

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

RENATA MICKETEN

**ESTUDO SOBRE A AÇÃO ANTIBACTERIANA DO ÓLEO DE MELALEUCA NO
CONTROLE DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DA MASTITE BOVINA**

PONTA GROSSA

2024

RENATA MICKETEN

**ESTUDO SOBRE A AÇÃO ANTIBACTERIANA DO ÓLEO DE MELALEUCA NO
CONTROLE DE MICROORGANISMOS CAUSADORES DA MASTITE BOVINA**

**STUDY ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF TREA OIL IN THE CONTROL OF
MICROORGANISMS CAUSING BOVINE MASTITIS**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do
Programa PPGBIOTEC da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).
Orientador(a): Dr. Juliana Vitória Messias Bittencourt

PONTA GROSSA

2024



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa**



RENATA MICKETEN

**ESTUDO SOBRE A AÇÃO ANTIBACTERIANA DO ÓLEO DE MELALEUCA NO CONTROLE DE MICRORGANISMOS
CAUSADORES DA MASTITE BOVINA**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Biotecnologia.

Data de aprovação: 24 de Junho de 2024

Dra. Juliana Vitoria Messias Bittencourt, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Adriana De Souza Martins, Doutorado - Universidade Estadual de Ponta Grossa (Uepg)

Dra. Aline Coqueiro, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 24/06/2024

Dedico este trabalho à minha família, que acreditou em mim, me apoiou e foram o meu suporte para que eu conseguisse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela força e pelo dom da sabedoria.

Agradeço a minha querida orientadora Juliana Vitória Messias Bittencourt, pela oportunidade de realizar esse projeto, por todo suporte não somente como orientadora mas também como uma amiga.

Agradeço à professora Dr. Maria Carolina de Oliveira Ribeiro que contribuiu com valiosos conhecimentos, sugestões e apoio ao longo do desenvolvimento do projeto.

Aos amigos que ganhei no laboratório de bioengenharia, por me ajudarem em várias etapas da pesquisa.

Ao meu esposo Tiago por estar ao meu lado e me apoiar em cada etapa desse processo, por acreditar em mim.

Aos meus pais por sempre me incentivarem a buscar sempre o melhor e por serem sempre o meu apoio, sem vocês isso não seria possível.

Ao meu filho Lucas que é a minha maior motivação, a fonte de ânimo e alegria durante todo esse processo.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro (financiamento 001) concedido durante o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A mastite bovina é uma inflamação nas glândulas mamárias e é uma das doenças mais comuns e prejudiciais que afetam a produção de leite em bovinos. Bactérias patogênicas são frequentemente responsáveis pelo desenvolvimento dessa doença. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo investigar a atividade antibacteriana do óleo de melaleuca contra as principais bactérias causadoras da mastite bovina. Para avaliar a eficácia do óleo de melaleuca como um potencial agente antibacteriano, foram realizados o Teste de Disco-difusão, Teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). No teste de disco-difusão, foram utilizados discos de papel embebidos com óleo de melaleuca sendo colocados sobre uma placa de Petri contendo ágar Muller Hinton inoculado com as culturas bacterianas de interesse. Após o período de incubação, foi possível observar a formação de zonas de inibição de crescimento bacteriano ao redor dos discos. O diâmetro dessas zonas foi medido e utilizado como indicativo da atividade antibacteriana do óleo de melaleuca. Os testes de concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foram realizados para determinar a menor concentração do óleo de melaleuca capaz de inibir o crescimento bacteriano e concentração capaz de matar as bactérias. Para esse teste, foram preparadas diluições que variaram nas concentrações de 4 a 0,03% do óleo de melaleuca em caldo Muller Hinton, em cada diluição foram inoculadas linhagens de referência ATCC e bactérias isoladas de leite proveniente de vacas com mastite. Após o período de incubação, verificou-se a menor concentração do óleo de melaleuca em que não houve crescimento bacteriano visível. No teste qualitativo do disco difusão foi possível observar a formação dos halos de inibição, confirmando a susceptibilidade bacteriana do óleo de melaleuca. Nos testes da CIM e CBM as concentrações capazes de inibir o desenvolvimento bacteriano variaram de 2 a 0,1% e a CBM variou de 2 a 0,5%. Os resultados obtidos forneceram informações importantes sobre a atividade antibacteriana do óleo de melaleuca frente às bactérias causadoras da mastite bovina. Contribuindo para o desenvolvimento de terapias alternativas para prevenção e tratamento da mastite bovina, reduzindo a dependência de antibióticos convencionais.

Palavras-chave: atividade antibacteriana; mastite bovina; óleos essenciais.

ABSTRACT

Bovine mastitis is an inflammation of the mammary glands and is one of the most common and harmful diseases that affect milk production in cattle. Pathogenic bacteria are often responsible for the development of this disease. In this context, the present study aims to investigate the antibacterial activity of tea tree oil against the main bacteria that cause bovine mastitis. To evaluate the effectiveness of tea tree oil as a potential antibacterial agent, the Disk Diffusion Test, Minimum Inhibitory Concentration Test (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were performed. In the disk diffusion test, paper disks soaked with tea tree oil were used and placed on a Petri dish containing Muller Hinton agar inoculated with the bacterial cultures of interest. After the incubation period, it was possible to observe the formation of zones of bacterial growth inhibition around the discs. The diameter of these zones was measured and used as an indication of the antibacterial activity of tea tree oil. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests were carried out to determine the lowest concentration of tea tree oil capable of inhibiting bacterial growth and concentration capable of killing bacteria. For this test, dilutions ranging in concentrations from 4 to 0.03% of tea tree oil in Muller Hinton broth were prepared. ATCC reference strains and bacteria isolated from milk from cows with mastitis were inoculated in each dilution. After the incubation period, there was the lowest concentration of tea tree oil in which there was no visible bacterial growth. In the qualitative disk diffusion test, it was possible to observe the formation of inhibition halos, confirming the bacterial susceptibility of tea tree oil. In the MIC and MBC tests, concentrations capable of inhibiting bacterial development ranged from 2 to 0.1% and the CBM ranged from 2 to 0.5%. The results obtained provided important information about the antibacterial activity of tea tree oil against bacteria that cause bovine mastitis. Contributing to the development of alternative therapies for the prevention and treatment of bovine mastitis, reducing dependence on conventional antibiotics.

Keywords: antibacterial activity; bovine mastitis; essential oils.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 - Volume de leite produzido no Brasil (Unidade L x 1000), de 2004 a 2021.....	17
Gráfico 2 - Valor da produção de leite no Brasil, de 2004 a 2021 (Unidade R\$ x 1000)	17
Figura 1 - Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários	25
Figura 2 - Locais e mecanismos de ação de óleos essenciais na célula bacteriana.....	27
Quadro 1 - Antibiograma das bactérias com perfil de resistência a antimicrobianos.....	29
Fotografia 1 - Características das colônias no meio de cultura Baird Parker	37
Quadro 2 - Características das colônias e provas bioquímicas dos isolados em Baird Parker.....	37
Fotografia 2 - Características das colônias no meio de cultura MacConkey.....	38
Fotografia 3 - Características das colônias no meio de cultura EMB	38
Fotografia 5 - Interpretação de resultados da pesquisa da concentração mínima inibitória.....	41
Gráfico 3 - Comparação dos resultados da CIM pelo método de leitura visual com resazurina x resultados absorbância	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de leite dos principais Estados no ano de 2021	18
Tabela 2 - Concentrações obtidas através da diluição seriada	34
Tabela 4 - Médias dos diâmetros (cm^2) dos halos de inibição no teste de disco-difusão	39
Tabela 5 - Média do diâmetro (cm^2) dos halos de Inibição dos isolados de leite proveniente de vacas com mastite.....	40
Tabela 6 - Média do diâmetro dos halos de inibição dos desinfetantes usados pré e pós <i>dipping</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>The American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCS	Contagem de Células Somáticas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMPR	Coleção Microbiológica da Rede Paranaense
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMB	<i>Eosin Methylene Blue</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
mL	Mililitro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina
NCCL	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OE	Óleos Essenciais
TTO	<i>Tea Tree Oil</i>
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	JUSTIFICATIVA	15
3	OBJETIVOS	16
3.1	Objetivo geral	16
3.2	Objetivos específicos	16
4	REFERENCIAL TEÓRICO	17
4.1	Cadeia produtiva leiteira nacional	17
4.2	Impactos econômicos associados à mastite bovina	19
4.3	Definição e caracterização da mastite bovina	21
4.4	Tratamento e medidas de controle da mastite	22
4.5	Terapia alternativa	24
4.5.1	Óleos essenciais	25
4.5.2	Óleo essencial de melaleuca (<i>tea tree</i>)	28
5	MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1	Linhagens	29
5.2	Óleo essencial de melaleuca	30
5.3	Desinfetante comercial usado no pré e pós dipping	30
5.4	Coleta da amostragem de leite	30
5.5	Cultivo bacteriológico	30
5.6	Métodos de avaliação da atividade antibacteriana do óleo de melaleuca	32
5.6.1	Teste disco-difusão	32
5.6.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) concentração bactericida mínima (CBM)	33
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1	Isolamento de bactérias	36
6.2	Teste disco - difusão do óleo essencial de melaleuca	39
6.3	Teste disco - difusão em desinfetantes comerciais usados no pré e pós dipping	40

6.4	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	41
7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A mastite é uma das enfermidades que mais causa perdas econômicas no setor de produção leiteiro do mundo. Trata-se de uma inflamação nas glândulas mamárias das vacas causada principalmente pela presença de bactérias. Os impactos dessa enfermidade são a queda na produtividade, diminuição da qualidade do leite, gastos com medicamentos e serviços veterinários além do descarte do leite.

Por se tratar de uma enfermidade altamente prejudicial aos rebanhos leiteiros, muitos estudos são conduzidos. Neste sentido, programas de manejo visam melhorar a saúde da glândula mamária (ZAFALON *et al.*, 2007). A mastite apresenta-se de forma clínica e subclínica. O diagnóstico da forma clínica é de fácil identificação já que os sinais inflamatórios são detectados visualmente. Já a forma subclínica não apresenta sinais inflamatórios visíveis ou modificações sensoriais no leite, sendo identificada por meio do aumento das células somáticas e na alteração da composição do leite.

De maneira geral, o tratamento da mastite bovina é feito por meio de uso de antibióticos. Contudo, o uso indiscriminado e errôneo dessas drogas tem contribuído para o desenvolvimento da resistência de patógenos, dificultando o sucesso do tratamento (KUROSAWA *et al.*, 2020). A preocupação vai além do quesito econômico nas propriedades mas também ela torna-se uma questão de saúde pública visto que esses antimicrobianos utilizados para o tratamento da mastite em sua maioria são das mesmas classes utilizadas na medicina humana.

Diante desse cenário, o uso de tratamentos alternativos para o controle de bactérias causadoras da mastite torna-se importante devido ao seu impacto econômico e sanitário nos rebanhos leiteiros. Entre os tratamentos alternativos, pode-se destacar o uso dos óleos essenciais. Os óleos essenciais (OE) são substâncias oleosas podendo ser extraído de várias partes do vegetal, possuem compostos aromáticos voláteis que são sintetizados pelas plantas durante o metabolismo secundário (BURT, 2004).

Devido às suas propriedades biológicas, os óleos essenciais têm potencial no mercado global (TARIQ *et al.*, 2019). Logo, várias pesquisas foram realizadas no intuito de comprovar de forma *in vitro* o efeito antibacteriano dos óleos essenciais, Hall *et al.* (2020) observaram que os OE de *Citrus aurantium* e *Melaleuca alternifolia*

apresentaram atividade frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, bactérias essas que são as principais causadores de mastite bovina. Uma revisão realizada por Lopes *et al.* (2020), mostrou que entre os anos de 2001 a 2015, vários OE foram avaliados contra microrganismos isolados da mastite bovina, e muitos deles apresentaram propriedades antimicrobianas.

Trabalhos da literatura mostram que o TTO (*tea tree oil*) que é OE extraído da *Melaleuca alternifolia* possui efeito bactericida *in natura* e bacteriostático em baixas concentrações (HALL *et al.*, 2020). Carson *et al.* (2006) ressalta que dados contemporâneos evidenciaram claramente que a atividade de amplo espectro do TTO inclui atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antiprotzoárias. Tendo em vista tais funções do TTO, seu uso torna-se uma alternativa de novas estratégias a fim de prevenir e controlar a ocorrência da mastite. Além disso, visa reduzir o desenvolvimento de multirresistência na cadeia produtiva leiteira e também a possibilidade de uso para produtores que trabalham com produção orgânica.

Ao pesquisarem os efeitos antibacterianos do TTO em isolados multirresistentes GIOPPO; ZANCANARO; BELLAVER (2019) observaram que todos os isolados pesquisados mostraram-se suscetíveis a alguma das concentrações testadas variando de acordo com a metodologia empregada. A linhagem de *E.coli* isolada de um caso hospitalar mostrou-se a mais sensível.

2 JUSTIFICATIVA

A mastite bovina tem sido apontada como a principal enfermidade que acomete o rebanho leiteiro, causando sérios prejuízos econômicos tanto para o produtor quanto para a indústria. Além dos prejuízos econômicos, a necessidade do descarte do leite durante o tratamento torna-se um problema ambiental.

O uso indiscriminado de antibióticos compromete a qualidade do leite e proporciona o surgimento de cepas resistentes aos tratamentos. O problema da resistência bacteriana afeta o prognóstico dos animais acometidos e aumenta os custos nas fazendas leiteiras. Além disso, representa uma questão de saúde pública, uma vez que há o risco de veiculação de resíduos de antibióticos e cepas resistentes por meio do consumo de leite e derivados.

Por apresentar atividade antibacteriana contra grande número de bactérias e serem de origem natural, os óleos essenciais apresentam grande potencial na prevenção e no tratamento dos agentes causadores da mastite bovina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de melaleuca frente às bactérias patógenas relacionadas à mastite bovina.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar na literatura os agentes de grande impacto na ocorrência da mastite;
- Isolar bactérias provenientes do leite de vacas diagnosticadas com mastite;
- Analisar a atividade antibacteriana dos desinfetantes comerciais usados no pré e pós *dipping*;
- Avaliar o perfil de suscetibilidade de linhagens de referência ATCC e de bactérias isoladas do leite proveniente de vacas com mastite frente ao óleo essencial de Melaleuca;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do óleo essencial de Melaleuca sobre as bactérias pesquisadas.

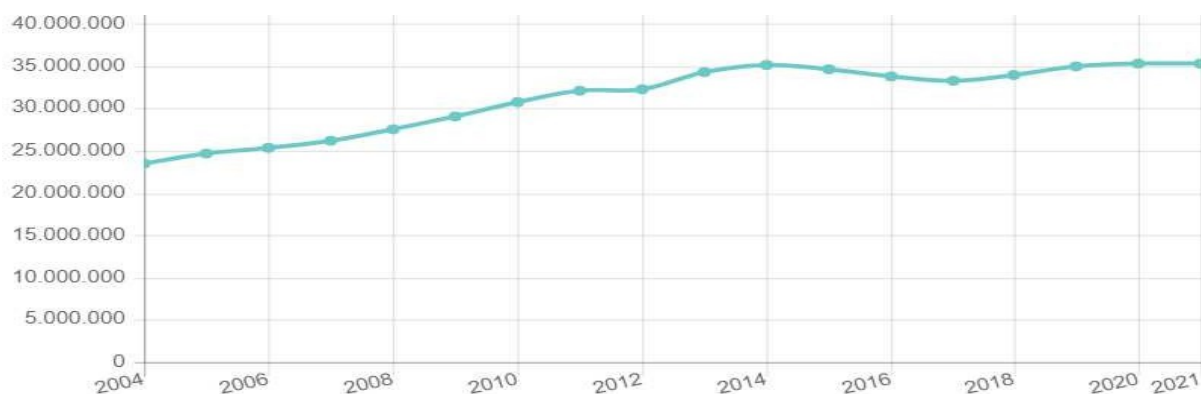
4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Cadeia produtiva leiteira nacional

A produção leiteira desempenha um papel significativo na economia do Brasil. A indústria do leite é responsável por empregar milhões de pessoas em diferentes estágios da cadeia produtiva, desde a criação e cuidado dos animais até o processamento e distribuição dos produtos lácteos (BRASIL, 2023).

De acordo com dados do IBGE apresentados na Gráfico 1 a produção de leite no Brasil cresceu de 2004 a 2013, em 2014 a produção passou a declinar, fato que durou 3 anos.

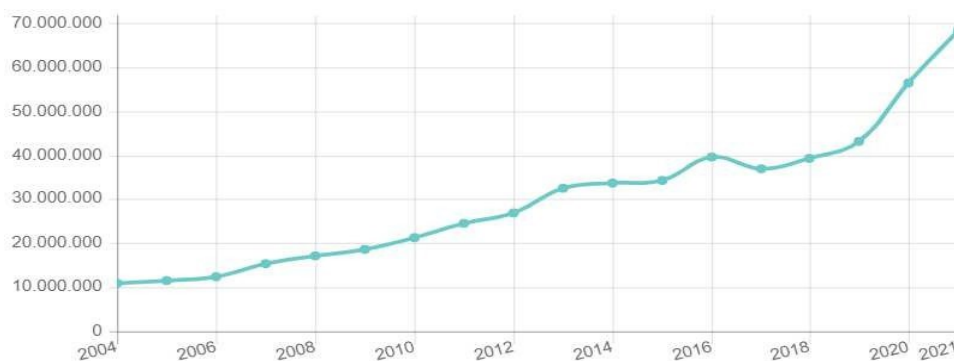
Gráfico 1 - Volume de leite produzido no Brasil (Unidade L x 1000), de 2004 a 2021



Fonte: IBGE (2023)

Essa trajetória de queda foi revertida em 2018, quando a produção voltou a crescer, totalizando mais de 35 bilhões de litros no ano de 2021 atingindo um valor bruto de mais de R\$ 68 bilhões, observa-se que o valor de produção cresceu de forma significativa desde 2019 (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Valor da produção de leite no Brasil, de 2004 a 2021 (Unidade R\$ x 1000)



Fonte: IBGE (2023)

Em termos da produção estadual, os cinco maiores estados produtores concentraram quase 70% do total nacional, sendo que Minas Gerais deteve uma participação de 27,23% no volume de leite produzido, sendo o maior produtor nacional, conforme dados apresentados na Tabela 1. O Paraná é o segundo maior produtor de leite do Brasil, com mais de 4 bilhões de litros, a posição no *ranking* se deve ao fato de o estado contar com algumas das regiões mais expressivas na produção brasileira, como é o caso dos Campos Gerais, incluindo os municípios de Castro, Carambeí, Arapoti, entre outros.

Um levantamento do Departamento de Economia Rural (Deral), da Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento (Seab), aponta que a soma do Valor Bruto de Produção (VBP) de toda a região dos Campos Gerais, só em 2020, foi de R\$ 9,8 bilhões, impulsionada principalmente por Castro (R\$ 432 milhões) e Carambeí (R\$ 271 milhões), municípios que mais produzem na região.

Tabela 1 - Produção de leite dos principais Estados no ano de 2021

Estado	Produção (Mil litros)	Participação Produção no Brasil (%)
Minas Gerais	9.611.706	27,23
Paraná	4.415.634	12,51
Rio Grande do Sul	4.385.198	12,42
Santa Catarina	3.161.993	8,96
Goiás	3.121.391	8,84

Fonte: Adaptado IBGE (2023)

Em escala mundial o Brasil é o terceiro maior produtor de leite, com produção em 98% dos municípios brasileiros, em relação ao tamanho das propriedades predomina pequenas e médias propriedades, empregando 4 milhões de pessoas (BRASIL, 2023).

Embora o Brasil ocupe essa posição na classificação mundial ainda possui um grande potencial a ser explorado, principalmente em termos de ganhos de produtividade, de modo a se tornar também um dos principais participantes do mercado global de leite e derivados (EMBRAPA, 2020)

O país conta com mais de 1 milhão de propriedades produtoras de leite segundo as projeções do agronegócio da Secretaria de Política Agrícola (BRASIL, 2023), estima-se que 2,3% das propriedades leiteiras são especializadas e atuam como empresa rural eficiente. Entretanto, 90% dos produtores são considerados

pequenos, com baixo volume de produção diária, baixa produtividade por animal e pouco uso de tecnologias (FBB, 2010).

Embora o tamanho das propriedades de rebanho leiteiro sejam pequenos quando comparado a outros países, as fazendas brasileiras estão crescendo em termos de volume individual de produção. A inserção no Brasil no mercado internacional está atrelada, em parte, à adaptação às mudanças tecnológicas e de mercado, especialmente em eficiência produtiva e qualidade da produção (PEROBELLI; ARAÚJO; CASTRO, 2018).

4.2 Impactos econômicos associados à mastite bovina

A mastite caracteriza-se por um processo de inflamação da glândula mamária promovida por diferentes fatores, sendo os principais causados por bactérias, em cerca de 90% dos casos. Representa um dos principais entraves para a bovinocultura leiteira, devido aos severos prejuízos econômicos (RAMOS *et al.*, 2017), que acarreta em perdas anuais globais de aproximadamente US\$ 35 bilhões (CANESCHI *et al.*, 2023).

Além das perdas econômicas resultantes da mastite, seu efeito é notado, principalmente, pela redução na produção e as alterações na composição do leite (RAMOS *et al.*, 2017). Nesse sentido, o descarte do leite de vacas em tratamento com antibióticos é um agravante, quando se analisa além do prejuízo econômico, o destino desse leite e seu impacto na poluição ambiental (DEMEU *et al.*, 2015).

Lopes *et al.* (2020) em seus estudos concluíram que o aumento da contagem das células somáticas (CCS) influenciou diretamente no impacto econômico da produção de leite. Segundo os autores o item de maior representatividade foram as perdas ocasionadas pela diminuição na produção, seguido do descarte de leite de animais em tratamento e despesas com tratamento curativo. As despesas com tratamento preventivo representaram, no máximo, 10,8% do impacto econômico. Portanto, investir em práticas preventivas trazem vantagens, pois irá contribuir significativamente para diminuição da CCS no tanque e, conseqüentemente reduzir o impacto econômico da mastite (DEMEU *et al.*, 2015).

Para a indústria de laticínios, a mastite bovina é fator causador das maiores perdas econômicas (BARREIROS *et al.*, 2022). A mastite provoca uma série de alterações físico-químicas no leite, como: modificações no pH (geralmente

deixando-o alcalino), diminuição no extrato seco total (caseína, gordura, lactose), aumento de minerais, como sódio e cloro, diminuição do cálcio e fósforo, aumento de algumas enzimas (catalase, fosfatase ácida, arilesterase, entre outras), ressaltando ainda os problemas com o sabor (sabor salgado), fermentações anormais, demora de coagulação, dificuldade de sinéreses dos queijos, diminuição do rendimento e da termoestabilidade, que constituem os principais problemas tecnológicos observados na indústria, decorrentes do uso do leite mastítico (TRONCO, 2010).

Segundo a Instrução Normativa n.º 77 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é proibido o envio a qualquer estabelecimento industrial do leite de fêmeas que, independentemente da espécie, estejam submetidas a tratamento com produtos de uso veterinário durante o período de carência recomendado pelo fabricante. A IN n.º 76 aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade (RTIQ) do leite cru refrigerado, devendo este não apresentar resíduos de antibióticos e contaminantes acima do limite máximo previsto em normas complementares.

Segundo a Portaria n.º 392 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) um leite com resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes acima dos limites previstos em normas complementares, não pode ser utilizado para o seu aproveitamento condicional, e somente pode ser utilizado para a elaboração de produtos não comestíveis, exceto para o seu uso na alimentação animal.

4.3 Definição e caracterização da mastite bovina

A mastite pode ser dividida em dois grandes grupos sendo eles a mastite clínica e subclínica. A mastite clínica refere-se aos casos em que existem sinais visíveis de alterações no leite como: pus, grumos, edema e aumento de temperatura do animal (ZIMERMANN; ARAUJO, 2017). Geralmente é aguda e com curta duração da doença, sendo causada por agentes do próprio ambiente (KUROSAWA *et al.*, 2020). A mastite subclínica é assintomática e caracteriza-se por alterações na composição do leite que são detectadas laboratorialmente (SILVA; MARTINS FILHO, 2017) por meio do aumento da contagem de células somáticas (CCS) (KUROSAWA *et al.*, 2020), trata-se de uma inflamação intramamária causada por microrganismos que invadem o canal do teto, é a forma mais frequente de mastite (FORSBÄCK *et*

al., 2009) e de maior duração (KUROSAWA *et al.*, 2020). A grande maioria das mastites são de origem bacteriana, representando mais de 90% de todos os diagnósticos de mastite (GONÇALVES *et al.*, 2018).

A prevalência da infecção é determinada pela natureza, grupo de bactérias, pela resistência do agente aos antibióticos e por outros fatores relacionados ao hospedeiro (FURLANI *et al.*, 2021). Porém é importante lembrar que a mastite de qualquer forma ou intensidade reduz a produção leiteira, chegando a muitos casos a perda de um ou mais tetos (TOZZETTI *et al.*, 2008).

Os agentes etiológicos podem ser classificados em organismos contagiosos ou causadores de mastite ambiental. Os agentes contagiosos são transmitidos por vacas que apresentam glândulas mamárias infectadas para vacas saudáveis. Entre esses, a bactéria *Staphylococcus aureus* é a de maior ocorrência (SPERANDIO *et al.*, 2019). Já os organismos classificados como ambientais são aqueles presentes no ambiente onde está a vaca, como o solo, a água, o esterco, a cama, etc. Nesse grupo, a bactéria mais patogênica é a *Escherichia coli* (SPERANDIO *et al.*, 2019).

A mastite estafilocócica é uma doença complexa e seu principal agente, o *Staphylococcus aureus*, é um patógeno com potencial para expressar diversos fatores de virulência (FURLANI *et al.*, 2021). É um dos principais agentes das mastites do rebanho leiteiro em vários países e com o aparecimento de cepas multirresistentes a antibióticos, por estes motivos o tratamento dessas infecções tem sido dificultado (ZANETTE; SCAPIN; ROSSI, 2010). Portanto, o estudo sobre o seu perfil de resistência é uma preocupação importante, com consequências alarmantes à saúde dos animais e também da saúde pública (FREITAS *et al.*, 2018).

De acordo com Lopes *et al.*, 2020a em seus estudos a bactéria *Enterococcus faecalis* apresentou resistência a antibióticos. Bactérias do gênero *Enterococcus spp.* estão presentes de maneira geral em laticínios devido à sua comensalidade no intestino de vacas leiteiras e resistência a processos de pasteurização, no entanto, podem representar um risco à população devido à sua patogenicidade e ascendente resistência antimicrobiana.

4.4 Tratamento e medidas de controle da mastite

De acordo com Barreiros *et al.* (2022) as boas práticas de higiene são as principais medidas de prevenção e controle da mastite, sendo a desinfecção dos tetos ainda o método mais utilizado devido à sua simplicidade e alta eficiência.

Para evitar a transmissão dos agentes causadores da mastite, usam-se meios de prevenção como o pré *dipping* e pós *dipping* que consistem na desinfecção dos tetos antes e após a ordenha, respectivamente, lavagem das mãos dos ordenhadores com água e sabão neutro antes da manipulação, higiene correta das teteiras e uso de papel toalha ou pano individual para cada animal (ZIMERMANN; ARAUJO, 2017). Além disso, utiliza-se a terapia da vaca seca, tratamento dos animais acometidos e descarte dos que apresentarem infecções crônicas (LOPES *et al.*, 2020b).

Existem vários ingredientes ativos encontrados em produtos usados para desinfecção de tetos no processo de pré e pós *dipping*. Os principais ingredientes desinfetantes incorporados nos produtos são iodo, gluconato de clorexidina, dióxido de cloro e ácido láctico, bem como suas combinações (FITZPATRICK; GARVEY; GLEESON, 2018).

De acordo com Medeiros *et al.* (2009) o uso do cloro tem como desvantagem sua menor estabilidade, além da não observação das recomendações e critérios de uso pelos produtores. Os autores observaram que 100,0% das amostras de *Staphylococcus* spp. mostraram-se resistentes a este princípio ativo, sendo desaconselhado sua utilização nas práticas de pré e pós *dipping*.

O uso desses saneantes antes e após a ordenha é uma recomendação do Programa de Controle de Mastite recomendado pelo Conselho Nacional de Mastite (*National Mastitis Council*). Trata-se de uma organização profissional sem fins lucrativos dedicada a reduzir a mastite e melhorar a qualidade do leite, sediado em Minnesota nos Estados Unidos (GODDEN *et al.*, 2016).

O controle e o tratamento da mastite são as principais causas do uso de antimicrobianos na pecuária leiteira. Contudo, na maioria das vezes, os antimicrobianos são utilizados de forma errônea e abusiva, o que contribui para o aumento da resistência dos patógenos, dificultando o tratamento dessas infecções (ZANETTE; SCAPIN; ROSSI, 2010).

A resistência microbiana é um fenômeno generalizado e crescente e tem um sério impacto na sociedade, tanto em nível econômico como em termos de cuidados com a saúde. Representa um dos desafios mais complexos, já responsável por 700.000 mortes por ano em todo o mundo, que podem aumentar para 10 milhões até 2050, resultando em perda de 11% na produção de gado (CANESCHI *et al.*, 2023).

Os antibióticos para tratar mastite também são uma preocupação para a indústria e para a saúde pública. A presença de resíduo de antibiótico no leite interfere no processo de fabricação de muitos produtos lácteos como o queijo e outros produtos obtidos por meio da fermentação, e a presença de antibióticos mesmo sendo de níveis baixos pode causar problemas de saúde aos consumidores (TOZZETTI *et al.*, 2008). Conforme estipulado pela Instrução Normativa 77, é vedado o recebimento de leite pela indústria que contenha resíduos de antibióticos.

Um dos problemas preocupantes atualmente é a propagação de linhagens resistentes às drogas de “primeira linha”, levando a consequências graves. Pois as infecções causadas por linhagens resistentes que não respondem ao tratamento, podendo ocasionar prolongamento da doença e maior risco de descarte e morte do animal (ZIMERMANN; ARAUJO, 2017) sendo de grande importância a identificação e isolamento desses agentes para a análise de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* para desenvolver métodos preventivos efetivos e estratégias para o tratamento e controle (ZANETTE; SCAPIN; ROSSI, 2010).

A eficácia clínica de um antimicrobiano é de quantificação muito difícil, porque há grandes variações na resposta individual e do rebanho, por causa do tipo de microrganismo envolvido, localização dos sítios infectados, grau de endurecimento da glândula mamária, duração da infecção e outros fatores (TOZZETTI *et al.*, 2008). Sendo assim, no que se diz respeito a prevenção vale ressaltar que a realização de pré e pós *dipping* são de grande importância a fim de reduzir bactérias nos tetos, evitando a mastite e com isso reduzindo o uso de antibióticos (SCHELLES *et al.*, 2021).

4.5 Terapia alternativa

O uso de extratos vegetais está documentado na medicina tradicional em todo o mundo e há um interesse crescente na sua aplicação para o tratamento da mastite bovina. Muitas plantas medicinais com diferentes propriedades biológicas já são utilizadas neste campo, embora ensaios *in vivo* que relatem sua eficácia, farmacocinética e farmacodinâmica sejam escassos (CANESCHI *et al.*, 2023).

As plantas, ininterruptamente, apresentam uma ação importante como um dos recursos naturais basais utilizados para acolher as necessidades humanas, fossem aquelas conexas à alimentação ou à saúde, desde tempos remotos da

humanidade. Muitas plantas já eram utilizadas em formas de extratos para ações clínicas (FREITAS; COSTA; MIRANDA, 2022).

A resistência antimicrobiana surgiu como uma das ameaças mais importantes para a saúde humana e animal no mundo, tendo em vista esse problema, estudos envolvendo o desenvolvimento de medicamentos alternativos, seguros, eficazes e com menos efeitos colaterais são necessários (LOPES *et al.*, 2020b).

Diversos trabalhos têm comprovado a eficácia de compostos extraídos de plantas sobre bactérias isoladas em mastite bovina, apresentando como estratégia terapêutica promissora para tratamento de infecções, reduzindo o uso de antimicrobianos tradicionais e se adequando à abordagem de Saúde Única (ALVES; MOREIRA, 2021). Nesta perspectiva, há uma excelente oportunidade para o desenvolvimento de processos sustentáveis de exploração de produtos naturais, como os óleos essenciais (ALMEIDA; ALMEIDA; GHERARDI, 2020).

De acordo com Schelles *et al.* (2021) o extrato de própolis pode ser usado como agente desinfetante para os tetos de vacas leiteiras em substituição à solução de iodo, propiciando semelhantes características físico-químicas e microbiológicas no leite, com redução da carga microbiana nos tetos.

Austresilio-Filho *et al.* (2023) observaram em seus estudos que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) apresentou atividade antibacteriana contra isolados de *Staphylococcus aureus* da mastite bovina.

Finhler *et al.* (2020) confirmaram em seus estudos o efeito antibacteriano *in vitro* do OE de *Melaleuca alternifolia* sobre isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes ao antimicrobiano Penicilina G de bovinos acometidos por mastite.

Devido a atividade antibacteriana dos OE esses apresentam-se como uma alternativa promissora no controle dos patógenos causadores da mastite bovina (LOPES *et al.*, 2020).

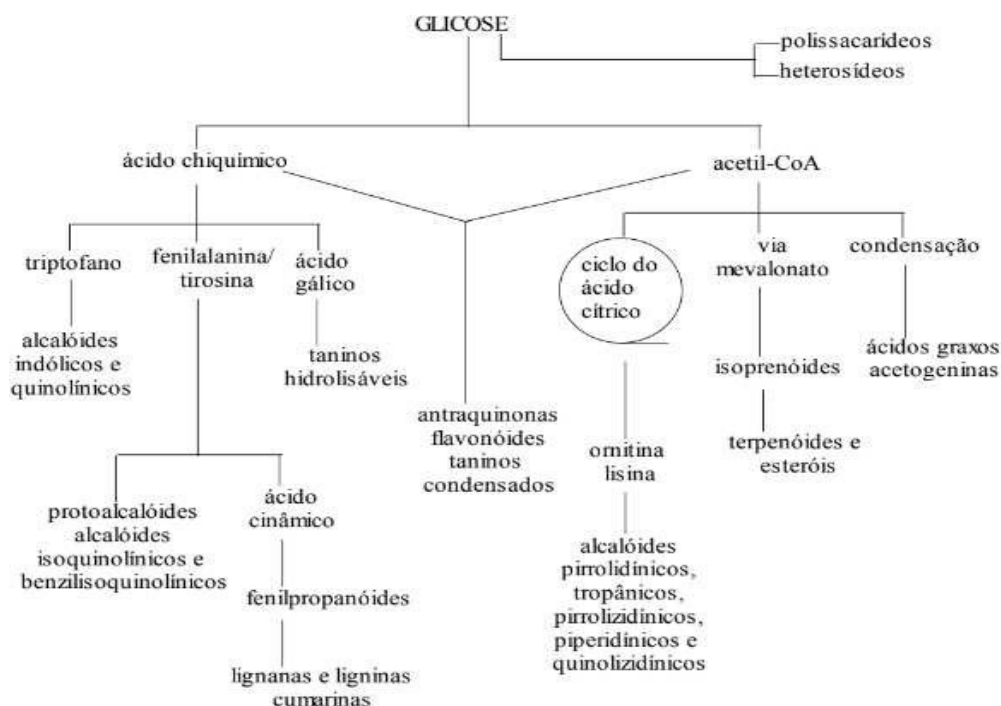
4.5.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos líquidos, complexos, que possuem compostos bioativos, voláteis, com odor e cor característicos, formados a partir de metabólitos secundários de plantas, presentes em todos os órgãos desta, como brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas e cascas (ALMEIDA;

ALMEIDA; GHERARDI, 2020). Possuem atividade antimicrobiana reconhecida frente a diversos grupos bacterianos (LOPES *et al.*, 2022).

De acordo com Simões *et al.*, 2016, a origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e acetil-CoA (Figura 1). O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Já os derivados do acetil-CoA podem ser classificados, segundo a via metabólica seguida, em: derivados do acetato, via ciclo do ácido cítrico; derivados do acetato, via mevalonato; e produtos de condensação do acetato.

Figura 1 - Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários



Fonte: Simões *et al.* (2016)

Os OE são misturas altamente concentradas e complexas de compostos químicos e podem ter importantes propriedades antissépticas, antibacterianas, antivirais, antioxidantes, antiparasitárias, antifúngicas e inseticidas. Portanto, o uso

de OE na proteção do gado contra infecções, principalmente em fazendas orgânicas, vem tornando-se uma prática comum (TOMANIĆ *et al.*, 2022).

Tendo em vista o aumento da resistência pelos microrganismos aos antibióticos, novos agentes são propostos na tentativa de minimizar tal ocorrência. Nesse sentido, considerando a ampla atividade biológica apresentada pelos produtos de origem natural, os óleos essenciais têm sido investigados para determinação da atividade antimicrobiana (CASTRO; LIMA, 2011) e têm demonstrado resultados promissores (LOPES *et al.*, 2020). Contudo, a eficácia da atividade antibacteriana varia de acordo com o tipo de microrganismo e seu nível de sensibilidade, o óleo essencial e a concentração utilizada (ALMEIDA; ALMEIDA; GHERARDI, 2020).

Os óleos essenciais são classificados como *Generally Regarded As Safe*, (GRAS), ou seja, seguros para a saúde, e apresentam propriedades antibacterianas, sem relatos de resistência após exposição prolongada em bactérias gram-positivas e gram-negativas, o que torna justificável seu emprego contra agentes bacterianos (DAL POZZO *et al.*, 2011).

Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos OEs, é provável que a sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas que existam vários alvos na célula. Os possíveis locais ou mecanismos na célula bacteriana considerados locais de ação para os componentes dos óleos essenciais estão indicados na Figura 2 (BURT, 2004).

Figura 2 - Locais e mecanismos de ação de óleos essenciais na célula bacteriana

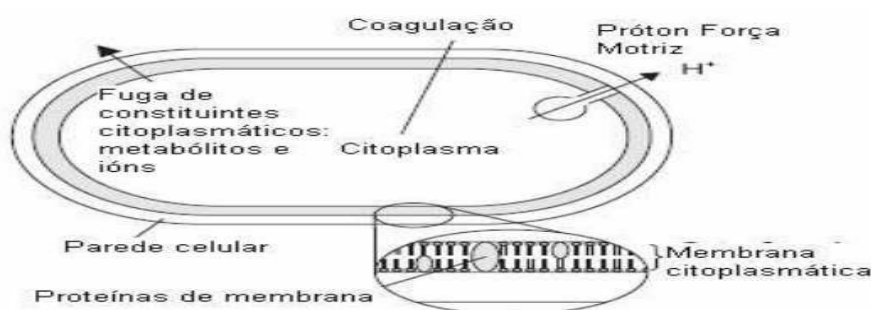


Figura 4. Locais e mecanismos na célula bacteriana considerados locais de ação para componentes de OEs: degradação da parede celular; danos a membrana citoplasmática; danos às proteínas da membrana; vazamento de conteúdo celular; coagulação do citoplasma e esgotamento da força motriz do próton.

Fonte: Adaptado de Burt (2004)

Caneschi *et al.*, 2023 cita que os efeitos antibacterianos dos OE estão ligados ao vazamento de componentes celulares e perda de íons, devido ao aumento da permeabilidade da membrana, bem como à redução do potencial de membrana, ao rompimento das bombas de prótons e à depleção de adenosina trifosfato, levando ao rompimento da célula.

De acordo com Gustafson *et al.*, 1998 os óleos essenciais têm capacidade de coagular o citoplasma e danificar os lipídeos e proteínas da membrana celular. Os danos causados à parede celular ocasiona um escape de macromoléculas, evoluindo para o lise celular.

4.5.2 Óleo essencial de *melaleuca* (tea tree)

O gênero *Melaleuca* (família *Myrtaceae*) é nativo da Oceania, onde essas plantas são usadas há séculos pelos aborígenes na medicina tradicional australiana, especialmente por sua atividade antimicrobiana de amplo espectro (CANESCHI *et al.*, 2023). Os principais usos do óleo essencial capitalizaram historicamente as ações anti-sépticas e anti-inflamatórias, empregado também por suas propriedades antimicrobianas como ingrediente ativo em muitas formulações tópicas usadas para tratar infecções cutâneas (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

A constituição química do óleo essencial de melaleuca, possui alta concentração em terpinen-4-ol, no qual é atribuída principalmente por sua atividade antimicrobiana e sendo o principal componente do óleo (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006), α -terpineno, γ -terpineno, 1,8-cineol, sendo os principais responsáveis por suas propriedades medicinais. O óleo pode ser extraído das folhas, ramos e caule, tendo a sua composição documentada pela ISO 4730/1996 (*International Organization for Standardization*) (MARTINS *et al.*, 2011).

A *Melaleuca alternifolia* (árvore do chá) é a mais extensivamente estudada de todas as plantas indígenas australianas, seu potencial medicinal foi observado na literatura científica já em 1930 por Humphrey. O óleo essencial demonstrou ter atividade contra uma variedade de microrganismos incluindo *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* e *Trichophyton spp.* (WILKINSON; CAVANAGH, 2005).

O crescimento, a formação de biofilme e a invasão de células epiteliais mamárias bovinas de *S. aureus* são reduzidos com a adição de TTO, sugerindo que pode ser considerado uma ferramenta útil para ajudar agentes antibióticos a curar infecções persistentes e crônicas (ZHAN *et al.*, 2020).

Portanto, o TTO deve ser considerado como uma nova estratégia terapêutica para a mastite bovina causada por *S. aureus* , visando melhorar a produção e qualidade do leite (ZHAN *et al.*, 2020).

O óleo essencial de *melaleuca* vem se destacando em pesquisas na área biológica e prospecção biotecnológica devido sua atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas, tornando-se uma potencial alternativa terapêutica.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Linhagens

No presente trabalho foram utilizadas linhagens obtidas por meio da CMRP - UTFPR Campus Ponta Grossa (Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense), sendo elas *Staphylococcus aureus* (ATCC 2016 e 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 0012), *Staphylococcus aureus* tipo MRSA (CMRP 6058).

Bactérias isoladas proveniente do leite ordenhado de vacas com mastite em uma propriedade particular nos Campos Gerais, e isoladas em um laboratório de análises de patologia animal situado na cidade de Carambeí no estado do Paraná com perfil de resistência a antibióticos conforme resultados apresentados no Quadro 1, sendo elas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.* e *Escherichia coli*. As bactérias que apresentaram resistência são representadas por R, as intermediárias por I e sensível pela letra S.

Quadro 1 - Antibiograma das bactérias com perfil de resistência a antimicrobianos

Antibióticos	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ampicilina	R	I	R
Amoxicilina	R	I	R
Amoxicilina + Ác. Clavulânico	R	R	S
Cefalexina	R	R	R
Ceftiofur	S	S	R
Ciprofloxacina	S	S	R
Estreptomicina	I	S	R
Enrofloxacina	S	S	R
Florfenicol	S	S	R
Gentamicina	S	S	R
Marbofloxacina	S	S	R
Neomicina	S	S	R
Norfloxacina	S	S	R
Penicilina	R	R	R
Sulfa.+Trimetopima	S	R	R
Tetraciclina	S	S	R

Legenda: S: Sensível I: Intermediário R: Resistente

Fonte: Laboratório de patologia animal (2024)

5.2 Óleo essencial de *melaleuca*

Na primeira fase dos testes o óleo essencial de *Melaleuca* foi adquirido comercialmente, para ajustes de protocolo. Posteriormente foram utilizados os óleos extraídos pelos acadêmicos do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia no Laboratório de Métodos Instrumentais (C005) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa.

A extração do óleo foi obtida a partir de 350 g de folhas secas de *Melaleuca*, resultando em 8 mL de óleo essencial utilizando o método da hidrodestilação.

5.3 Desinfetante comercial usado no pré e pós *dipping*

A fim de avaliar como as práticas de pré e pós *dipping* influenciam a redução de microrganismos causadores da mastite, foi realizado através do método disco-difusão o perfil de suscetibilidade das linhagens de *Staphylococcus aureus* (ATCC 2016), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 0012) frente aos desinfetantes usados no pré e pós *dipping* pela propriedade onde foi realizada a coleta das amostras.

5.4 Coleta da amostragem de leite

As amostras foram coletadas em uma propriedade localizada na região dos Campos Gerais, onde foram selecionadas vacas em lactação com caso de mastite. As coletas foram realizadas em frascos tipo falcon esterilizados de 50 mL e mantidos inclinados para evitar a entrada de sujidades. Após a coleta, as amostras foram imediatamente acondicionadas em caixa de refrigeração e posteriormente encaminhadas para o Laboratório da Coleção Microbiológica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná para o processamento das análises.

5.5 Cultivo bacteriológico

A cultura bacteriológica das amostras de leite coletadas de vacas com mastite foi realizada a partir de meios de cultura seletivos. As amostras de leite foram inoculadas 100 µL em Ágar Baird Parker suplementado com gema de ovo e telurito e Ágar Sangue a fim de pesquisar *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp.

Considerando positivo para *Staphylococcus aureus* no meio de cultura Baird Parker o desenvolvimento de colônias negras, brilhantes, convexas e circundadas por halo da lecitinase e no Ágar Sangue colônias com coloração branca ou amarelada, opacas, cremosas e convexas, com presença ou não de beta-hemólise.

A partir do ágar Baird Parker foram selecionadas colônias com e sem formação de halos da lecitinase, para confirmação dos testes bioquímicos. As colônias selecionadas foram transferidas individualmente com auxílio de alça de platina para tubos de ensaio contendo caldo BHI, em seguida os tubos foram incubados 37 ± 1 °C por 24 a 48h, após o período de incubação realizou-se testes bioquímicos de coagulase e catalase, a microscopia foi realizada por meio da coloração de Gram.

O teste da coagulase foi realizado com plasma de coelho/citrato de sódio a 3,8%, onde foi retirado 1 mL do plasma e homogeneizado com 4 mL de solução fisiológica, uma alíquota de 0,5 mL por amostra foi adicionada aos tubos, as amostras foram incubadas a 37 ± 1 °C, após 6 horas de incubação foi observado se houve a formação de coágulo. Os isolados de *Staphylococcus aureus* apresentam coagulase positiva.

Para o teste da catalase a partir das colônias do ágar Baird Parker, foram emulsionadas uma alçada de colônia em uma gota de peróxido de hidrogênio em lâmina de vidro, onde foi observada a ocorrência de borbulhamento imediato (positivo), ou não (negativo). Os isolados de *Staphylococcus aureus* são catalase positiva. Na microscopia realizada através da coloração de Gram as bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, e com apresentação em cachos.

Para o isolamento de enterobactérias as amostras foram inoculadas no meio de cultura Macconkey e para pesquisa de *Escherichia coli* foi utilizado o meio de cultura EMB (Eosina Azul de Metileno). As placas foram incubadas em condições aeróbicas a 37 ± 1 °C por 24 a 48h. Após o período de incubação foram observadas as características morfológicas das colônias.

No ágar Macconkey observou-se as características das colônias, podendo ser, rosadas a vermelhas (cercadas ou não por uma zona de precipitação biliar), com dimensão média a grande. No meio de cultura EMB os coliformes totais apresentam colônias pretas azuladas e as colônias de *Escherichia coli* poderão apresentar reflexo verde metalizado característico, devido a rápida fermentação da

lactose. Para confirmação dos resultados foram realizados testes positivos a partir de linhagens de referência ATCC, e realizada coloração de Gram.

Os isolados foram armazenados em tubos *ependorf* de 1,5 mL contendo caldo BHI e glicerol 30% e mantidos em freezer para conservação.

5.6 Métodos de avaliação da atividade antibacteriana do óleo de melaleuca

5.6.1 Teste disco-difusão

Para a determinação do perfil de suscetibilidade dos microrganismos foi utilizado o método de disco-difusão, esse teste é aceito pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) (OSTROSKY *et al.*, 2008).

As bactérias testadas foram previamente isoladas em placas de petri contendo Ágar Mueller Hinton e incubadas em estufa bacteriológica a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, após esse período, as placas foram retiradas da estufa e verificado o crescimento bacteriano e se houve a presença de contaminações. Em seguida, colônias isoladas de cada uma das linhagens isoladas, foram suspensas individualmente em solução salina 0,9% até a obtenção de uma turbidez correspondente a solução padrão de McFarland 0,5 para obtenção de inóculos com aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Os inóculos foram semeados com auxílio de *swabs* estéreis em placas de petri contendo Ágar Mueller Hinton, uma alíquota de 150 μL do óleo essencial de melaleuca foi adicionado em 3 discos de papel filtro previamente esterilizados em autoclave, com auxílio de pinça esterilizada os disco foram colocados sobre o meio de cultura semeados com as bactérias, e com o objetivo de avaliar a eficácia do controle preventivo da mastite bovina no campo, realizou-se também o teste de disco difusão dos desinfetantes comerciais usados no pré e pós *dipping*, onde foram impregnados nos discos 150 μL dos desinfetantes usados na propriedade onde as amostras foram coletadas. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, por período de 24-48 horas.

Para a validação do teste, no controle esterilidade foi utilizado disco impregnado com água destilada estéril, e como controle positivo foram utilizados ampicilina e canamicina na concentração de 100 mg/mL.

Após o período de incubação, realizou-se a leitura das placas onde foi observado a formação de halos de inibição e a medição do tamanho desses halos ao redor dos discos.

5.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) concentração bactericida mínima (CBM)

As linhagens foram isoladas por meio de semeadura em superfície, em placas de Petri contendo meio ágar Muller Hinton, e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 - 48 h. A densidade populacional inicial dos inóculos foi padronizada utilizando-se o controle de turbidez da escala McFarland de 0,5, o qual equivale a uma suspensão contendo aproximadamente de 10^7 a 10^8 UFC/mL. Em seguida, esses inóculos foram diluídos em solução salina 0,9% para a concentração aproximada de 10^5 UFC/mL.

O óleo essencial de Melaleuca foi diluído, obtendo-se a concentração de 8% considerada a solução-padrão inicial. Para obtenção dessa concentração da solução-padrão inicial foram adicionados, em um tubo de ensaio estéril: 0,4 mL do óleo de Melaleuca, 4,6 mL de água destilada estéril e suplementado com 0,05 mL de Tween 80; a solução foi agitada durante 5 minutos em um agitador de soluções tipo Vortex. A utilização de Tween 80 é importante para que haja a solubilização do óleo essencial na água, sem interferir em sua atividade biológica, conforme verificado em estudos preliminares (FREIRE *et al.*, 2014).

Para a realização da análise da CIM foram utilizadas placas de microdiluição (Elisa) de 96 poços, dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Em cada poço foram adicionados 100 μL de Caldo Muller Hinton, em seguida inseriu-se 100 μL da solução padrão, a fim de obter uma concentração inicial de 36 mg/mL (4%), as concentrações subsequentes foram obtidas através de diluição seriada partindo-se da concentração inicial de 4% na linha A até 0,06% na Linha H, pela transferência de 100 μL do conteúdo ao poço subsequente. Para os poços da linha H, foram dispensados 100 μL do conteúdo do poço, de modo a igualar o volume total. As concentrações obtidas em cada diluição estão apresentadas na Tabela 2. Por fim foram adicionados 10 μL da suspensão dos inóculos, em todos os poços com exceção da coluna correspondente ao teste de esterilidade.

Tabela 2 - Concentrações obtidas através da diluição seriada

Poços	Concentração (%)
1 - A	4
2 - B	2
3 - C	1
4 - D	0,5
5 - E	0,25
6 - F	0,125
7 - G	0,0625
8 - H	0,03125

Fonte: Autoria própria (2024)

Para validação do teste nos poços de controle de crescimento bacteriano foram preparados poços para cada isolado contendo 100 µL de caldo Muller Hinton + 10 µL de cada inóculo. Para controle de esterilidade foram preparados poços com 100 µL de caldo Muller Hinton, também poços com 100 µL de caldo Muller Hinton + 100 µL da solução padrão. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Após as inoculações as placas foram incubadas $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. A leitura dos resultados de absorbância foi realizada na leitora de microplacas ELISA DR-200BS-NM em 405 nm, e para a confirmação visual dos resultados foram adicionados 10 µL de resazurina a 0,01% a cada poço. A leitura, que a olho nu consistiu na avaliação das cores azul, representando ausência de crescimento bacteriano, e a mudança para a cor rosa representando a presença de crescimento bacteriano. Esse processo ocorre por meio de uma reação de redução da resazurina em resorufina (SPERANDIO *et al.*, 2019).

A concentração bactericida mínima (CBM) foi obtida por meio da semeadura em ágar Mueller-Hinton, de alíquotas de 10µL das diluições correspondentes a CIM e duas imediatamente anteriores dos conteúdos dos poços das placas de microdiluição. Essas concentrações imediatamente superiores a CIM são suficientes para demonstrar o efeito bactericida, visto que o efeito bacteriostático foi determinado pela ausência de crescimento nos poços da placa de microdiluição (POZZATTI *et al.*, 2010). Após a semeadura, as placas de petri foram incubadas em estufa bacteriológica a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 24h. A CBM foi considerada a menor concentração que impediu o crescimento das bactérias nas placas de petri. Assim, as concentrações em que se verifica a formação UFC é considerada inibitória ao

crescimento bacteriano, ou seja, bacteriostático; enquanto as concentrações na qual se observa nulidade de crescimento são consideradas bactericidas. Todos os testes foram realizados em triplicata.

5.6.3 Análise estatística

A fim de avaliar a heterogeneidade dos resultados aplicou-se o teste Q. Após essa avaliação os resultados foram avaliados utilizando o sistema SASM - Agri, onde aplicou o teste de Tukey e Análise de Variância ANOVA.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais microrganismos relacionados à mastite são agrupados em dois grupos, quanto à sua origem e ao modo de transmissão sendo eles: agentes de mastite ambiental e agentes de mastite contagiosa.

Entre os principais da mastite contagiosa podemos destacar o *Staphylococcus aureus*, que tem a capacidade de colonizar nos tetos lesionados ou ressecados, levando a um aumento significativo da contagem das células somáticas (CCS), podendo causar a mastite subclínica de longa duração (MASSOTE et al., 2019).

A *Escherichia coli* é um dos microrganismos de maior predominância quando se trata de contaminação de origem ambiental. As infecções mamárias ocorrem sob a forma subclínica, porém já existem estudos de sua associação em casos clínicos (RIBEIRO et al., 2006).

Segundo Lopes et al. (2020) estudos vêm demonstrando altos percentuais de resistência antimicrobiana em bactérias do gênero *Enterococcus* associados à mastite bovina. Em estudos realizados na China verificou-se alta resistência de *E. faecalis* isolados de quartos mastísticos.

Nessa pesquisa foram avaliadas linhagens de referência ATCC sendo elas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 2016), *Escherichia coli* (ATCC 0012) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 25922), linhagem adquirida da Rede Paranaense de Coleções Microbiológicas de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) (CMRP 6058), isolados de bactérias *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* através de análises de amostras de leite de vacas com histórico de mastite.

6.1 Isolamento de bactérias

Das 8 amostras coletadas do campo todas apresentaram crescimento de bactérias do gênero *Staphylococcus*, esse resultado mostra-se consensual com os resultados apresentados por Zimerman e Araújo (2017) onde em seus estudos constataram a presença de *Staphylococcus* sp. em 58,97% das amostras de leite com mastite, onde o gênero é citado como um dos principais patógenos associados à mastite subclínica no Brasil.

Considerou-se colônias típicas para *Staphylococcus aureus* no meio de cultura Baird Parker as colônias que apresentam-se de cor preta, brilhante, convexa 1,0-1,5 mm com entorno branco estreito e rodeado por uma zona clara que se estende por 2-5 mm em meio opaco (BAIRD; LEE, 1995), essas características (Fotografia 1) foram observadas em 7 amostras, as 8 amostras apresentaram resultado positivo na prova da catalase, no teste de coagulase 4 amostras apresentaram resultado positivo e 4 amostras apresentaram resultado negativo.

Fotografia 1 - Características das colônias no meio de cultura Baird Parker



Esquerda: Colônias cor preta sem formação de halo da lecitinase
Direita: Colônias cor preta com formação de halo da lecitinase

Fonte: Autoria própria (2023)

Na visualização das lâminas a partir da coloração de Gram todas as amostras classificaram-se sendo cocos agrupados como cachos de uva, Gram positiva, conforme os dados apresentados no Quadro 2.

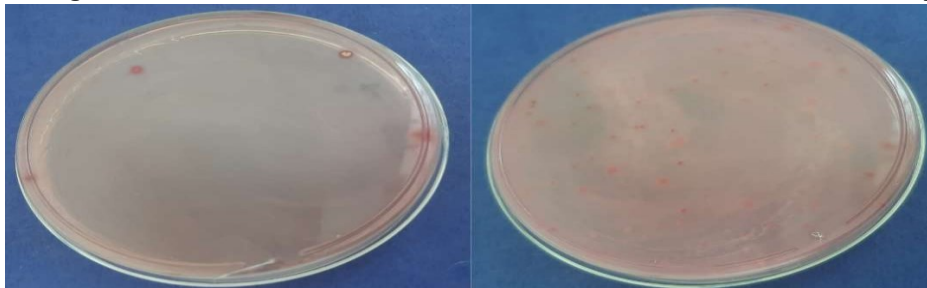
Quadro 2 - Características das colônias e provas bioquímicas dos isolados em Baird Parker

Amostra	Características Colônias	Coloração de Gram	Catalase	Coagulase	Resultado
339	colônias negras com halo	Cocos Gram +	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
495	colônias negras com e sem halo	Cocos Gram +	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
525	colônias negras com e sem halo	Cocos Gram +	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
550	colônias negras com e sem halo	Cocos Gram +	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
565	colônias negras com e sem halo	Cocos Gram +	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
617	colônias negras com halo	Cocos Gram +	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
634	colônias negras sem halo	Cocos Gram +	+	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
747	colônias negras com halo	Cocos Gram +	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>

Fonte: Autoria própria (2023)

Das análises no ágar MacConkey 2 amostras apresentaram crescimento, as colônias apresentaram-se vermelhas e indicaram a fermentação da lactose. De acordo com MOREIRA *et al.* (2008) bactérias que fermentam a lactose como a *Escherichia coli*, produzirão colônias vermelhas ou rosa com centro mais escuro devido a precipitação de sais biliares (Fotografia 2).

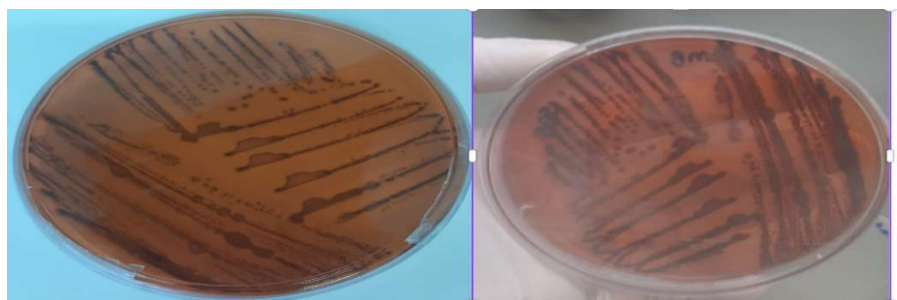
Fotografia 2 - Características das colônias no meio de cultura MacConkey



Fonte: Autoria própria (2023)

No isolamento em ágar EMB uma amostra apresentou crescimento de colônias características pretas com reflexos verde metalizado (Fotografia 3) e a segunda amostra apresentou colônias vermelhas com brilho de *Escherichia coli*, na visualização das lâminas em que foi realizada a coloração de Gram observou-se o formato de bacilo e Gram positivo.

Fotografia 3 - Características das colônias no meio de cultura EMB



Fonte: Autoria própria (2023)

6.2 Teste disco - difusão do óleo essencial de melaleuca

O teste do disco-difusão é uma técnica utilizada para avaliar a suscetibilidade de microrganismos e agentes antimicrobianos, desta forma, contribuindo para uma abordagem mais eficaz no tratamentos de infecções bacterianas.

Nessa análise foi possível observar halos de inibição nas linhagens de referência ATCC, tanto no óleo comercial quanto nas análises com o óleo extraído

na UTFPR - Campus Ponta Grossa, indicando resultados positivos para atividade antibacteriana do óleo essencial de melaleuca frente às linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*.

Embora seja notável uma distinta disparidade no diâmetro dos halos, esses resultados não diferem significativamente pelo teste de Tukey, conforme resultados apontados na Tabela 4.

Tabela 4 - Médias dos diâmetros (cm²) dos halos de inibição no teste de disco-difusão

Microrganismo Testado	Óleo Comercial	Óleo Extraído UTFPR - PG
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,37a	1,93a
<i>Escherichia coli</i>	1,43a	1,87a
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,00a	1,63a

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2023)

Na avaliação do perfil de susceptibilidade dos microrganismos isolados das amostras de leite proveniente de vacas com mastite, foi observado a formação de halos de inibição tanto nos testes com antibióticos canamicina e ampicilina quanto nos testes com o óleo de Melaleuca (Fotografia 4), em que cada placa possui os testes em triplicata.

Fotografia 4 - Halos de inibição dos testes comparativos do óleo de melaleuca com antibióticos convencionais



Fonte: Autoria própria (2023)

A partir do teste de Tukey pode-se observar conforme os resultados apresentados na Tabela 6 que o óleo essencial de Melaleuca apresentou eficácia antibacteriana variável contra os isolados testados, com diâmetros de halos de inibição variando de 1,33 e 2,67 cm² e coeficiente de variação (CV) entre 11,08% e 25,13% indicando uma alta dispersão dos dados. Apesar de haver diferenças significativas em comparação com a Canamicina e a Ampicilina, é notável que o óleo

essencial possui ação antibacteriana frente às bactérias testadas, o que é promissor para o desenvolvimento de terapias alternativas.

Tabela 5 - Média do diâmetro (cm²) dos halos de inibição dos isolados de leite proveniente de vacas com mastite

Bactéria	Óleo Essencial de Melaleuca	Canamicina	Ampicilina	CV(%)
<i>S. aureus</i>	2,67a	2,83a	3,83a	25,13
<i>S. aureus</i>	2,00b	2,67ab	3,60a	17,76
<i>S. aureus</i>	1,50b	2,83a	3,16a	11,55
<i>S. aureus</i>	2,67ab	3,37a	1,83b	11,08
<i>Staphylococcus sp.</i>	2,67b	3,00b	3,83a	6,45
<i>Staphylococcus sp.</i>	1,83b	2,83ab	3,53a	18,77
<i>Staphylococcus sp.</i>	1,33c	3,63a	2,30b	13,13
<i>Staphylococcus sp.</i>	2,00a	2,50a	2,67a	20,34

Os dados referem-se à média de triplicatas. Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2023)

6.3 Teste disco - difusão em desinfetantes comerciais usados no pré e pós *dipping*

Uma das formas de prevenção da mastite é o uso do pré e pós *dipping* antes e após a ordenha, visando reduzir possíveis contaminações e desta forma prevenir o problemas com mastite no rebanho (SCHELLES et al., 2021).

A eficácia da atividade antibacteriana dessas soluções desempenha um papel crucial na prevenção de contaminações bacterianas, na promoção da saúde do úbere, na redução da incidência da mastite e na garantia da qualidade do leite produzido

Foram avaliados o potencial antibacteriano das soluções do pré e pós *dipping*, frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 2016), *Escherichia coli* (ATCC 0012) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 25922). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6 pode-se observar que o diâmetro dos halos de inibição do pós *dipping* apresentaram-se maiores que no pré *dipping*.

Tabela 6 - Média do Diâmetro dos halos de Inibição dos Desinfetantes usados Pré e Pós

<i>Dipping</i>		
Microrganismo Testado	Pré <i>Dipping</i>	Pós <i>Dipping</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	8 mm	17 mm
<i>Escherichia coli</i>	3 mm	43 mm
<i>Enterococcus faecalis</i>	não apresentou halo	27 mm

Fonte: Autoria própria (2023)

Não foi observado halo de inibição na linhagem de *Enterococcus faecalis* na solução pré-dipping. De acordo com os resultados obtidos por Lopes et al. (2020) a bactéria *E. faecalis* apresentou resistência a antibióticos, neste estudo ela apresentou-se menos sensível ao óleo essencial de Melaleuca em relação às outras bactérias testadas. No pré *dipping* deve-se ter uma redução da carga microbiana de forma imediata, já o pós *dipping* desempenha um papel importante na prevenção da colonização bacteriana pós-ordenação a solução age como uma barreira protetora visando proteger os tetos pois a abertura dos ductos podem facilitar a entrada de microrganismos.

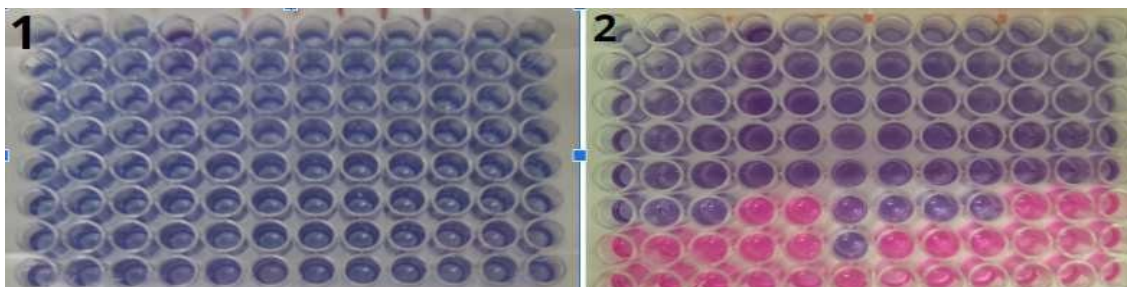
6.4 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de um microrganismo. Essa determinação foi conduzida pelo método de microdiluição em caldo utilizando placas contendo 96 poços, conforme descrito pelo *National Committee for Clinical and Laboratory Standards* (M7-A6) (2003).

Essa metodologia foi desenvolvida por Eloff em 1998, sua sensibilidade e quantidade mínima de reagentes possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Assumiu-se como CIM a menor concentração do óleo essencial que foi bacteriostático, ou seja, impediu o crescimento visível das bactérias, indicado pela mudança da coloração azul para rosa conforme representado na Fotografia 5.

Fotografia 5 - Interpretação de resultados da pesquisa da concentração mínima inibitória



1 - Microplacas com adição de resazurina 0,01%

2- Resultado da pesquisa, onde os poços de coloração azul representam inibição bacteriana e cor rosa representa presença de atividade bacteriana.

Fonte: Autoria própria (2023)

Os resultados dessa pesquisa apontaram que as bactérias isoladas no campo demonstraram maior sensibilidade ao óleo de Melaleuca em comparação com as linhagens de referência (ATCC), conforme apontam os resultados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados da concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de melaleuca frente às bactérias

Espécie Bacteriana	CIM (%)	CBM (%)
<i>Escherichia coli</i> (isolado lab*)	0,1	0,5
<i>Escherichia coli</i>	0,1	0,5
<i>Escherichia coli</i>	0,1	0,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 0012	2	4
<i>Staphylococcus sp.</i> (isolado lab*)	0,1	0,5
<i>Staphylococcus sp.</i>	0,5	2
<i>Staphylococcus sp.</i>	0,2	0,5
<i>Staphylococcus sp.</i>	0,5	0,2
<i>Staphylococcus sp.</i>	0,2	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2016	2	4
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	0,5	1
<i>Staphylococcus aureus</i> (isolado lab*)	0,2	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,2	0,2
<i>Cultura associada</i>	0,2	0,5

*“isolados lab”: isolados proveniente de laboratório de patologia clínica, no qual apresentaram resistência a antibióticos

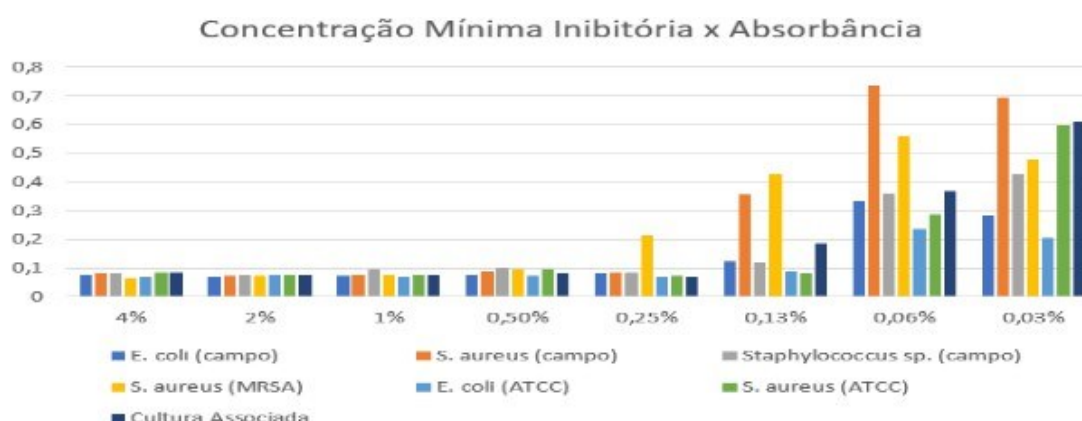
Fonte: Autoria própria (2024)

Dos resultados obtidos para *Escherichia coli* a linhagem de referência ATCC apresentou menor sensibilidade quando comparada a *Escherichia coli* que foi isolada no campo. A linhagem de *Enterococcus faecalis* ATCC 0012 exibiu uma CIM de 2%, destacando uma eficácia menos pronunciada do óleo essencial, embora ainda significativa. Os isolados do campo de *Staphylococcus sp.* mostraram CIM variando de 0,1% a 0,5 % e CBM variando de 0,2% a 0,5%, indicando uma alta

sensibilidade ao óleo essencial. Em contraste, *Staphylococcus aureus* ATCC 2016 exibiu uma CIM de 2% e CBM de 4%, enquanto a linhagem de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) apresentou uma CIM de 0,5% e uma CBM de 1%, demonstrando eficácia do óleo essencial contra cepas resistentes a antibióticos. A cultura associada, representando o crescimento múltiplo das bactérias pesquisadas, apresentou uma CIM de 0,2% e CBM de 0,5%, confirmando a capacidade do óleo em inibir múltiplas espécies bacterianas simultaneamente.

Na comparação dos resultados da Concentração Mínima Inibitória pelo método da adição de resazurina com os resultados de absorbância obtido pela leitora de microplacas (Gráfico 3) é possível observar que em concentrações mais altas (4% a 0,5%), a absorbância é baixa, indicando uma alta eficácia do óleo na inibição do crescimento das bactérias testadas. Em concentrações intermediárias (0,25% a 0,13%), há um aumento na absorbância, especialmente para *S. aureus* (campo) e *S. aureus* (MRSA), sugerindo uma redução na eficácia do óleo. As bactérias *E. coli* (campo) e *E. coli* (ATCC) mostram menor aumento na absorbância, indicando maior sensibilidade ao óleo de melaleuca.

Gráfico 3 - Comparação dos resultados da CIM pelo método de leitura visual com resazurina x resultados absorbância



Fonte: Autoria própria (2024)

Esses resultados indicam a possibilidade de uma maior eficácia do óleo essencial de melaleuca contra as bactérias provenientes do ambiente natural, sugerindo que ele pode ser particularmente eficaz contra linhagens bacterianas presentes em condições reais de exposição. A variação dos resultados obtidos pode ser atribuída a variações genéticas e adaptações ao ambiente.

Os resultados obtidos nessa pesquisa oferecem informações sobre a efetividade da atividade antibacteriana do óleo de melaleuca em diferentes contextos. A concentração mais baixa necessária para inibir o crescimento das linhagens isoladas do campo sugere que esse óleo pode ser uma opção promissora no desenvolvimento de agentes antibacterianos naturais.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através desse estudo, indicam que o óleo essencial de melaleuca possui potencial promissor como agente bactericida contra alguns dos principais microrganismos causadores de mastite bovina. Porém é importante destacar que mais estudos precisam ser realizados para aprofundar nossa compreensão sobre os mecanismos específicos pelos quais o óleo essencial de melaleuca atua contra essas bactérias e outras responsáveis por essa enfermidade. Além disso, a pesquisa em condições de campo e em diferentes linhagens bacterianas pode oferecer percepções sobre a amplitude do espectro antibacteriano do óleo e sua eficácia em situações práticas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. C. D.; ALMEIDA, P. P. D.; GHERARDI, S. R. M. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. v. Vol.17, n. 01, 2020.
- ALVES, T.; MOREIRA, M. A. S. Mastite bovina: Tratamento convencional e ação de compostos extraídos de plantas. **UNICIÊNCIAS**, v. 25, n. 1, p. 20–25, 2021.
- AUSTREGESILLO-FILHO, P. *et al.* Atividade antimicrobiana do extrato de *Melaleuca leucadendra* (Myrtaceae) em bactérias causadoras da mastite bovina. **Peer Review**, v. 5, n. 16, p. 115–128, 2023.
- BAIRD, R. M.; LEE, W. H. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. **Progress in industrial microbiology**, v. 34, p. 77–87, 1995.
- BARREIROS, Y. *et al.* Xanthan gum-based film-forming suspension containing essential oils: Production and in vitro antimicrobial activity evaluation against mastitis-causing microorganisms. **Lwt**, v. 153, p. 112470, 2022.
- BRASIL. **Mapa do Leite**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite/mapa-do-leite>>. Acesso em: 17 maio. 2023.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 1 ago. 2004.
- CANESCHI, A. *et al.* Plant Essential Oils as a Tool in the Control of Bovine Mastitis: An Update. **Molecules**, v. 28, n. 8, p. 3425, 13 abr. 2023.
- 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.
- CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, p. 203–208, 2011.
- DAL POZZO, M. *et al.* Activity of essential oils from spices against *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 63, p. 1229–1232, 2011.
- DEMEU, F. A. *et al.* Influência da escala de produção no impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Revista Ceres**, v. 62, p. 167–174, abr. 2015.
- FINHLER, S. *et al.* Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree oil) sobre Agentes Infeciosos Isolados de Bovinos Acometidos por Mastite. **JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA**, v. 1, n. 10, 2020.
- FITZPATRICK, S.; GARVEY, M.; GLEESON, D. A review of test protocols for the evaluation of teat disinfectants. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n.

3, p. 553–563, 2018.

FORSBÄCK, L. *et al.* Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk. **Animal**, v. 3, n. 5, p. 710–717, 2009.

FREIRE, I. C. M. *et al.* Antibacterial activity of essential oils against strains of *Streptococcus* and *Staphylococcus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 372–377, 2014.

FREITAS, C. H. *et al.* Identificação e perfil de suscetibilidade antimicrobiana de bactérias causadoras de mastite bovina em propriedades leiteiras de Pelotas, Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, p. 661–666, 2018.

FREITAS, L. M. DE; COSTA, D. S.; MIRANDA, M. L. ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS. **HORIZONTES DA BIOTECNOLOGIA**, p. 47, 2022.

FURLANI, R. *et al.* ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST PATHOGENS OF IMPORTANCE IN CAPRINE AND OVINE MASTITIS. **Revista Caatinga**, v. 34, n. 3, p. 702–708, 2021.

GIOPPO, A.; ZANCANARO, V.; BELLAVER, E. H. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* frente a isolados multirresistentes produtores de ESBL e KPC causadores de infecções hospitalares. **Biotemas**, v. 32, n. 3, p. 35–42, 2019.

GODDEN, S. M. *et al.* Randomized noninferiority study evaluating the efficacy of a postmilking teat disinfectant for the prevention of naturally occurring intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 3675–3687, maio 2016.

GONÇALVES, J. L. *et al.* Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. **Livestock Science**, v. 210, p. 25–32, 2018.

GUSTAFSON *et al.* Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 194–198, 1998.

HALL, M. C. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais Nerol e *Melaleuca* puros e microencapsulados. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 3, p. 5331–5345, 2020.

KUROSAWA, L. S. *et al.* Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. associados a mastite bovina. **Pubvet**, v. 14, p. 138, 2020.

LOPES, K. S. *et al.* Identification of bioactive compounds and cytogenotoxicity of the essential oil from the leaves of *Croton heliotropiifolius* Kunth. **JOURNAL OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH-PART A-CURRENT ISSUES**, v. 85, n. 24, p. 1002–1018, 17 dez. 2022.

LOPES, M. A. *et al.* Influência da contagem de células somáticas sobre o impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 493–499, 2020a.

LOPES, T. S. *et al.* Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. **Research in veterinary science**, v. 131, p. 186–193, 2020b.

MARTINS, J. A. S. *et al.* Avaliação do efeito do óleo de melaleuca sobre o crescimento micelial in vitro de fungos fitopatogênicos. **Biosci. j.(Online)**, p. 49–51, 2011.

MASSOTE, V. P. *et al.* Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária do Sul de Minas-ISSN: 2674-9661**, v. 1, n. 1, p. 41–54, 2019.

MEDEIROS, E. S. DE *et al.* In vitro evaluation of the efficacy of commercial disinfectants used in pre and post-dipping against *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 71–75, 2009.

MOREIRA, M. A. S. *et al.* Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 1307–1314, 2008.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301–307, jun. 2008.

PEROBELLI, F. S.; ARAÚJO, I. F. DE; CASTRO, L. S. DE. As dimensões espaciais da cadeia produtiva do leite em Minas Gerais. **Nova Economia**, v. 28, n. 01, p. 297–337, 2018.

POZZATTI, P. *et al.* Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils: Activity of essential oils against *Candida* species. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 12–15, jan. 2010.

RAMOS, F. S. *et al.* Importância do diagnóstico de mastite subclínica e seus impactos econômicos nas propriedades leiteiras-revisão da literatura. **Revista Coleta Científica**, v. 1, n. 1, p. 17–27, 2017.

RIBEIRO, M. G. *et al.* Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from bovine mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 724–731, 2006.

SHELLES, J. L. *et al.* Uso de extrato de própolis como agente antisséptico para pré e pós dipping em vacas leiteiras. **Agrarian**, v. 14, n. 51, p. 95–101, 15 mar. 2021.

SILVA, M. M. DA; MARTINS FILHO, L. P. Análise econômica da mastite no rebanho leiteiro. **Encontro Acadêmico de Produção Científica do Curso de Medicina Veterinária**, 2017.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. [s.l.] Artmed Editora, 2016.

SPERANDIO, J. *et al.* Atividade antimicrobiana e citotoxicidade in vitro do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. visando à aplicação no controle da mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 4, p. 1251–1259, 2019.

TARIQ, S. *et al.* A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 134, p. 103580, 2019.

TOMANIĆ, D. *et al.* Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of Two Different Essential Oils Against Mastitis Associated Pathogens. **Acta Veterinaria**, v. 72, n. 1, p. 45–58, 1 mar. 2022.

TOZZETTI, D. S. *et al.* Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas—revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 6, n. 10, p. 1–7, 2008.

TRONCO, V.M., V., Maria. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. UFSM, , 2010.

WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 7, p. 643–646, jul. 2005.

ZAFALON, L. F. *et al.* Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 577–585, 2007.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E. M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc & Ciência-ACBS**, v. 1, n. 1, p. 65–70, 2010.

ZHAN, K. *et al.* The protective roles of tea tree oil extracts in bovine mammary epithelial cells and polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2020.

ZIMERMANN, K. F.; ARAUJO, M. E. M. Mastite bovina: agentes etiológicos e susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista Campo Digital**, v. 12, n. 1, 2017.