicina a atuação do carvacrol obteve resultado semelhante ao apresentado por Lambert [40] em relação ao teste de resistência e de sensibilidade.

A atividade antibacteriana dos óleos brutos e das frações destiladas de *Anethum graveolens* L. (endro), *Coriandrum sativum* L. (sementes de coentro), *C. sativum* L. (folhas imaturas), e eucalipto (*Eucalyptus dives*) foi examinada em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (por exemplo, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *P. fragi*, *Serratia grimesii*, *Enterobacter agglomerans*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*) [42]. Com essa avaliação, obtiveram resultados indicando que a amplitude e intensidade da atividade antimicrobiana das frações individuais (destilados) foram maiores que o óleo bruto [43].

Já o *S. Cumini* (jambolão) teve sua atividade antimicrobiana confirmada e sugere-se a alta quantidade de taninos relacionada com a atividade antimicrobiana de extratos vegetais ao mostrar que, ao se eliminar os taninos, a propriedade antimicrobiana foi suprimida [44].

Por outro lado, os óleos essenciais de canela, cravo botão, tomilho branco, citronela e capim limão possuem um forte inibidor ao *Staphylococcus aureus* e *S. Agalactiae* na qual sugere-se que a combinação dos óleos de canela cássia, capim limão e cravo botão potencializam o efeito antimicrobiano [45].

A casca da erva de bugre (*Caseari.*) permite a obtenção de seu extrato, foi observado que na concentração de 50% de extrato, a bactéria salmonela ATCC não cresceu, permanecendo estável [46].

Os vegetais hidroalcoólicos também podem ter uma atividade antibacteriana de seus extratos, como foi feita na avaliação sobre a *Staphylococcus hyicuse* e *Staphylococcus aureus*. Ao se realizar os testes, concluiu-se que todos os vegetais analisados apresentavam potencial a atividade antimicrobiana, destacando-se o extrato de *Ilex paraguariensis* (Erva Mate) cuja elevada atividade antibacteriana bacteriostática e bactericida, podendo assim ser utilizado para inibir essas bactérias, o extrato de *Vernonia puberula* (Cambará-de-bicho) teve efeito bacteriostático [47].

O diâmetro do halo de inibição do óleo essencial de orégano, que possui propriedades antimicrobianas pela presença de carvacol e timol, foi avaliado por silva et al. [48], que confirmou frente à *Salmonella enteritidis*.

#### **1.2.4. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**

O óleo de copaíba é extraído de uma árvore especificamente do tronco, na qual, possui até 36 metros de altura com popa densa, casca lisa e produzindo de 2 a 3 kg de sementes [49]. A Figura 1 mostra uma das espécies de copaíba, tronco e folha.

**Figura 1.** 1- Arvore e folha de uma espécie de copaíba e 2- Tronco da arvore copaíba.

**Fonte:** Adaptado de Porto [49].



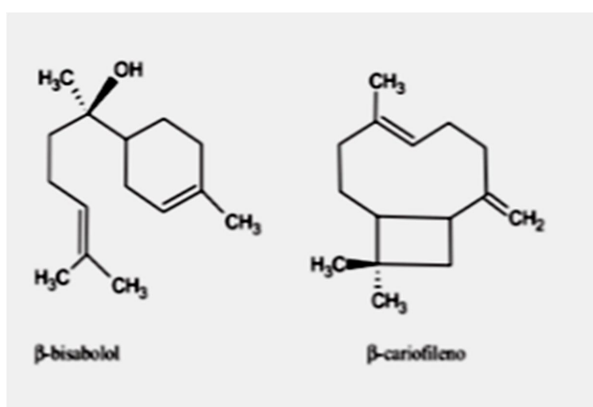
As espécies de copaíba são encontradas nas regiões amazônicas e Centro-Oeste do Brasil, sendo o óleo de copaíba extraído de uma grande variedade de espécies de *Copaifera leguminos* [33], possuindo mais de 25 espécies, sendo grande parte encontrada na América do Sul [50], e 16 delas encontradas somente no Brasil [51]. Floração da arvore de copaíba acontece de janeiro a março e os frutos são coletados de março a agosto, a mudança nas folhas é no período de dezembro, com perda parcial foliar no mês que antecede à floração [50].

Popularmente, o óleo de copaíba é utilizado como antisséptico, cicatrizante, expectorante, diurético, laxativo, estimulante, emoliente e tônico. No entanto, industrialmente, em sua forma in natura, pode ser empregado como combustível para motores diesel, devido que, contém até 15% óleos voláteis do petróleo, o restante são resinas e ácidos [33]. Além disso, o óleo possui ativos que são responsáveis pelas atividades biológicas tais como: sesquiterpenos conforme a Figura 3 (mais de 50% da óleo-resina), diterpenos e ácidos terpênicos. Um importante anti-inflamatório de fonte natural da copaíba é o cariofileno, outro composto importante é ácido caurenóico, um diterpeno

que possui estudos comprovados nas ações anti-inflamatórias, diurética e efeitos *in vivo* e antimicrobianos, relaxante muscular e ações citotóxicas *in vitro* [52] mostra dois constituintes ativos de sesquiterpenos presentes em óleos de copaíba.

**Figura 2.** Constituintes ativos de sesquiterpenos presentes em óleos de copaíba.

**Fonte:** Adaptado de Veiga [51].



Devido às substâncias presentes na copaíba, principalmente, o óleo, que é uma solução de ácidos diterpênicos e, que, essencialmente, constituído por sesquiterpenos, vêm sendo investigado e empregado como alternativas para tratamentos de doenças essencialmente inflamatórias. O óleo é um líquido cuja coloração é amarelada até marrom, apresenta cheiro forte, sabor acre e amargo [49].

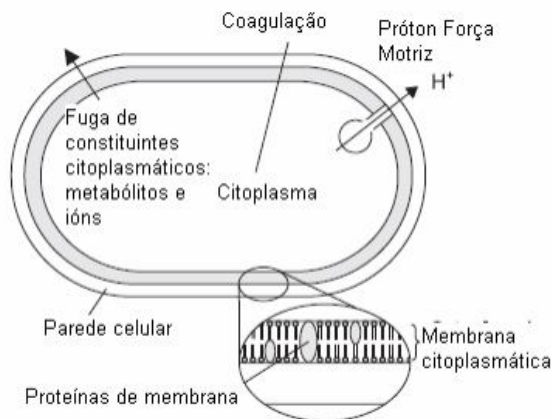
Vários estudos fitoquímicos indicam que os óleos de copaíba são misturas de sesquiterpenos e diterpenos, sendo o ácido copálico e os sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -copaeno, os principais componentes do óleo, sendo o  $\beta$ -cariofileno que apresentanta ação anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiendêmica, e o  $\beta$ -bisaboleno, analgésico e anti-inflamatório [51].

Ao utilizar o óleo de copaíba para efeito antimicrobiano, sabe-se que as substâncias presentes estão relacionadas, principalmente, à alteração da

permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana conforme a Figura 3 [33].

**Figura 3.** Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana.

**Fonte:** Adaptado de Burt [53].



Sendo assim, acredita-se que o efeito antimicrobiano na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas é exercido pela maioria deles. Modificam 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 [33]. Braga e Silva [54] afirmam que, dentre as ações do óleo de copaíba, a maior pesquisa é feita na atividade antimicrobiana.

Logo, Mendonça, Fioravante e Silva [26], ao avaliarem a atividade antimicrobiana do óleo-resina da copaíba, sendo do tipo *Copaifera multijuga*, Hayne (Leguminosae) de acordo com os resultados observados, constataram que esse óleo demonstrou um potencial de inibição do crescimento sobre as três bactérias patogênicas estudadas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*), das quais duas delas são Gram-negativas e uma Gram-positiva. Conforme a diluição do óleo, nas concentrações de 100%

partindo de 1,56% de concentração inibitória mínima (CIM) ocorreu inibição do crescimento dos patógenos estudados, variando assim a atividade antimicrobiana [26].

Um estudo in vitro de Calsamiglia et al. [55], evidenciou que resultados prejudiciais foram encontrados para óleos essenciais acima de 500mg/L. Entretanto, considerando doses moderadas de 50 e 500mg/L de alguns desses óleos essenciais e seus componentes ativos são capazes de alterar de forma favorável a fermentação ruminal, alterando o metabolismo de proteínas, perfil de ácidos graxos e a metanogênese. Em adição, pouco é sabido, em relação aos parâmetros produtivos de ovinos, sobre os efeitos do uso deste óleo [56].

Alguns trabalhos mostram uma alteração no acetato: propionato, esperando-se melhor aproveitamento energético e melhor acabamento de carcaça. Pesquisas feitas utilizando os compostos químicos oriundos de extratos vegetais, seja isolado, seja em sinergia, ou até mesmo o uso de extratos vegetais na nutrição de manejo de ruminantes têm se tornado importante nos últimos anos, mesmo com dados não-conclusivos [33].

Inúmeros estudos foram feitos com o óleo de copaíba e os mesmos têm comprovado sua eficiência na ação anti-inflamatória e cicatrizante. Maior parte dos trabalhos que investiga a ação dos extratos vegetais no metabolismo dos ruminantes refere-se, principalmente, na atuação dos extratos no ambiente ruminal [54]. Considerando essas condições em particular, resultados semelhantes aos que foram usados *ionóforos* para os produtos resultantes dos processos fermentativos e ao balanço populacional de bactérias e protozoários no ambiente ruminal, foram obtidos, não havendo uma diferença significativa [57].

De Lima et al. [58], verificaram a eficiência de ação do óleo da copaíba ao ser utilizado em experimento com isolados de *Staphylococcus aureus*, cuja capacidade de inibição sobre duas amostras resistentes a antibióticos foi comprovada. Alves e Colaboradores [59] avaliaram a ação antimicrobiana do extrato de folhas de *C. langsdorffii* Desf., o extrato teve dois resultados: sendo ativo contra o *S. Aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aureginosa* e inativo contra a *Escherichia coli* [54].



### 1.3. Hipótese

Devido ao aumento da resistência de *S. aureus* a diversos antimicrobianos, principalmente os sintéticos, a busca por alternativas para o tratamento de mastite torna-se fundamental e importante, logo, a hipótese do presente estudo é a de que a utilização do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) é uma opção para a inibição ou controle do *S. aureus*.

### 1.4. Objetivos gerais e específicos

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo determinar o efeito do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) na inibição do desenvolvimento do *Staphylococcus aureus*, agente causador da doença mastite em rebanhos de produção de leite.

Especificadamente, objetivou-se:

- I. Identificar nas amostras obtidas do rebanho leiteiro a presença de *Staphylococcus aureus*;
- II. Analisar o efeito antimicrobiano do óleo de copaíba;
- III. Investigar a melhor concentração do óleo de copaíba para a atividade antimicrobiana em relação ao *Staphylococcus aureus*;

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Amostragem e preparo das mostras

Foram utilizadas 50 vacas leiteiras lactantes de uma propriedade leiteira localizada no município de Cosmorama-SP, para a detecção da mastite subclínica e coleta de amostras de leite.

Na coleta das amostras do leite, os tetos foram higienizados pela imersão em solução antisséptica de álcool iodado (5%), decorridos 30 segundos o excesso de antisséptico foi removido com álcool 70% e seco com papel toalha. Após a higienização seguiu-se o teste da caneca telada e o *California Mastitis Test* (CMT) [60], para a detecção da mastite, e dentre as 50 vacas, 10 foram considerados positivos para mastite subclínica e utilizadas na amostragem.

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 sob refrigeração ao laboratório para realização dos testes microbiológicos.

Na análise de identificação e caracterização do *Staphylococcus*, 25mL da amostra foram homogeneizados em 225 mL de solução salina peptonada 0,1%. A partir desta diluição inicial a  $10^{-1}$ , foram preparadas mais duas diluições decimais ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), utilizando-se o mesmo diluente.

### 2.2. Identificação e caracterização fenotípica de *Staphylococcus*

Na identificação do *Staphylococcus* foi utilizada a metodologia descrita por Lancette e Bennett, 2001 [61], na qual placas de Petri contendo ágar Baird-Parker (BP) suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo receberam as amostras adequadamente homogeneizadas e diluídas. A partir de cada diluição, um volume de 0,1mL foi colocado sobre o ágar e espalhada com auxílio de uma alça em "L". Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias características, que apresentaram cor negra e halo. Destas, até três colônias foram repassadas para tubos com caldo BHI e incubadas por 24 horas a 35°C,

para continuação dos testes bioquímicos e confirmação da espécie *Staphylococcus aureus* (catalase, coagulase, DNase, manitol e coloração de gram).

Para realizar a prova da catalase, por meio de uma alça bacteriológica foram coletadas as colônias suspeitas para *Staphylococcus aureus*, foram dispersas em uma lâmina de vidro, colocando-se sobre o esfregaço uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, observou-se a formação de bolhas, confirmando a positividade para *Staphylococcus aureus* [62].

Após o teste da catalase em lâminas, foram feitas provas da coagulase em tubos. Depositou-se 0,1 mL de caldo BHI, onde havia amostras de colônias suspeitas para *Staphylococcus* em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de plasma humano e incubou-se por 4 horas a 35°C em banho-maria. Após análise, observou-se formação de coágulo, sendo um indicativo para positividade do *Staphylococcus aureus* [63].

O teste de DNase foi usado para detectar a degradação do ácido desoxirribonucléico (DNA), contido no meio de cultura, isto ocorre apenas por bactérias que possuem uma enzima extracelular, a desoxirribonuclease, responsável por esta reação. Ao meio DNase foi adicionado azul de ortotoluidina na concentração de 0,1%; inoculou-se amostras de caldo BHI contendo colônias suspeitas de *Staphylococcus* e incubou-se as placas a 35°C por 24 horas. Após a incubação observou-se a formação de um halo transparente, identificando a presença de *Staphylococcus aureus* [64].

A confirmação do agente causador isolado foi realizada pelo teste de crescimento em ágar salmanitol, visto que o *Staphylococcus aureus* tem a capacidade de fermentar o MSA em meio contendo 7,5% de cloreto de sódio, produzindo assim colônias grandes e rodeadas de uma zona amarela. Estafilococos patogênicos, como *S.aureus*, crescem bem em ambiente rico em sal, virando o MSA para o amarelo mediante liberação de ácido. Após a incubação por 24 horas a 35°C, observou-se a positividade para bactéria do gênero *Staphylococcus aureus*.

Após análise e confirmação da positividade para *Staphylococcus aureus* das amostras em ágar manitol, utilizou-se a técnica de coloração de Gram para diferenciar bactérias gram-positivas e gram-negativas.

### **2.2.1. Teste de sensibilidade antimicrobiana *Staphylococcus aureus* e óleo de *Copaifera langsdorffii* Desf**

Após a confirmação microbiológica para bactérias *Staphylococcus aureus*, retiradas das amostras de leite, utilizou-se a cepa da bactéria em questão e aplicou-se a técnica de disco-difusão [65] em ágar Mueller-Hinton para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo extraído da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.).

O teste disco-difusão foi realizado em Agar Mueller-Hinton, com alíquotas de 10µL do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) puro e de suas diluições consecutivas (1+1) utilizando como diluente dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo as concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39% e 0,19% do óleo (volume/volume). O preparo dos discos de papel absorvente seguiu a técnica descrita pela Farmacopéia Brasileira [66], na qual utilizou-se discos de papeis secos e estéreis, medindo 11mm de diâmetro.

As diferentes concentrações preparadas com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) foram impregnadas nos disco por saturação [66] em ágar Mueller-Hinton fundido com a cepa de *Staphylococcus aureus*. Os discos foram colocados nas placas, manualmente com o auxílio de pinças estéreis e incubadas à 35°C por 24 horas. Para cada diluição foram utilizadas 10 placas e em cada placa dois discos saturados totalizando 20 leituras de halo para cada diluição. Como controle positivo utilizou-se o antibiótico cloranfenicol (CLO), 10µg/disco.

Após o tempo de incubação os diâmetros dos halos foram medidos com um paquímetro, sendo considerados suscetíveis os halos com diâmetro igual ou acima de 10 mm.

### **2.3. Análise de Dados**

Os dados foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado composto por 8 tratamentos (7 concentrações de óleo de copaíba e um tratamento controle com cloranfenicol). Os tratamentos 0,78%, 0,39% e 0,19% foram suprimidos da análise estatística por não promoverem a formação de halo, ou seja, não apresentaram atividade inibitória no crescimento do

*Staphylococcus aureus*. Os dados foram analisados, inicialmente, com relação à distribuição normal dos erros, sendo os dados *outlier* retirados e à homogeneidade de variâncias. Como as variâncias foram heterogêneas os dados foram transformados em  $\sqrt{X}$ , procedendo-se à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias entre os tratamentos comparados pelo teste de Tukey, com  $p < 0,05$ .

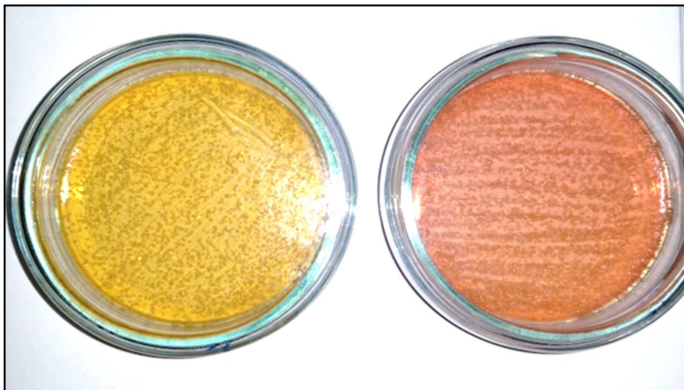
Como houve efeito de tratamento, os resultados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear, entre diâmetro do halo e a concentração de óleo de copaíba, sendo as concentrações de 0,78%, 0,39% e 0,19% do óleo de copaíba excluídas do modelo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análise de identificação de *Staphylococcus*

Na Figura 4 pode-se observar o resultado da presença da bactéria do gênero *Staphylococcus aureus* nas amostras de leite das vacas submetidas ao teste de CMT com correlação positiva com a alta concentração de células somáticas, decorrentes da infecção da glândula mamária (mastite subclínica).

**Figura 4.** Resultado do teste do crescimento em ágar manitol.



A formação de halo amarelo ao redor das colônias indica presença do *S. aureus*, devido à capacidade de fermentar o manitol contendo 7,5% de cloreto de sódio.

**Fonte:** Autor.

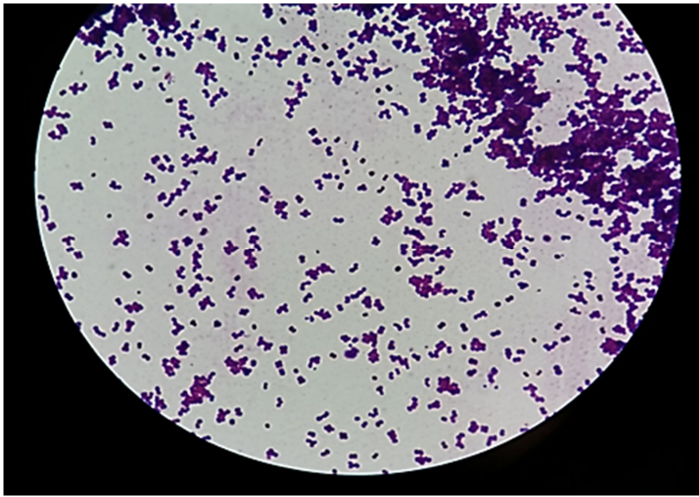
De acordo com a ANVISA, as colônias de *S. aureus* podem ter pigmento amarelo ou amarelo-alaranjado, podendo apresentar hemólise. A coloração amarelada no *S. aureus* aparece mais pronunciada após incubação de 72 h em temperatura ambiente. Logo, é possível verificar por meio da figura 4 que as amostras apresentaram cores amarelo e amarelo-alaranjado confirmando a presença da bactéria.

Sabe-se que o *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva onde possui três tipos de exotoxina que determinam sua patogenicidade: a hemolisina, a enterotoxina e a leucocidina, a técnica utilizada para corar diferentes microrganismos baseou-se na composição química e integridade da sua parede celular, classificando-as assim em Gram-negativos (vermelho) ou

Gram-positivo (roxo). A Figura 5 mostra o resultado do teste de coloração gram, confirmando que o *Staphylococcus aureus* é de fato uma bactéria Gram positiva, devido à coloração roxa apresentada.

**Figura 5.** Resultado do teste de coloração de Gram (coloração roxa/azulada), com a presença de colônias de bactérias Gram positivas dispostos em grupos em forma de “cachos de uvas”, visto ao microscópio (100x).

**Fonte:** Autor.



### 3.2 Análise do Teste de sensibilidade antimicrobiana *Staphylococcus aureus* ao óleo de *Copaifera langsdorffii* Desf

A aplicação do óleo de copaíba nos discos promoveu inibição do crescimento microbiano, uma vez que foi verificada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as médias dos diâmetros dos halos observados para bactéria avaliada (Tabela 1). De acordo com os resultados, quanto maior a concentração do óleo, maior foi o halo de inibição obtido, com diferença significativa entre eles. Deve ser ressaltado que nas diluições de 0,78%, 0,39% e 0,19% do óleo, não houve inibição do crescimento bacteriano (sem formação aparente do halo).

O cloranfenicol, utilizado como controle positivo no teste de disco-difusão é um antibiótico da classe dos anfenicóis, com propriedade bacteriostática, interfere na síntese protéica bacteriana e apresentou maior halo

de inibição do crescimento do *S. aureus*, comparado às demais concentrações avaliadas ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana pelo método de difusão de placas do óleo de copaíba sobre o *Staphylococcus aureus* em função das concentrações avaliadas.

Tratamentos	Diâmetro do halo de inibição (mm) e desvio padrão
Cloranfenicol *	25,99 ( $\pm 0,0243$ ) <sup>A</sup>
100%	14,55 ( $\pm 0,0114$ ) <sup>B</sup>
50%	12,32 ( $\pm 0,0117$ ) <sup>C</sup>
25%	10,36 ( $\pm 0,0150$ ) <sup>D</sup>
12,5%	9,21 ( $\pm 0,0095$ ) <sup>E</sup>
6,25%	8,71 ( $\pm 0,0105$ ) <sup>F</sup>
3,12%	7,01 ( $\pm 0,0111$ ) <sup>G</sup>
1,56%	6,06 ( $\pm 0,0445$ ) <sup>H</sup>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

\*10 ug/disco (antimicrobiano sintético, controle positivo)

Fonte: Autor

Considerando-se a classificação da ação de extratos e o conseqüente tamanho dos halos, proposta por Alves [67], considera-se como inativo aquele que produz um halo menor que 9 mm; 9 a 12 mm indicam extratos ativos, e aqueles halos de 13 a 18 mm, ou maiores, correspondem a extratos muito ativos. Desta forma, o óleo de copaíba pode ser considerado muito ativo frente à inibição do crescimento microbiano na sua forma pura ou 100%.

Resultado de atividade antimicrobiana semelhante a este estudo foi demonstrado, sendo que à concentração de 25% do óleo de copaíba em dimetilsulfoxido (DMSO) foi observado halo com inibição de crescimento bacteriano em meio de cultura Mueller-Hinton em teste de difusão em discos, com média de 10 mm para o mesmo patógeno [68]. De acordo com os autores, foi possível verificar que o halo de inibição foi de 13 mm com o uso do óleo puro (100%), diminuindo para 11, 10, 9, 7 e 7 mm, nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12%, respectivamente [68].



Foram observados resultados negativos, quando o óleo de copaíba foi pesquisado quanto a sua ação antimicrobiana frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. No estudo, utilizou-se metodologia diferente da utilizada neste trabalho, em ágar com orifício e observaram o crescimento dos microrganismos avaliados [69].

Em outro trabalho de pesquisa, foi demonstrado que o óleo-resina obtido de *Copaifera langsdorffii* apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas [70].

De acordo com estudos antimicrobianos *in vitro* que utilizaram o óleo de copaíba no combate às bactérias [71], mostraram atividades antimicrobianas com o óleo de copaíba sobre os microrganismos orais *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. pyogenes* e *E. fecalis*. Os halos de inibição foram maiores que os obtidos com o controle positivo a clorexidina, confirmando a ação inibitória microbiana.

Segundo autores [72, 53, 73, 74], a atividade antimicrobiana pode ser devido ao efeito do óleo sobre a membrana citoplasmática, especialmente, às proteínas da membrana; alteração no transporte ativo em nível de membrana, interrompendo a força motriz de prótons e do fluxo de elétrons, e, também, pela coagulação dos conteúdos celulares. Pesquisa [75] sobre a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba brasileiro obtido de diferentes espécies do gênero *Copaifera* (*Copaifera martii*, *Copaifera officinalis* e *Copaifera reticulata*) identificou, sob a análise de microscopia eletrônica, que o microrganismo *S. Aureus* tratado com o óleo de copaíba apresentou danos e rompimento da membrana da célula, resultando em alterações morfológicas, liberação de componentes citoplasmáticos e redução no volume celular.

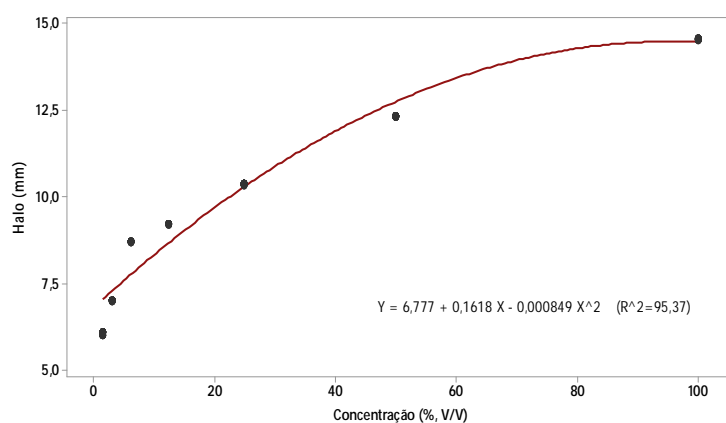
A atividade antimicrobiana do óleo de copaíba de acordo com Leandro et al. [76] não pode ser atribuída a um único componente, pois as características farmacológicas podem ser atribuídas aos diferentes compostos, que de forma sinérgica atuam na atividade antimicrobiana. O  $\beta$ -cariofileno, que é um dos principais constituintes bioativos encontrados no óleo-resina de copaíba é um sesquiterpeno cuja composição perfaz 99,47% dos componentes do óleo e apresenta propriedades medicinais (anti-inflamatórias e antifúngicas) [77].

No presente estudo foi possível observar, também, pela análise de regressão com modelo quadrático, relação entre os níveis crescentes do óleo

de Copaíba e o tamanho do halo representativo da inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* ( $Y = 6,777 + 0,1618x - 0,000849x^2$ ), cujo modelo explica 95,37%. Neste caso, quanto maior a concentração do óleo aplicado, maior foi o halo de inibição formado para a inibição do crescimento, até atingir o ponto de inflexão, que foi para 100% do óleo para *S. aureus*. Portanto, é possível estimar a concentração mais eficiente contra a bactéria avaliada (Figura 6).

**Figura 6.** Relação quadrática entre os halos de inibição antimicrobiana (mm) e as diluições do óleo de copaíba.  $R^2$  = coeficiente de determinação

Fonte: Autor.



Considerando-se a condição descrita por Alves et al. [67], no presente estudo, as concentrações de 25 e 12,5% do óleo de copaíba representam halos com diâmetro entre 9 a 12 mm indicando extratos ativos, e as concentrações de 100 e 50%, halos entre 13 a 18 mm, que correspondem a extratos muito ativos.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, existe a possibilidade de tratamento de infecções subclínicas por *S. aureus* com o óleo de Copaíba e está deve ser avaliada, inclusive *in vivo*, como uma alternativa aos antimicrobianos sintéticos para o tratamento da mastite, garantindo assim, que não ocorram complicações infecciosas em virtude do crescimento ou proliferação microbiana, e o agravamento do quadro da doença, gerando a diminuição na produção leiteira dos animais.

#### 4. CONCLUSÃO

Verificou-se a presença de *Staphylococcus aureus* nas amostras de leite de vacas confirmadas com mastite subclínica e a partir disso, constata-se que o óleo de Copaíba apresenta efeito inibidor de crescimento desta bactéria quando testado. O óleo de copaíba nas concentrações de 12,5 e 25% é ativo para inibir a atividade microbiana e as concentrações 50 e 100% são muito ativas.

Constatou-se, através desse estudo, que o halo de inibição antimicrobiana diminui com o aumento da diluição do extrato, podendo ser considerado como alternativa terapêutica potencial para o controle da mastite bovina, necessitando ainda de ensaios biológicos *in vivo*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANUÁRIO Milkbizz. Anuário Milkbizz 1999/2000. São Paulo: **Milkbizz**, 1999. 326p. Portugues.
2. PITKALA, A.; M. HAVERI.; S. PYORALA.; V. MYLLYS.; AND T. HONKANENBUZALSKI. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001 - Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, 2004; 87:2433-41. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030204733664>. Inglês.
3. LANGE M. J.; ZAMBOM M. A.; POZZA M. S. S.; Tipologia de manejo de ordenha: análise de fatores de risco para a mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2017; 37(11):1205-1212. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v37n11/1678-5150-pvb-37-11-01205.pdf> Portugues.
4. ZECCONI A.; HAHN G.; *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. Bulletin of International Dairy Federation, 2000; 345:15-18. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BE2001000308> Inglês.
5. FONSECA L. F. L.; SANTOS M. V.; Qualidade do leite e controle da mastite. 1ª ed. São Paulo: Lemos, 2000. 314p. Português
6. DANTAS S. A. F.; SENA L. V. T.; MELO D. J. A. et al. Avaliação de plantas medicinais no combate a mastite bovina. *Holos*, 2010; 4: 96-101. Disponível em: <http://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/350>. Português.
7. BEZERRA D. A. C.; PEREIRA A. V.; LÔBO K. M. S. et al. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2009; 19(4): 814-817. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v19n4/02.pdf>. Português
8. HÄNSEL R.; TYLER V. E.; SCHULZ V. **Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. Barueri, SP: Manole, 2002. 386 p. Português.
9. LIMA E. O.; Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: Yues R, Calixto JB (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 481-501. Português.
10. HEYMAN H. M.; HUSSEN A. A.; MEYER J. J. M.; LALL N. Antibacterial activity of southAfrican medicinal plants methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutical Biology*, **Pretoria**, 2009; 47(1):67-71. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13880200802434096>. Inglês

Código de campo alterado

11. MACIEL M. A. M.; PINTO A. C.; VEIGA JUNIOR V. F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 2002; 25(3):429-438. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>. Português.
12. SOARES J. G.; VAREÃO M. J. C.; WOLTER FILHO W.; MOURÃO A. P.; CRAVEIRO A. A. R.; ALENCAR J. C.; Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e láticas da Amazônia I. **Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera***. Acta Amazonica, 2003; 9:65-59. Português
13. PACKER J. F.; LUZ M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2007; 17:102-107. Acesso 2017 Ago [01]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100019>. Português
14. FLORIÃO, MÔNICA MATEUS. Boas práticas em bovinocultura leiteira com ênfase em sanidade preventiva/Mônica Mateus Florião. -- Niterói: **Programa Rio Rural**, 2013. [ISSN 1983-5671].
15. SUAREZ, V. H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. **Veterinary Research**, v. 33, n. 5, p. 563-73, 2002.
16. 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].
17. TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R.; & PICCININ, A. 2008. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas, revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 6, 1-7.
18. SOUZA, G. N. et al. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1015-1020, 2009.
19. BRASIL, 1952. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** (RIISPOA). Aprovado pelo decreto nº 30.691, de 20 de março de 1952. Brasília, 1952 p. 113
20. COSTA, H. N.; MOLINA, L. R.; LAGE, C. F. A.; MALACCO, V. M. R.; FACURY FILHO, E. J. & CARVALHO, A. Ú. 2017. Estimativa das perdas de produção leiteira em vacas mestiças Holandês x Zebu com mastite subclínica baseada em duas metodologias de análise. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 69, 579-586.
21. REZER, A. P. S. **Avaliação da Qualidade Microbiológica e Físico-Química do leite UHT integral comercializado no Rio Grande do Sul**. 2010, 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

22. MENEZES, MARIA FERNANDA CÁCERES. et al. Microbiota and coservation of milk. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET**. e-ISSN 2236 1170 - v. 18. Ed. Especial Maio. 2014, p. 76-89.
23. MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. & ALMEIDA FILHO, E. S. 2010. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá-MT. **Ciência Animal Brasileira**, 11, 181-187.
24. SCHVARZ, D. W. & SANTOS, J. M. G. 2012. Mastite bovina em rebanhos leiteiros: Ocorrência e métodos de controle e prevenção. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, 5, 453-473.
25. COSTA, E.; Melville, P.; Ribeiro, A. & Watanabe, E. 1999. Infecções intramamárias em novilhas primíparas no período pré ao pós-parto e sua importância no controle de mastite. **Revista Napgama**, 2, 16-20.
26. MENDONÇA, C. L.; FIORAVANT, M. C. S. & SILVA, J. A. B. A. 1999. **Etiologia da mastite bovina**. Veterinária Notícias, 5, 107-118.
27. PAIVA, Claudio Antônio Versiani. **Novas Instruções Normativas para melhoria da qualidade do leite no Brasil**. Disponível em: <<http://www.repileite.com.br/profiles/blogs/novas-instru-es-normativas-para-melhoria-da-qualidade-do-leite-no>>. Acesso em: 02 de março de 2019.
28. SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade de Leite**. Pirassununga: Ed. Manole, 2007. 314 p.
29. ROSA, J. F. et al. CRITICAL POINTS IN MILK PRODUCTION CONTAMINATIO. **Expressa Extensão**. ISSN 2358-8195, v.22, n.1, p. 90-103, JAN-JUN, 2017.
30. DEAGUAYO, M. E. D.; DUARTE, A. B. L.; CANASTILLO, F. M. D. Incidence of Multiple Antibiotic Resistant Organisms Isolated from Retail Milk Products in Hermosillo, Mexico. **Journal Food Protection, Ames**, v.55, n.5, p.370-373, 1992.
31. VASIL, M. Resistance to antibiotics in Staphylococcus aureus isolated from dairy cow mastits, milk, udder smears and milking installation **Veterinary Medicine**, Czech, v.44, n.4, p.115-120, 1999.
32. 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 Arq. Bras. **Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.3, p.577-585, 2007.
33. SILVA, Nathália Cristina Cirone. **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.

34. WINDISCH, W.; KROISMAYR, A. The Effect of Phytobiotics on Performance and Gut Function in Monogastrics.: **Biomim World Nutrition Forum, University of Natural Resources and Applied Life Sciences** Vienna, 2006.

35. DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multi Ciências**, v.7, 2006.

36. PANIZZI, L.; FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. Composition and antimicrobial properties of essential oils of 4 mediterranean Lamiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 167-170, 1993.

37. 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.

38. 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.

39. TRONCARELLI, M. Z.; LANGONI, H.; BRANDÃO, H. DE M.; DIMIĆ, I.; STANKOVIĆ, S.; RIBEIRO, A. R. Estudos de estabilidade e eficácia antimicrobiana in vitro de uma formulação de nanoprópolis desenvolvida para tratamento intramamário de mastite bovina. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, 2014 Setembro; 8 (5 Supl 1): 525-546.

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

41. SCHNEID I.; RICHTER V.; FREITAS P. F.; VOLOSKI F. L.; CHIM J. F.; MACHADO M. R. G., GANDRA E. A. Potencial Antimicrobiano de Extratos Vegetais de Alecrim (*Rosmarinus Officinalis*, Linn.), Erva Doce (*Foeniculum Vulgare*, Mill.), Estragão (*Artemisia Dracunculoides*, Linn.), e Orégano (*Origanum Vulgare*, Linn.). 4º **Simpósio de Segurança Alimentar**. 2012.

42. PRIMAK, LENISE MAYRA DA SILVA ET AL.; Evaluation Of Antimicrobial Activity Of Different root parsley extracts. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v.12, n.1, p.94-100, jan./abr. 2013. ISSN 1677-5090.

43. DELAQUIS P. J., STANICH K., GIRARD B., MAZZA G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **Int. J. Food Microbiol.** 2002.

44. MICHELIN D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO G. G. F.; PAGANELLI M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais **Revista Brasileira de Farmacognosia** Brazilian Journal of Pharmacognosy 15(4): 316-320, Out./Dez. 2005.

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman, Não Negrito, Português (Brasil)

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman, Não Negrito, Português (Brasil)

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman, Não Negrito, Português (Brasil)

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman, Não Negrito, Português (Brasil)

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman, Não Negrito, Português (Brasil)

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman, Não Negrito, Português (Brasil)

45. 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.
46. LANER, R. F.; et al. Efeito do Extrato de Erva de Bugre sobre o Crescimento da Bactéria Salmonela ATCC. **IV Encontro e Iniciação Científica e Pós Graduação** Embrapa Clima Temperado, 2012.
47. SERVELIN, E. C; et al. Atividade Antibacteriana De Extratos Vegetais Hidroalcoólicos Sobre *Staphylococcus Hyicuse* *Staphylococcus Aureus*. **8º Jornada De Iniciação Científica-** Embrapa Suínos e Aves 2014.
48. SILVA, J. P. L.; ALMEIDA, J. M. D.; PEREZ, D. V., FRANCO, B. D. G. DE M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 30 (Supl.1): 136-141, maio 2010.
49. PORTO, Alice Sperandio. **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.
50. YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; 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.
51. VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO A.C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants; safe cure? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p.519-528, 2005.
52. PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; SOUSA, E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; Protective effect os *Copaifera langsdorffii* óleo-resina *gainst acetic acid induced colitis* in rats. **Journal Ethno pharmacolgy**, v.93, 2004.
53. Burt, S. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods**—a review. Published on Aug 1, 2004 in International Journal of Food Microbiology; 94(3): 223-253. [Acesso 2018 Jan 19]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>. Inglês.
54. BRAGA, Monica Durões. SILVA, Carla Cilene Maros. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Copaifera langsdorffii* Desf. sobre *Staphylococcus aureus*. **Unimontes Científica**, Montes Claros, v.9, n.1 – jan./jun. 2007.
55. CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited Review: Essential Oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 90, n. 6, p. 2580–2595, 2007.
56. MOURA, lais valenzuela. Oléo de copaíba (*Copaifera sp.*) **NA ALIMENTAÇÃO DE CORDEIROS CONFINADOS, EM SUBSTITUIÇÃO A**



**MONENSINA.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia) –Universidade Federal da Grande Dourados, 2015.

57. BRITO, N. M. B.; SIMÕES, M. J.; GOMES, P. O.; PESSOA, A. F.; MELO, M. C. E. Revista Paranaense de Medicina, v.13, n.12, 1999. IN: VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.2, p. 273-286, 2002.

58. DE LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J. P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Antibacterial Activity Of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, Issues: 1-2, p. 137-147, 2006.

59. ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; JÚNIOR, A. S.; ZANI, C. L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz** , Rio de Janeiro, v.95, n.3, p. 367-373, 2000.

60. SCHALM O. W.; NOORLANDER, D. D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *Journal of American Veterinary Medicine Associate*, 1957; 130: 199-204. Inglês.

61. LANCETTE G. A.; BENNETT R. W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal Enterotoxins*. In: Downes F. P; Ito, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington:Apha, 2001. p. 387-403. Inglês.

62. ANVISA, Agência nacional de vigilância sanitária. **Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod\\_5\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf). Português.

63. ANVISA, Agência nacional de vigilância sanitária. **Serviços de saúde**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo4/id\\_sta2005.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/id_sta2005.htm). Português.

64. BAIRD-PARKER, A. C. Animal proved diagnosticand Selective Medium forisolating coagulase-positive staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, 1962; 25: 12-19.

65. OSTROSKY E. A.; MIZUMOTO M. K.; LIMA M. E. L. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2008; 18 (2): 301-307.[Acesso 2017 Ago01]. Disponível em :<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>. Português.

66. **Farmacopeia Brasileira**. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

67. ALVES T. M. A. et al. Biological screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2000; 95(3): 367-73.[Acesso 2017 Ago01]. Disponível em :<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762000000300012>. Inglês.

68. MENDONÇA D. E.; ONOFRE S. B. Atividade antimicrobiana do óleo resina produzido pela copaíba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2009; 19:577-81.[Acesso 2017 Set11].Disponível em :<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400012>.Português.

69. PACKER J. F.; LUZ M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem animal. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2007; 17: 102-107. [Acesso 2017 Set11]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100019>. Português.

70. MASSON D. S.; SALVADOR S. L.; POLIZELLO A. C. M.; et al. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera langsdorffii*) oleo resin on bacteria of clinical significance in cutaneous wounds. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2013; 15(4):664-669. [Acesso 2017 Set10]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000500006>. Inglês.

71. GILBERT B.; ALVES L.; FERREIRA J. L. A base científica da fitoterapia. *Revista Ciência & Ambiente*, 2002; 25:129-135. [Acesso 2017 Ago 19]. Disponível em: <http://livrariaufsm.com.br/revista-ciencia-ambiente-25-saude-e-meio-ambiente.html>. Português

72. ARFAB, COMBES S, PREZIOSI-BELLOY L, GONTARD N, CHALIER P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**. 2006; 43(2): 149-154. [Acesso 2017 Ago20]. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x>. Inglês.

73. ULTEEA, BENNIK M. H. J.; MOEZELAAR R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002; 68(4): 1561–1568. [Acesso 2018 Jan 19]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC123826>. Inglês.

74. XU J, ZHOU F, JI B. P.; PEI R. S.; XU N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thy mol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, 2008; 47(3): 174-179. [Acesso 2018 Jan20]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19552781>. Inglês.

75. SANTOS A. O.; UEDA-NAKAMURA T.; DIAS FILHO B. P.; VEIGA JUNIOR V. F.; PINTO A. C.; NAKAMURA C. V. Antimicrobial activity of brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2008; 103:277-281.[Acesso 2018 Jan 19].Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008005000015>. Português.

76. LEANDRO L. M.; VARGAS F. S.; BARBOSA P. C. S.; NEVES J. K. O.; SILVA J. Á.; VEIGA JUNIOR V. F. Chemistry and biological activities of

Código de campo alterado

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman

Formatado: Fonte: (Padrão) Times New Roman

Código de campo alterado

Código de campo alterado

Terpenoids from Copaiba (Copaifera spp.) **Oleo rensis**. **Molecules**, 2012; 17:3866-3889. [Acesso 2018 Jan 19]. Disponível em :<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22466849>. Inglês.

77. GALÚCIOA C. S.; BENITESA C. I.; RODRIGUES R. A. F.; MACIELA M. R. W. Recuperação de sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba a partir da destilação molecular. **Química Nova**, 2016; 39(7), 795-800. [Acesso 2018 Jan 19]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160096>. Português.