

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**MASTITE BOVINA E CAPRINA: SUSCETIBILIDADE  
DE ISOLADOS DE *Staphylococcus spp.* FRENTE AOS  
ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE  
CONDIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Marcelo Dal Pozzo**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2010**

**MASTITE BOVINA E CAPRINA: SUSCETIBILIDADE DE  
ISOLADOS DE *Staphylococcus spp.* FRENTE AOS ÓLEOS  
ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE CONDIMENTOS**

**por**

**Marcelo Dal Pozzo**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Bovinocultura Leiteira, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia.**

**Orientador: Prof. Julio Viégas**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2010**

D149m Dal Pozzo, Marcelo, 1978-

Mastite bovina e caprina: suscetibilidade de isolados de *Staphylococcus spp.* frente aos óleos essenciais extraídos de condimentos / Marcelo Dal Pozzo. - 2010.  
69 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2010.

“Orientador: Prof. Julio Viégas”

1. Zootecnia 2. Caprinos 3. Bovinos 4. Mastite 5. Fitoterapia 6. Plantas medicinais I. Viégas, Julio II. Título

CDU: 636.2/.3

Ficha catalográfica elaborada por  
Patrícia da Rosa Corrêa – CRB 10/1652  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**MASTITE BOVINA E CAPRINA: SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS  
DE *Staphylococcus spp.* FRENTE AOS ÓLEOS ESSENCIAIS  
EXTRAÍDOS DE CONDIMENTOS**

elaborada por  
**Marcelo Dal Pozzo**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Julio Viégas, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)**

---

**Sônia de Avila Botton, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 29 de julho de 2010.

## DEDICATÓRIA

A MINHA ESPOSA DEISE, PELA DEMONSTRAÇÃO DE CARINHO E APOIO.

A MINHA FAMÍLIA POR ME INCENTIVAR A PROSSEGUIR NOS ESTUDOS.

*“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza e também mais nos torna conscientes de nossa responsabilidade, é saber que os outros crêm em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos.”*

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir que eu chegasse até aqui, proporcionando-me saúde, e principalmente, à iluminação do Espírito Santo, que sempre me acompanhou durante a pesquisa, me guiando pelo caminho mais correto.

A minha sogra Cléris e ao meu sogro Janio, por me ouvirem nos momentos difíceis, pela ajuda financeira durante esse tempo de realização do mestrado.

As minhas irmãs Tercila e Marta, foram minhas professoras no ensino primário, por seus ensinamentos fundamentais na base de conhecimentos.

Ao meu orientador, Professor Doutor Julio Viégas, um ser humano com qualidades invejáveis: obrigado por todos os teus ensinamentos, por tua disponibilidade, paciência, amizade, compreensão, confiança...

Ao Professor Sydney Hartz Alves, pela amizade e por todo suporte laboratorial e recursos disponibilizados para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Professor Mateus Matiuzzi e as Professoras Agueda Castagna de Vargas e Sônia de Avila Botton por acreditarem no meu trabalho e contribuírem com materiais e conhecimentos para realização da pesquisa.

As colegas do LAPEMI, em especial a Luana Rossato e Isaura Soares, pela dedicação do tempo auxiliando no desenvolvimento do experimento.

Ao amigo Érico Loreto, pela generosidade, sempre compartilhou seus conhecimentos.

Aos meus colegas de mestrado e amigos que estiveram ao meu lado na luta para obter o título de Mestre em Zootecnia.

Ao Professor Paulo Roberto Nogara Roratto, coordenador do curso de Pós-Graduação em Zootecnia e a Secretária Sr<sup>a</sup> Olirta Giuliani, pela organização do curso e auxílio.

Enfim, obrigado a todos, mesmo àqueles que não tenham sido citados, mas que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa e que acreditaram e torceram pela minha vitória.

A CAPES pelo apoio financeiro, concedendo bolsa de pesquisa.

## RESUMO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

### **MASTITE BOVINA E CAPRINA: SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Staphylococcus spp.* FRENTE AOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE CONDIMENTOS**

Autor: Marcelo Dal Pozzo

Orientador: Julio Viégas

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de julho de 2010.

Avaliou-se a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OEs) de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (lipia), *Zingiber officinale* (gingibre), *Salvia officinalis* (sálvia), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Ocimum basilicum* (manjeriço), bem como as frações majoritárias carvacrol, timol, cinamaldeído e cineol frente a 65 isolados de *Staphylococcus spp.* Destes isolados 33 eram oriundos de rebanhos leiteiros de caprinos, sendo 27 isolados classificados como coagulase negativa e 06 isolados classificados como coagulase positiva. Os isolados oriundos de rebanhos leiteiros bovinos somavam 32 e classificados como coagulase positiva. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas para cada isolado utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo. Os OEs de gengibre, salvia, alecrim, manjeriço e a fração majoritária cineol não evidenciaram nenhuma atividade inibitória sobre *Staphylococcus spp.* Observou-se atividades antimicrobianas inferiores ou igual à máxima concentração testada ( $6400 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) para os OEs de orégano, lipia, tomilho, canela, bem como para as frações majoritárias de carvacrol, timol e cinamaldeído. Observou-se que os OEs de orégano, lipia e tomilho apresentaram atividades similares e foram mais ativos que o OE de canela frente os isolados de bovinos. O mesmo efeito, em isolados de caprinos, não foi repetido para o OE de lipia, sendo que este se apresentou menos ativo que os OEs de canela, orégano e tomilho. O carvacrol destacou-se por manter forte atividade antimicrobiana sobre isolados de bovinos e caprinos (CIMs =  $584 \mu\text{g ml}^{-1}$  e  $767 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; CBMs =  $732 \mu\text{g ml}^{-1}$  e  $1471 \mu\text{g ml}^{-1}$  respectivamente para bovinos e caprinos).

Palavras-chave: atividade antimicrobiana; fitoterapia, plantas medicinais

## ABSTRACT

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

### **COW AND GOAT MASTITIS: SUSCETIBILITY OF *Staphylococcus sp.* AGAINST ESSENTIAL OILS EXTRACTED FROM SPICES**

Author: Marcelo Dal Pozzo

Advisor: Julio Viégas

Santa Maria, July 29, 2010.

Here we have evaluated the antimicrobial activity of the essential oils from *Origanum vulgare* (oregano), *Thymus vulgaris* (thymus), *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamom), *Lippia graveolens* (mexican oregano), *Zingiber officinale* (ginger), *Salvia officinalis* (sage), *Rosmarinus officinalis* (rosemary) and *Ocimum basilicum* (basil), as well as the majoritary constituents carvacrol, thymol, trans-cinnamaldehyde and cineole against 65 isolates of *Staphylococcus sp.* isolates. From these 33 isolates were obtained from dairy herds of goats being 27 isolates classified as coagulase negative staphylococci and 06 isolates classified as coagulase positive staphylococci. The isolates from dairy cattle were 32 and classified as coagulase-positive staphylococci. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined to each isolate by using broth microdilution method. Lower antimicrobial activity or equal to the maximum tested ( $6400 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) were observed on the essential oils of oregano, mexican oregano, thymus, cinnamom as well as to majoritary constituents of carvacrol, thymol and TC. It was noticed that the essential oils of oregano, mexican oregano and thymus presented similar activities and were more active than the essential oil of cinnamon front isolates of cattle. The same effect was not repeated on essential oil of mexican oregano in isolates of goats and presenting itself more active than the essential oil of cinnamom, though less active than essential oils of oregano and thyme. The carvacrol maintained strong antimicrobial activity on isolates of cows and goats (CIMs =  $584 \mu\text{g ml}^{-1}$  e  $767 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; CBMs =  $732 \mu\text{g ml}^{-1}$  e  $1471 \mu\text{g ml}^{-1}$  to cows and goats respectively).

Key words: antimicrobial activity, phytotherapy, medicinal plants

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>CAPITULO 1 - ESTUDO BIBLIOGRÁFICO .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Mastite em bovinos e caprinos.....</b>	<b>12</b>
1.1.1 Agentes etiológicos da mastite .....	12
1.1.2 <i>Staphylococcus</i> coagulase positivas (SCP) .....	14
1.1.3 <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCN).....	15
1.1.4 - Resistência de estafilococos frente aos antimicrobianos.....	15
1.1.5 Considerações sobre tratamento das mastites.....	17
<b>1.2 Óleos essenciais .....</b>	<b>18</b>
1.2.1 Utilização de fitoterápicos na produção animal .....	19
<b>1.3 Plantas condimentares e o potencial antimicrobiano de seus óleos essenciais.....</b>	<b>21</b>
1.3.1 <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela).....	22
1.3.2 <i>Lippia graveolens</i> (lipia) .....	22
1.3.3 <i>Ocimum basilicum</i> (manjeriçã).....	23
1.3.4 <i>Origanum vulgare</i> (orégano) .....	23
1.3.5 <i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim) .....	24
1.3.6 <i>Salvia officinalis</i> (sálvia) .....	25
1.3.7 <i>Thymus vulgaris</i> (tomilho) .....	25
1.3.8 <i>Zingiber sp.</i> (gingibre) .....	26
<b>CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS FRAÇÕES MAJORITÁRIAS FRENTE A <i>Staphylococcus sp.</i> ISOLADOS DE MASTITE BOVINA.....</b>	<b>27</b>
Resumo .....	28
Abstract.....	29
Introdução.....	29
Material e Métodos .....	31
Resultados e Discussão.....	33
Conclusões.....	36

Bibliografia.....	37
<b>CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS FRAÇÕES MAJORITÁRIAS FRENTE À <i>Staphylococcus sp.</i> ISOLADOS DE MASTITE CAPRINA. ....</b>	<b>42</b>
RESUMO .....	43
ABSTRACT .....	44
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
CONCLUSÕES .....	51
BIBLIOGRAFIA .....	52
<b>CAPÍTULO 4 - DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>

## INTRODUÇÃO

Mastite é definida como a inflamação da glândula mamária; na maioria dos casos é causada por bactérias, resultando em perdas na lactação e trazendo prejuízos econômicos para a indústria leiteira. O aumento nos custos da produção leiteira está associado à eliminação de animais, tratamentos, redução na qualidade do leite ou mesmo seu descarte (HUIJPS et al., 2010). A perda econômica mundial foi estimada em US \$ 35 bilhões anuais (WELLENBERG et al., 2002).

As mastites podem ser classificadas, quanto à origem, em contagiosa ou ambiental. A forma contagiosa envolve patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, enquanto patógenos ambientais como *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, e *Streptococcus uberis* são oriundos principalmente de fezes, poças de água, pastagens e solo. As bactérias ganham acesso à glândula mamária, com maior frequência, durante e após a ordenha, quando ocorrem flutuações de vácuo em equipamentos de ordenha mal regulados e quando o esfíncter muscular do canal intramamário estiver relaxado (PHILPOT, 1979; NICKERSON, 2009).

A infusão intramamária de antibióticos é o método de tratamento mais comum e disponível para tratamento de mastite. Entretanto, as taxas de cura obtidas com antibióticos são, geralmente, insatisfatórias e dependem muito dos patógenos envolvidos (EBERHART, 1986; DINGWELL et al., 2003). O uso de agentes antibacterianos em animais, incluindo os casos de mastites, pode determinar a emergência de bactérias resistentes (BERGHASH et al., 1983; PYORALA ; TAPONEN, 2009). Em adição, o uso destes fármacos tem sido fonte de resíduos de antibióticos no leite (ERSKINE et al., 2003). Devido aos problemas mencionados com o uso fármacos antibacterianos, novas alternativas terapêuticas têm sido pesquisadas para controlar a mastite no rebanho leiteiro. Assim, VARGAS et al., (2004) pesquisaram a atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis frente a isolados de mastite bovina. Também, BASKARAN et al., (2009) pesquisaram a atividade antimicrobiana de frações majoritárias derivadas de plantas como timol, carvacrol, eugenol e cinamaldeído.

Os OEs, derivados de plantas utilizadas como condimentos, representam um grupo de antimicrobianos naturais que têm sido tradicionalmente usados na preservação de alimentos ou para acentuar gosto ou aroma destes. Os OEs constituem-se em complexas misturas de

substâncias voláteis, geralmente lipofílicas (SIMÕES ; SPITZER, 1999), cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, em diferentes concentrações, nos quais, um composto farmacologicamente ativo é majoritário. Assim, no orégano, temos o carvacrol (3 a 17%); no tomilho, o timol (40%) e, na canela, o cinamaldeído (75%) (FARMACOPEA ITALIANA, 1998). Os OEs extraídos de orégano, tomilho canela, entre outros, têm potencial antimicrobiano significativo (KALEMBA et al., 2002; BURT ; REINDERS, 2003; POZZATTI et al., 2010); todavia, a maioria das publicações estabelece generalizações sobre estas atividades frente a bactérias gram positivas, gram negativas, fungos, incluindo limitado número de representantes de cada espécie (SMITH-PALMER et al., 1998; HAMMER et al., 1999). Com esta perspectiva, é fundamental avaliar, à luz de técnicas microbiológicas modernas e padronizadas, a atividade de óleos essenciais sobre *Staphylococcus spp.*, um dos principais patógenos causador de mastites em rebanhos leiteiros. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a susceptibilidade de isolados de *Staphylococcus spp* de origem caprina e bovina, frente aos OEs extraídos de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (lipia), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (sálvia), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Zingiber officinale* (gengibre) e as frações majoritárias carvacrol, timol, cinamaldeído e cineol.

## OBJETIVOS

### **Geral :**

Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, lipia, canela, tomilho, alecrim, gengibre, sálvia, manjeriço; bem como das frações majoritária de carvacrol, timol, cinamaldeído e cineol frente a isolados de *Staphylococcus spp.* causadores de mastite em bovinos e caprinos.

### **Específicos:**

- 1) Determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações bactericida mínimas (CBMs) *in vitro*, dos óleos essenciais de orégano, lipia, canela, tomilho, alecrim, gengibre, sálvia, manjeriço e das frações majoritárias carvacrol, timol, cinamaldeído e cineol frente isolados de *Staphylococcus spp.*, causadores de mastite em bovinos e caprinos.
- 2) Comparar as atividades antimicrobianas dos óleos essenciais testados frente a isolados de *Staphylococcus spp.* de bovinos e caprinos;
- 3) Comparar as atividades antimicrobianas das frações majoritárias; determinando uma ordem do mais ativo para o menos ativo.
- 4) Comparar a susceptibilidade, aos óleos essenciais e suas frações majoritárias, de grupos formados por espécies de *Staphylococcus spp.* e do perfil de resistência a agentes antibacterianos.

# CAPITULO 1

## ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

### 1.1 Mastite em bovinos e caprinos

Mastite é a denominação do processo de inflamação na glândula mamária. Caracteriza-se por alterações no tecido glandular e no leite, onde a glândula mamária perde a funcionalidade de produzir leite (FIGUEIREDO, 1995; NICKERSON, 2009). As causas predisponentes da enfermidade são a alta atividade de produção no úbere, retenção de leite, ferimentos externos ou a falta de higiene (THORBERG et al., 2009).

A mastite é a doença que mais causa perdas econômicas na produção animal, são estimadas em USD 35 bilhões/ano no mundo (WELLENBERG, et al., 2002). O leite mastítico apresenta-se com elevado número de células somáticas, reduzidos teores de caseína e gordura, aumento nos teores de sódio e cloro (HUIJPS et al., 2008; FIGUEIREDO, 1995). As alterações no leite, causados pela mastite são responsáveis pela redução no rendimento industrial, baixa qualidade dos produtos fermentados como iogurtes, queijos e redução no período de validade dos derivados lácteo. (PRESTES et al., 2003). É uma doença de difícil controle e responsável por causar grandes prejuízos econômicos para a indústria leiteira (PYORALA, 2009).

#### 1.1.1 Agentes etiológicos da mastite

As bactérias do gênero *Staphylococcus spp*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp.*, *Corynebacterium bovis* são agentes etiológicos da mastite contagiosa em rebanhos leiteiros de bovinos e caprinos. É no animal que encontram seu habitat natural, multiplicam-se nos tecidos da glândula mamária e no leite. Essas bactérias são transmitidas de animais infectados para animais saudáveis (PRESTES et al., 2003; PHILPOT ; NICKERSON, 2002). Os rebanhos leiteiros infectados com microrganismos apresentam tendência de elevado número de manifestações subclínicas, casos de mastite com tendência à cronicidade e

alta contagem de células somáticas (CCS) no leite ordenhado (FIGUEIREDO,1995; PHILPOT ; NICKERSON, 2002).

A mastite ambiental é causada por microrganismos que vivem preferencialmente no habitat dos animais, em locais que apresentam preferencialmente dejetos e lama. Os principais grupos de bactérias que vivem no ambiente e causam mastite são coliformes e estreptococos (LARANJA DA FONSECA ; SANTOS, 2000). Entre os coliformes, a *Escherichia coli* é a mais prevalente e grave. Alguns coliformes também produzem endotoxinas que são liberadas com a morte desses microrganismos na glândula mamária. Dependendo da quantidade de toxinas liberadas provocam manifestações clínicas de vermelhidão, febre, dor e inchaço na glândula mamária. Também o leite apresenta-se alterado com contagem elevada de células somáticas. Essas alterações no animal e no leite logo após a infecção são chamadas de manifestações do tipo aguda e também subagudas (LARANJA DA FONSECA ; SANTOS, 2000; BARKEMA et al., 2009). Os microrganismos do ambiente tende os principais agentes etiológicos de mastite em rebanhos com reduzida contagem de células somáticas, onde são adotadas boas práticas de manejo como desinfecção pós-ordenha, terapia da vaca seca, higienização de equipamentos e descarte de animais doentes (PHILPOT ; NICKERSON, 2002).

ALMEIDA et al. (1996) relatam que os *Staphylococcus spp.* são freqüentemente isolados do leite mastítico e são comensais da pele que, por serem oportunistas nas lesões de pele e mucosas, apresentam rápida colonização e posterior invasão para o interior da glândula mamária. Bactérias *Staphylococcus spp.* são reconhecidas como causadoras de doenças piogênicas, tanto em animais como em humanos (BEAN; GRIFFIN, 1990; ARCHER, 1998).

### 1.1.2 *Staphylococcus* coagulase positivas (SCP)

As espécies que constituem o grupo SCP são *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e algumas cepas de *Staphylococcus sp.* Essas espécies podem produzir a enzima coagulase, conferindo maior importância clínica devido a seus fatores de patogenicidade (ABDURAHMAN et al. 1995). O *Staphylococcus aureus* inicialmente coloniza a pele lesada de tetos e canal do teto, depois lesa cisternas das glândulas mamárias, em seguida as bactérias passam para o sistema de ductos e formam “bolsões” profundos (focos) de infecção nos tecidos secretores de leite. Este processo é seguido por formação de abscessos e

envelopamento das bactérias, sendo o fenômeno de envelopamento um mecanismo de defesa para isolar as bactérias e mantê-las localizadas, mas resulta na formação de tecido fibroso que é responsável pela baixa resposta aos antibióticos (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

### 1.1.3 *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN)

Esse grupo é composto por mais de 20 espécies, sendo que as mais comuns são *S. chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri* e algumas cepas de *Staphylococcus hyicus*; habitam normalmente a pele de tetos sadios e as mãos dos ordenhadores. As infecções geralmente são brandas e raramente são observados sinais clínicos nos animais acometidos (PHILPOT ; NICKERSON, 2002). VIRDIS et al. (2010) relatam que nos casos de mastite subclínica de cabras leiteiras, as bactérias SCN correspondem a valores que variam de 44% a 95,9% dos patógenos isolados em lactoculturas.

### 1.1.4 Resistência de estafilococos frente aos antimicrobianos

De acordo com VIRDIS et al., (2010), *Staphylococcus aureus* é a bactéria causadora de mastite de tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antibacterianos. A relação entre o uso de antimicrobianos e a seleção e disseminação de cepas resistentes é aceito internacionalmente e foi descrita pela primeira vez por Lepper em 1954 APUD (NOVAK, 1999; FREITAS et al., 2005).

*Staphylococcus aureus* possui vários fatores de virulência que contribuem para a sua persistência no tecido mamário, como produção de toxinas extracelulares e enzimas (LEE et al., 2003). Os *Staphylococcus aureus* aderem às células endoteliais por meio de receptores de adesinas e são fagocitados. No ambiente intracelular os *Staphylococcus aureus* são protegidos dos mecanismos de defesa do hospedeiro, assim como dos efeitos das drogas antibacterianas. Estes fatores podem aumentar a sobrevivência bacteriana contribuindo para o desenvolvimento de infecção persistente ou recorrente (HAMILL et al., 1986; LOWY, 1998).

As diversas espécies de *Staphylococcus* destacam-se pela capacidade de se tornarem resistentes a grande número de drogas antibacterinas. VIRDIS et al., (2010), SCHOENFELD;

MCKAY, (2010), FERREIRA et al., (2006) associaram o agravamento da resistência bacteriana ao uso freqüente e indiscriminado de drogas antibacterianas e também, aos mecanismos de transferência de resistência entre os microrganismos. Este fato é comumente observado no campo em surtos de mastite (BRITO et al., 2001).

Os antimicrobianos beta-lactâmicos são os antimicrobianos mais empregados no tratamento de mastites causadas por *Staphylococcus spp.* em rebanhos leiteiros (PYORALA, 2009). No Brasil, mais de 70% das cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* mostram-se resistentes às penicilinas, o primeiro beta-lactâmico usado para tratar mastite. O uso destes antimicrobianos não é mais indicado em infecções por estes microrganismos (COSTA et al., 1994).

#### a) Produção de enzimas beta-lactamases

Os estafilococos podem produzir penicilinase, sintetizada após exposição aos beta-lactâmicos, que hidrolisam o anel beta-lactâmico e inativam o antimicrobiano. Esta enzima é codificada pelo gene *blaZ*, sendo regulada por dois genes : *blaR1* (antirepressor) e *blaI* (repressor). De ocorrência, estes isolados fazem hiperprodução de beta-lactamase capaz de degradar a oxacilina (ROSSI ; ANDREAZZI, 2005). Também, é de ocorrência rara a apropriação de plasmídeos de bactérias gram-positivas, como a TEM-1 e a SHV-1 que tornam cepas de estafilococos em produtoras de variantes enzimáticas e assim passam a conferir resistência a beta-lactâmicos mais modernos (ROSSI ; ANDREAZZI, 2005; VIRDIS, et al., 2010).

#### b) Resistência clássica a oxacilina

Este mecanismo de resistência está relacionado a alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs); sendo essas proteínas sítios onde os antimicrobianos beta-lactâmicos ligam-se e desenvolvem ação antimicrobiana, impedindo a formação da parede celular das bactérias (SCHNELLMANN et al., 2006).

A proteína PBP2a é uma proteína alterada, codificada pelo gene *mecA*, que apresenta baixa afinidade por agentes antimicrobianos com anel beta-lactâmico. As cepas de *Staphylococcus spp.* que apresentam PBP2a são resistentes à oxacilina; por outro lado a sensibilidade a oxacilina é relacionada a ausência da PBP2a mesmo que o gene *mecA* esteja presente em determinadas cepas de *Staphylococcus spp.* (COLLI et al., 2009; VIRDIS et al., 2010)

Esta resistência proporciona às amostras de *Staphylococcus spp.* uma vantagem seletiva para a colonização e infecção, pois se trata de um microrganismo resistente à maioria dos antimicrobianos usualmente disponíveis para o tratamento de estafilococcias, tais como:

$\beta$ - lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, quinolonas, sulfametoxazol-trimetoprima e outros (STRUELLENS *et al.*, 1992; VIRDIS *et al.* 2010).

### c) Biofilmes

Os estafilococos são capazes de produzir um mucopolissacarídeo extracelular amorfo (*slime*) que permite a agregação bacteriana, levando à formação de um verdadeiro filme biológico. A síntese de *slime* é controlada pelo operon *ica* (intercellular adhesion) (CIFTCI *et al.*, 2009). Os genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* são encontrados no locus *ica* de *Staphylococcus aureus*; o gene *icaA* codifica N-acetylglucosaminyltransferase e o gene *icaD* tem importante papel na expressão desta enzima que é responsável pela síntese de polissacarídeos intracelular, precursor do *smile*; *icaA* e *icaD* apresentam alta prevalência entre *S.aureus* isolados de mastite (VASUDEVAN *et al.*, 2003; CIFTCI *et al.*, 2009).

A produção do biofilme favorece a colonização desta bactéria nas superfícies plásticas e nos tecidos do hospedeiro; esta aderência é controlada por interações hidrofóbicas entre as bactérias e estas superfícies (NOVAK, 1999). Os estafilococos são hábeis formadores de biofilme, exibem uma elevada resistência a antibacterianos e ao sistema de defesa do hospedeiro (KWIECINKI *et al.*, 2009).

### 1.1.5 Considerações sobre tratamento das mastites

Um programa efetivo de controle de mastites deve basear-se principalmente nas medidas de prevenção. Mas é importante a utilização da terapia, com objetivo de auxiliar as defesas específicas e inespecíficas do animal na eliminação do microrganismo invasor. A adoção da antibioticoterapia para mastite deve visar à eficácia terapêutica e os benefícios econômicos (COSTA, 1998; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

A penetração de substâncias na glândula mamária, por meio do leite quando administrado parentalmente ou absorção e distribuição por meio do úbere quando em infusão intramamária, dependem das características farmacocinéticas como solubilidade lipídica, grau de ionização, da quantidade de ligações com o soro e proteínas do úbere e do tipo de veículo (WAGNER *et al.*, 2009).

A farmacodinâmica é outro aspecto que deve ser considerado. O leite não deve interferir na atividade antimicrobiana, como acontece com macrolídeos, tetraciclina e trimetoprim – sulfonamidas que tem reduzida atividade no leite (LOUHI *et al.*, 1992; FANG;

PYORALA, 1996). Para atingir os patógenos em questão é preferível selecionar substâncias com baixo valor para concentração inibitória mínima (CIM), particularmente quando o antimicrobiano é administrado sistemicamente. É preferível que o antimicrobiano usado no tratamento da mastite tenha ação bactericida porque a fagocitose é reduzida na glândula mamária (SORDILLO et al., 2009).

Atualmente a recomendação internacionalmente aceita é efetuar o tratamento da mastite subclínica na última ordenha, no final da lactação do animal, ao iniciar-se o período seco. Este esquema é popularmente conhecido como “terapia da vaca seca” (PYORALA, 2009). Para esta finalidade são empregados antimicrobianos formulados em veículos de eliminação lenta e absorção lenta que permitem tempo prolongado de persistência do antimicrobiano nas glândulas tratadas (COSTA, 1998). A taxa de novas infecções no período seco de vacas não tratadas é quatro vezes maior do que vacas tratadas (PHILPOT; NICKERSON, 2002). O tratamento no período de secagem é eficiente tanto por via sistêmica quanto por via intramamária; também com o tratamento nesse período diminuí-se o risco de eliminação de resíduos no leite (COSTA, 1998; PYORALA, 2009).

## 1.2 Óleos essenciais

Óleos essenciais, conforme a ISO 9235:1997 (International Standard Organization), são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos pelo processamento mecânico dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, normalmente odoríferas e líquidas (ISO 9235, 1997; SIMÕES et al., 1999). Entre os constituintes dos óleos essenciais, podem ser encontrados hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos (SIMÕES et al., 1999). As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais estão descritas em diversos estudos; por outro lado, os mecanismos de ação destes compostos e seus constituintes não estão totalmente estabelecidos (POZZATTI, 2008). DORMAN ; DEANS (2000) sugerem que a maioria dos óleos essenciais exerça sua atividade antimicrobiana através de modificações na estrutura da parede celular do microrganismo; com a alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática pela modificação no gradiente de íons de hidrogênio ( $H^+$ ) e potássio ( $K^+$ ). Desta forma, ocorre perda do controle quimiosmótico da célula e a conseqüente morte do

microrganismo. LAMBERT et al. (2001), demonstraram que timol e carvacrol (monoterpenos presentes nos óleos essenciais do orégano) acumularam-se na membrana celular de *P. aeruginosa* e *S. aureus* resultando no aumento da permeabilidade em 90% das células destes microrganismos.

### 1.2.1 Utilização de fitoterápicos na produção animal

As drogas antibacterianas promovem importantes ganhos na produção de animais; porém o temor de consumidores frente à detecção de bactérias multi resistentes, resíduos deixados nos produtos de origem animal provocaram o banimento de muitos antibióticos na produção animal (BASKARAN, et al., 2009). Óleos essenciais, como alternativas aos antimicrobianos, são reconhecidos pelo Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos e por comissões da União Européia (UE) como substâncias seguras para animais e seres humanos (DOMADIA et al., 2007).

#### a) Modificadores da fermentação microbiana ruminal

Os antibacterianos ionóforos são utilizados para inibir microrganismos específicos do rúmen; bactérias anaeróbicas fermentadoras de carboidratos e proteínas, que causam perdas de energia através da produção de metano e proteína pelo nitrogênio amoniacal. Os antibacterianos ionóforos foram banidos na União Européia desde janeiro de 2006 e diversas pesquisas demonstram *in vitro* o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais (CARDOZO et al., 2006; CASAMIGLIA et al. 2007). Alguns trabalhos *in vivo* confirmam o potencial antimicrobiano e modulador da fermentação ruminal (BENCHAAR et al. 2006; YANG et al., 2007; KUNG et al. 2008; TASSOUL ; SHAVER, 2009) relatam que a adição de óleos essenciais melhoram a eficiência produtiva de vacas leiteiras. No entanto, os trabalhos que investigam os efeitos da adição de óleos essenciais na dieta de bovinos são escassos e recentes (CASAMIGLIA et al., 2007).

#### b) Moduladores da imunidade e desempenho animal

A ausência de toxicidade aos animais é requisito básico para que óleos essenciais sejam utilizados em rações de aves e suínos (BRUGALI, 2003). O mesmo se aplica as demais espécies de animais, misturas de óleos essenciais específicos, compostos por frações majoritárias como carvacrol e timol, apresentam atividades antimicrobianas seletivas a microrganismos patogênicos (LEE et al., 2004).

Algumas misturas de óleos essenciais apresentam resultados promissores, reduzindo a colonização e proliferação de *Clostridium perfringens* no intestino de frangos (MITSCH et al., 2004); controle de infecções causadas por coccídios (GIANNENAS et al., 2003; SAINI et al., 2003a); redução de casos de enterite necrótica (SAINI et al., 2003b). O estudo conduzido por MANZANILLO et al., (2001) demonstram que carvacrol estimulou a colonização de *Lactobacillus spp.* no intestino de monogástricos. Além disso, este aumento na microbiota de *Lactobacillus* foi correlacionado com um aumento significativo de ácido butírico intestinal. Conforme BRUGALI et al., (2003) o ácido butírico pode efetivamente excluir bactérias patogênicas.

BRUGALLI et al., (2003) verificaram melhoras na digestibilidade das dietas, de frangos de corte, que tiveram a adição de Blends com 200 ppm dos OEs de orégano, canela e pimenta para dietas controle e dietas com adição de antimicrobiano (10 ppm de avilamicina). O tratamento com óleos essenciais promoveu uma diferença pequena, porém melhor em animais suplementados.

O aumento de enzimas digestivas foi observado por PLATEL; SRINIVASAN, (2000) ao alimentarem animais de laboratório com capsaicina (principal componente ativo dos OEs de pimenta). BRUGALLI et al., (2003) comenta que o aumento das enzimas digestivas como lípase, amilase tripsina melhoraram a digestibilidade dos alimentos.

#### c) Plantas: desenvolvimento de alternativas no tratamento da mastite

Existe uma grande variedade de artigos científicos que foram desenvolvidos *in vitro* e demonstram o potencial antimicrobiano de diversos extratos vegetais. BASKARAN et al., (2009) investigaram a atividade antimicrobianas de alguns óleos essenciais frente a patógenos causadores de mastite bovina; relataram que o cinamaldeído apresentou CIM de 0,1% (v/v). Nessa concentração, o cinamaldeído persistiu ativo no leite inoculado e reinoculado com patógenos por duas semanas, inibindo o crescimento dos patógenos. Os resultados do estudo sugeriram que o cinamaldeído apresentou potencial para ser avaliado como uma alternativa ou um adjuvante, de antibacterianos de infusão intramamária, para tratamento de mastites.

MUKHERJEE et al., (2005) investigaram o potencial imunoterápico do extrato aquoso de folhas *Ocimum sanctum* (L.) (tulase) quando infundido na glândula mamária de vacas com mastite subclínica. Os resultados revelaram redução na contagem total de bactérias (CBT), aumento na quantidade de neutrófilos e linfócitos com evidente atividade fagocítica e índice fagocítico. Similarmente, a quantidade de enzimas lisossomais de células polimorfonucleares (PMNs) tiveram aumentos significativos no leite. Os resultados são

sugestivos de que a tulase possui alguns princípios de atividade biológica, como antibacteriana e imunomodulatória. Também os autores não evidenciaram toxicidade do extrato de tulase glândula mamária.

DE; MUKHERJEE (2008) usaram extrato hidro-metanólico de sementes de *Azadirachta indica* (neem) em infusão intramamária de vacas com mastite clínica. Os autores avaliaram a expressão de citocinas e a atividade de explosão respiratória em células do leite. Os resultados revelaram que o tratamento com o extrato de neem, causou a redução significativa na contagem de células somáticas e o percentual de neutrófilos no leite, leve aumento no percentual de linfócitos, produção de radicais livres pelas células do leite. Após a infusão do extrato de neem, em um grupo de vacas que estavam com mastite e em vacas controle saudáveis foram verificadas a expressão de citocinas (IL-2 e IFN- $\gamma$ ). A mesma expressão de citocinas não foi observada nos grupo de vacas não tratadas com extrato de neem. Os resultados do estudo indicaram que o extrato de neem apresenta potencial antiinflamatório, antibacteriano e imunomodulatório.

POL; RUEG, (2007), VIEGI et al., (2003) relatam que produtores utilizam plantas medicinais para tratamento da mastite em rebanhos leiteiros em dos Estados Unidos da América e na Itália. POL; RUEG, (2007) relatam que utilizar produtos comerciais não autorizados pelo FDA, no tratamento de animais, é infringir a legislação dos EUA. Então produtos como os da *aloe vera* (babosa), utilizado como fitoterápico para humanos, é expressamente proibido no tratamento da mastite em bovinos.

### **1.3 Plantas condimentares e o potencial antimicrobiano de seus óleos essenciais**

De acordo com a Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), nº 12, de 1978, condimentos ou temperos são produtos constituídos de uma ou diversas substâncias sápidas, de origem natural, com ou sem valor nutritivo, empregados nos alimentos com o objetivo de modificar ou exaltar o seu sabor (Resolução CNNPA nº12 de 1978).

### 1.3.1 *Cinnamomum zeylanicum* (canela)

O óleo essencial de canela, bem como a canela em pó, são empregados na preparação de alguns medicamentos na área farmacêutica. Esta planta apresenta propriedade estomáquica, carminativa e emenagoga (SOUZA et al, 1991). Seu óleo essencial é rico em cinamaldeído, acompanhado do ácido cinâmico, eugenol e linalol (LORENZI; MATOS, 2002).

POZZATTI et al., 2008 encontraram 93,3% de (z)-isoeugenol no óleo essencial de canela, inibindo diversos isolados de *Candida spp.* nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) que variaram de 800-1600  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . BASKARAN et al., (2009) verificaram que o cinamaldeído, presente em alguns óleos essenciais de canela, apresentou CIMs variando de 0,05 a 0,1% (v/v) e CBMs variando de 0,4 a 0,45% (v/v) frente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* isolados de mastite bovina. O eugenol, outro componente químico encontrado no óleo essencial da canela também demonstrou atividade antimicrobiana, com CIMs e CBMs iguais ou maiores de 0,4% (v/v).

### 1.3.2 *Lippia graveolens* (lipia)

*Lippia graveolens*, pertence à família das Verbenaceae, popularmente denominada lipia, cultivada em alguns países da América central, México e nos estados do Texas e Novo México dos Estados Unidos, está documentado na Farmacopéia Mexicana e nos registros do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA) (CÁCERES, 1999). A composição dos óleos essenciais de *L. graveolens* coletada na Guatemala foram estudadas e caracterizadas pelo alto conteúdo de monoterpênóides (70,0 a 87,2%) (SALGUEIRO et al, 2003).

Em um óleo essencial de lipia composto por carvacrol (56,8%), *o*-cymene (32,2%) apresentou forte atividade antifúngica, frente diversas espécies de *Candida spp.*, com CIMs  $\leq$  800  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (POZZATTI et al., 2008). NOSTRO et al. (2007) não observam diferenças de atividade antimicrobiana entre carvacrol e timol quando testados frente a isolados de *Staphylococcus aureus*. Conforme LAMBERT et al (2001) carvacrol e timol não agem em sinergismo na atividade antimicrobiana.

### 1.3.3 *Ocimum basilicum* (manjeriço)

Pertencente à família Lamiaceae, é também conhecido como alfavaca, apresenta propriedades medicinais como analgésica, antitérmica, antiséptica, digestiva, emenagoga, expectorante, sedativa ([www.plantamed.com.br](http://www.plantamed.com.br)). O óleo essencial de manjeriço, obtido das partes aéreas de *Ocimum basilicum* L., foi analisado por cromatografia, evidenciando os seguintes componentes: linalol (31,22%), 1-8 cineol (23,61%), canfora (12,80%) e eugenol (8,08%) (POZZATTI et al., 2008). Os autores não evidenciaram nenhuma atividade antifúngica desse óleo essencial frente a diversas espécies de *Candida*.

SARTORATTO et al., 2004 avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial do manjeriço frente a cepa de *Staphylococcus aureus* (CCT2740). O óleo essencial composto por linalol (32,6%), eugenol (28,1%), canfora (10,1%),  $\alpha$ -terpineol (3,9%) apresentou CIM= 0,7 mg/ml. O eugenol, que está presente em alguns óleos essenciais do manjeriço, apresentou CIMs que variaram de 0,4 – 0,8% (v/v) e CBMs de 0,4 – 0,8% (v/v), sendo ativo semelhantemente ao carvacrol e timol quando testados frente a grupos de *Staphylococcus*, *E. coli* e *Streptococcus* causadores de mastite bovina (BASKARAN et al., 2009). A atividade antimicrobiana em óleos essenciais de manjeriço pode ser pela presença de linalol, que foi evidenciada por QUEIROGA et al., (2007) quando utilizaram o óleo extraído de *Bursera aloexylon* composto por linalol (96,7%), este apresentou forte atividade antimicrobiana em CIMs frente a *Rhodococcus equi* de (0.60 mg/ml) e *Staphylococcus epidermidis* (0.15 mg/ml).

### 1.3.4 *Origanum vulgare* (orégano)

Pertence à família Lamiaceae, é originária do mediterrâneo, também conhecida como manjerona brava. As propriedades medicinais são expectorantes, antioxidante, diurética, antiséptica, emenagoga, calmante e tônico digestivo (CÁCERES, 1999). Seu óleo essencial é rico em carvacrol, timol e terpineol, sendo que os compostos fenólicos carvacrol e timol possuem os níveis mais altos de atividade contra bactérias (SIVROPOULOU et al, 1996; ELGAYYAR et al, 2001).

NOSTRO et al., (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana, do óleo essencial de

orégano e das frações majoritárias de carvacrol ( $\geq 97\%$ ) e timol ( $\geq 99\%$ ), frente isolados de *S. aureus* e *S. epidermidis* formadores de biofilmes. O óleo essencial de orégano estava composto por carvacrol e timol (14 e 24,7%, v/v, respectivamente) e seus dois precursores  $\gamma$ -terpinene e  $\rho$ -cimene (11,7 e 14,6%, v/v, respectivamente). Observaram que na maioria dos grupos testados, as concentrações de inibição de biofilme (CIB) variaram de 0.125–0.5 % (v/v), para o orégano e 0.031 – 0.125 % (v/v), para o carvacrol e timol. Enquanto que as concentrações de eliminação do biofilme (CEB) variaram de 0.25–1.0 % (v/v), para o orégano, 0.125 – 0.5 % (v/v), para o carvacrol e timol respectivamente. SANTURIO et al., (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela. O óleo essencial de orégano, de composição química desconhecida, apresentou forte atividade antimicrobiana (CIM média = 529  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e CBM média= 661 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) frente a diversos sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola.

### 1.3.5 Rosmarinus officinalis (alecrim)

Pertencente à família Lamiaceae, é originária de países do mediterrâneo, é também cultivada no Brasil. Entre as propriedades medicinais é conhecida a antiséptica.

Foram identificados 33 compostos químicos no óleo essencial de alecrim; os principais foram  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol, cânfora, verbenona e borneol, constituindo cerca de 80% do total do óleo (SANTOYO et al., 2005).

FU et al., (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim constituído por 1-8 cineol (27,23%),  $\alpha$ -pinene (19,43%), canfora (14,26%), canfene (11,52%), borneol (3,17%). Verificaram que as cepas de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram inibidas em concentrações de 0,250 % (v/v) e 0,125 % (v/v), respectivamente. POZZATTI et al. (2008) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de alecrim constituído por 1-8 cineol (23,61%), canfora (26,31%),  $\alpha$ -pinene (19,81%), canfene (11,76%), limonene (5,41%). Os autores não evidenciaram atividade antifúngica do óleo essencial de alecrim frente a diversas cepas *Candida spp.*

### 1.3.6 *Salvia officinalis* (sálvia)

Seu óleo essencial é rico em terpenóides como tujona, cineol, cânfora, borneol, ácido ursólico (LORENZI; MATOS, 2002). POZZATTI et al. (2008) procuraram a atividade antifúngica do óleo essencial de sálvia composto por cis-tujona (40,61%), trans-tujona (15,10%), canfora (13,9%), 1-8 cineol (7,54%),  $\alpha$ -pinene (4,82%), canfene (2,51%), borneol (2,21%). Os autores não evidenciaram atividade antifúngica do óleo essencial da sálvia frente a diversas cepas de *Candida spp.*

DELAMARE et al. (2007) encontraram atividade antimicrobiana do óleo essencial de sálvia constituído por  $\alpha$ -tujona (24,8%), 1-8 cineol (14,8%), borneol (11,1%), canfora (10,9%),  $\beta$ -pinene (9,87%),  $\sigma$ -gurjunene (8,2%). Os autores evidenciaram fraca atividade antimicrobiana, com CIMs 5 -10 mg/ml para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*. A atividade antimicrobiana do óleo essencial da sálvia pode ser atribuída à presença de altas concentrações de 1-8 cineol, tujona e canfora (três hidrocarbonetos monoterpênicos) que apresentam atividade antifúngica e antibacteriana (SIVROPOULOU et al., 1997).

### 1.3.7 *Thymus vulgaris* (tomilho)

Pertence à família Lamiaceae, originária dos países mediterrâneos, suas propriedades medicinais são anti-diarréica, antigripal, anti-helmíntica, anti-virótica e antimicrobiana. Suas propriedades antimicrobianas estão relacionadas com o elevado teor de timol e carvacrol, compondo 40 a 50% do óleo essencial do tomilho (SIMÕES et al, 1999). ROTA et al., (2008) encontraram timol (57,7%) no óleo essencial de *Thymus vulgaris* e carvacrol (40,1%) no óleo essencial de *Thymus hyemalis*. Os dois quimiotipos apresentaram atividades antimicrobianas semelhantes, em CIMs e CBMs <0,2  $\mu$ l/ml frente às bactérias *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*.

POZZATTI et al., 2008 encontraram na composição do óleo de tomilho composto por 64%  $\gamma$ -terpinene, timol (21 %), *o*-cimene (14%) e  $\alpha$ -pinene (1%). O óleo essencial apresentou atividade antifúngica frente diversas cepas de *Candida spp.* em CIMs variando de 400-3200  $\mu$ g/ml.

### 1.3.8 *Zingiber sp.* (gengibre)

Os rizomas do gengibre são constituídos de 1% a 2,5% de óleo essencial. Os componentes químicos presentes nos rizomas frescos são responsáveis pelo sabor forte, picante e ação antimicrobiana (LORENZI; MATOS, 2002). POZZATTI et al., 2008 verificaram a atividade antifúngica em um óleo essencial composto por zingiberene (20,81%), sesquifelandrene (10,45%),  $\alpha$ -farnesene (11,36%),  $\alpha$ -curcumene (9,25%), geranial (10,73%), neral (7,53%), canfene (5,65%). Os autores verificaram baixa atividade antifúngica, apenas 10% das cepas de diversas espécies apresentaram CIMs  $\leq$  3200  $\mu$ g/ml (maior concentração testada).

## **CAPÍTULO 2**

### **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS FRAÇÕES MAJORITÁRIAS FRENTE A *Staphylococcus sp.* ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**

Artigo a ser submetido a Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira, sendo apresentado segundo suas normas de publicação.

### **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e suas frações majoritárias frente a *Staphylococcus sp.* isolados de mastite bovina**

**Resumo** - Avaliou-se a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OEs) de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (lipia), *Zingiber officinale* (gengibre), *Salvia officinalis* (sálvia), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Ocimum basilicum* (manjeriço), bem como as frações majoritárias carvacrol, timol, cinamaldeído e cineol frente a 32 isolados de *Staphylococcus sp.* coagulase positivos oriundos de rebanhos leiteiros bovinos. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas através da técnica de microdiluição em caldo. Os OEs de gengibre, salvia, alecrim, manjeriço e a fração majoritária cineol não evidenciaram nenhuma atividade inibitória sobre *Staphylococcus sp.* Frente aos demais isolados evidenciaram susceptibilidade variável. As médias geométricas das CIMs dos OEs de orégano, lipia e tomilho foram inferiores a 1600 µg/ml enquanto as CBMs para os mesmos OEs foram inferiores a 2707 µg/ml. Dentre os OEs que evidenciaram atividade antiestafilocócica, o de canela foi o menos ativo (CIM = 2032 µg/ml e CBM = 4263 µg/ml). Em relação às frações majoritárias dos OEs estudados, o carvacrol, cinamaldeído e timol, evidenciaram atividade estafilocócica com médias geométricas das CIMs inferiores a 598 µg/ml. As atividades bactericidas destas frações foram de: cinamaldeído (CBM = 2238 µg/ml); carvacrol (CBM = 732 µg/ml); timol (CBM = 856 µg/ml). Conclui-se que as frações majoritárias foram mais ativas ( $P \leq 0,05$ ) do que os OEs; embora a atividade inibitória (CIM) do cinamaldeído tenha sido similar ao carvacrol e timol sua atividade bactericida foi menor do que a do carvacrol e timol ( $P \leq 0,05$ ).

*Palavras Chaves:* mastite, *Staphylococcus ssp.*, fitoterapia, óleos essenciais

### **Antimicrobial activity of Essential oils from spices against *Staphylococcus* Coagulase positive isolated from cow mastitis.**

Abstract - The antimicrobial activity of *Oreganum vulgare* (oregano), *Thymus vulgaris* (thymus), *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamom), *Lippia graveolens* (mexican oregano), *Zingiber officinale* (ginger), *Salvia officinalis* (sage), *Rosmarinus officinalis* (rosemary) e *Ocimum basilicum* (basil), as well as the majoritary constituents carvacrol, thymol, trans-cinnamaldehyde (TC) and cineole was evaluated against 32 isolates of *Staphylococcus* coagulase positive from dairy herds of cows. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined through broth microdilution method. The essential oils from ginger, saje, rosemary and basil did not show inhibitory activity against the microorganisms. The MICs of oregano, thymus, cinnamon and mexican oregano showed geometric men  $\leq 1600$   $\mu\text{g/ml}$  while MBCs to essential oils were  $\leq 2707$   $\mu\text{g/ml}$ . Among the EOs that showed activity against *Staphylococcus* the less active was cinnamon (MIC = 2032  $\mu\text{g/ml}$ ; MBC = 4263  $\mu\text{g/ml}$ ). Regarding to majoritary constituents the MICs of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde showed geometric mean  $\leq 598$   $\mu\text{g/ml}$  and the bactericidal activities were: carvacrol (MBC = 732  $\mu\text{g/ml}$ ), thymol (MBC = 856  $\mu\text{g/ml}$ ) and cinnamaldehyde (MBC = 2238  $\mu\text{g/ml}$ ). In conclusion the majoritary constituents showed a better antimicrobial activity than the essential oils ( $P \leq 0,05$ ) although the MIC of cinnamaldehyde had been similar to carvacrol and thymol their bactericidal activity was losses then those constituents.

Key words: mastitis, *Staphylococcus ssp.*, phytotherapy, essential oils.

#### Introdução

Mastite é definida como a inflamação da glândula mamária causada pela multiplicação bacteriana, resultando em redução na lactação e conseqüentemente perdas econômicas para a indústria leiteira.

As mastites podem ser classificadas, quanto à origem, em contagiosa ou ambiental. A forma contagiosa envolve patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, enquanto que *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, e *Streptococcus uberis* são oriundos de fezes, poças de água, pastagens e solo e relacionados a mastite ambiental. As bactérias ganham acesso à glândula mamária, com maior frequência, durante e após a ordenha, quando ocorrem flutuações de vácuo em equipamentos de ordenha mal regulados e quando o esfíncter muscular do canal intramamário estiver relaxado (PHILPOT ; NICKERSON, 1991).

A infusão intramamária de agentes antibacterianos é o método de tratamento mais comum e disponível para tratamento de mastite. Entretanto, as taxas de cura obtidas com tais fármacos são, geralmente, insatisfatórias e dependem muito dos patógenos envolvidos (Eberhart, 1986; Dingwell et al., 2003). O uso de drogas antibacterianas pode ainda determinar a emergência de bactérias resistentes e se constitui na fonte mais comum de resíduos de antibióticos no leite (Erskine et al., 2003). Neste contexto, novas alternativas terapêuticas têm sido pesquisadas para controlar a mastite no rebanho leiteiro.

Os óleos essenciais (OEs), derivados de plantas condimentares representam um grupo de antimicrobianos naturais que têm sido tradicionalmente usados para preservação de alimentos ou para acentuar gosto ou aroma destes. Os OEs constituem-se em complexas misturas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas, cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeído, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, em diferentes concentrações, nos quais, um composto farmacologicamente ativo é majoritário (Calsamiglia et al., 2007).

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a susceptibilidade de isolados de *Staphylococcus sp.*, de origem caprina, frente aos OEs extraídos de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (lipia), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Origanum*

*vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (sálvia), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Zingiber officinale* (gengibre) e as frações majoritárias carvacrol, timol, cinamaldeído e cineol.

## Material e Métodos

### **Microrganismos**

Foram estudados 32 isolados de casos de mastite bovina, oriundos do Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. Os isolados foram identificados através de provas fenotípicas como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius*.

### **Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos**

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão em ágar (CLSI M31-A3; 2008). Foram avaliados os seguintes antimicrobianos: oxacilina (5µg), amoxicilina (30µg), gentamicina (30µg), estreptomicina (10µg), eritromicina (10µg), lincomicina (30µg), ácido nalídixico (30µg), ciprofloxacina (30µg), norfloxacina (10µg), enrofloxacina (5µg), tetraciclina (30µg) e rifampicina (30µg). De acordo com os resultados destes testes os microrganismos foram separados em dois subgrupos: 1) isolados totalmente sensível ou resistentes até 5 antibacterianos diferentes; 2) isolados resistentes a 6 ou mais antibacterianos (Tabela 2).

### **Óleos essenciais e frações majoritárias**

Na Figura 1 é apresentada a relação dos óleos essenciais e frações majoritárias avaliadas.

### **Diluição dos óleos essenciais**

Após pesagem de 1g, cada óleo foi diluído em metanol até atingir a concentração de 640mg/ml (Solução I). A seguir a solução I foi diluída a 1:100 em Caldo Muller-Hinton, obtendo-se a concentração de 6400µg/ml (Solução II).

Óleo essencial e Frações Majoritárias	Plantas condimentares (espécie)	Família das plantas	Composição (Fração majoritária)
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	carvacrol (92,6%)
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	$\gamma$ -terpineno (64%)
Lípia	<i>Lippia graveolens</i>	Verbenaceae	carvacrol (56,8%) e <i>o</i> -cimeno (32,2%)
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Laureaceae	Z-isoeugenol (93,3%)
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	1,8-cineol (28,59%) e cânfora (26,31%)
Sálvia	<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	cis-tujona (40,61%)
Manjericão	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	linalol (32,22%) e 1,8-cineol (23,61%)
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	Zingibereaceae	zingibereno (20,81%)
Carvacrol	-	-	Carvacrol (99,5%)
Timol	-	-	Timol (99%)
cinamaldeído	-	-	cinamaldeído (99%)
Cineol	-	-	cineol (97%)

**Figura 1** - Relação de óleos essenciais e frações majoritárias testados com suas respectivas composições.

### Determinação da concentração inibitória mínima

Foi realizada com base no protocolo M7-A6 do NCCLS (CLI, 2006). Inicialmente foi realizada a distribuição de 100 $\mu$ L de Caldo Muller-Hinton em poços de uma placa de microtitulação. A seguir, 200 $\mu$ L da Solução II, de cada óleo essencial, foram acrescentados aos primeiros poços e, após homogeneização, transferiu-se para o segundo e assim, sucessivamente, obtendo-se concentrações finais de: 6400, 3200, 1600, 800, 400, 200, 100  $\mu$ g/ml. O inóculo foi preparado, a partir de colônias desenvolvidas no ágar Muller-Hinton, obtendo-se uma suspensão bacteriana em salina, com turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland ( $1 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>). Desta suspensão, inocularam-se 10 $\mu$ l ( $1 \times 10^5$ ) em cada poço contendo os óleos essenciais incorporados ao caldo Muller-Hinton. As microplacas foram incubadas a 35°C/ 24h, em condições de aerobiose. A determinação das CIMs consistiu em registrar a menor concentração do óleo essencial ou fração majoritária capaz de causar inibição total do crescimento. A CIM 50% é definida como a menor concentração capaz de inibir 50% dos isolados. Estes ensaios foram realizados com três repetições.

### **Determinação da concentração bactericida mínima**

Definida como a menor concentração dos óleos essenciais capaz de causar a morte do inóculo, foi determinada a partir dos poços onde, após 24h de incubação não houve crescimento bacteriano visível. Destes transferiu-se uma alíquota de 10µl para a superfície do ágar Muller-Hinton. Após 24h de incubação a 35°C, registrou-se a menor concentração dos óleos essenciais ou fração majoritária que não evidenciou crescimento bacteriano. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **Análise Estatística**

O teste de Mann Whitney foi empregado para comparar duas amostras independentes, visando observar se os diferentes grupos em estudo apresentavam perfis de suscetibilidade semelhantes ou não, frente a determinado óleo essencial.

### **Resultados e Discussão**

A susceptibilidade dos isolados foi avaliada pelas CIMs e CBMs, apresentando as seguintes variações: *Cinnamomum zeylanicum* (canela) [CIM = 800-3200 µg/ml e CBM = 1600-6400 µg/ml]; *Lippia graveolens* (lipia) [CIMs variaram entre 800-3200 µg/ml e CBM = 1600-6400 µg/ml]; *Origanum vulgare* (orégano) [CIMs entre 800-3200 µg/ml e CBM = 1600-6400 µg/ml]; *Thymus vulgaris* (tomilho) [CIM = 800-3200 µg/ml e CBM = 1600-6400 µg/ml]. Em relação às frações majoritárias o carvacrol foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em concentrações (CIMs) variáveis entre 200 e 1600 µg/ml; as concentrações bactericidas mínimas variaram de 200 a 3200µg/ml. As CIMs do cinamaldeído variaram de 400 a 800 µg/ml e CBMs de 400-6400 µg/ml. O timol evidenciou atividade com CIM = 200-800 µg/ml e CBM = 400-1600 µg/ml.

A partir das médias geométricas das CIMs, os óleos essenciais de orégano, lipia e tomilho evidenciaram atividade antimicrobiana similar com valores de 1600 µg/ml, 1562 µg/ml e 1564 µg/ml respectivamente; todavia, o óleo essencial de canela foi significativamente menos ativo ( $P \leq 0,05$ ) que os primeiros com valor de 2032 µg/ml. O

mesmo perfil de atividade destes óleos essenciais foi evidenciado pelas concentrações bactericidas mínimas (CBMs) (Tabela 1). A menor atividade do óleo essencial de canela no presente estudo está de acordo com os achados de Santurio et al. (2007) que pesquisaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela em composições semelhantes aos desse trabalho; observaram atividades frente a *Salmonella enterica* de origem aviária que concordam com o perfil de atividade frente os *Staphylococcus sp.* no presente estudo.

Quando se avaliou as frações majoritárias, carvacrol, timol e cinamaldeído, as médias geométricas das CIMs foram significativamente mais ativas do que as atividades evidenciadas pelos óleos essenciais; estas concentrações foram de 584 µg/ml, 427 µg/ml e 598 µg/ml respectivamente. Entre estes compostos, o timol foi significativamente ( $P \leq 0,05$ ) mais ativo do que o cinamaldeído; o carvacrol evidenciou atividade inibitória intermediária, sendo similar ao timol e ao cinamaldeído (Tabela 1). Nostro et al., (2004) observaram que o carvacrol foi mais ativo que o timol frente isolados de *Staphylococcus*. Helander et al. (1998), ao caracterizarem a atividade dos componentes dos óleos essenciais frente a *E. coli* O157:H7, observaram que o carvacrol, timol, cinamaldeído evidenciaram atividades similares (CIMs = 3 mM). Baskaran et al., (2009) relataram que a atividade antimicrobiana (CIM e CBM) do cinamaldeído foi menor do que o observado pelo carvacrol, timol e eugenol.

Quando se avaliou as CBMs das frações majoritárias, detectou-se que o carvacrol e timol foram igualmente ativas e significativamente mais ativas do que o cinamaldeído ( $P \leq 0,05$ ). O cinamaldeído evidenciou atividade bactericida na concentração de 2238 µg/ml, o que foi similar aos óleos essenciais de orégano, lipia e tomilho e significativamente mais ativo do que o óleo essencial de canela (4263 µg/ml) (Tabela 1). Baskaran, et al., (2009) encontraram diferenças menores entre as CBMs do cinamaldeído, carvacrol e timol; também o cinamaldeído apresentou valor da CBM proporcionalmente mais próximo da CIM.

Os isolados não evidenciaram sensibilidade frente às concentrações e condições testadas, para os OEs de *Zingiber officinale* (gingibre), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (sálvia) e para a fração majoritária de cineol. Pozzatti et al., (2008) não encontraram atividade antifúngica para os óleos essenciais de manjeriço, alecrim e sálvia, no entanto relataram reduzido número de isolados de *Candida spp.* sensíveis ao óleo essencial de gengibre. Por outro lado Sartoratto et al., (2004) relataram atividade antimicrobiana para óleo essencial de manjeriço frente isolados de *Staphylococcus aureus* (CCT2740). Fu et al., (2007) verificaram atividade do óleo essencial de alecrim frente as cepas de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Dalamare et al. (2007) também observaram atividade do óleo essencial de sálvia frente alguns isolados de *Staphylococcus spp.* Hendry et al., (2009) observaram atividade antimicrobiana para o cineol frente isolados de *Staphylococcus aureus*, porém a atividade foi inferior ao óleo essencial de eucalipto com 81% de cineol. No presente estudo a fração majoritária de cineol não apresentou atividade antimicrobiana; esta fração foi encontrada como majoritária nos óleos essenciais de manjeriço e alecrim que também não apresentaram atividades no presente estudo.

No presente estudo verificou-se que as frações majoritárias inibiram os isolados de *Staphylococcus sp.* em menores concentrações do que os óleos essenciais. Esta tendência concorda com Nostro et al., (2004) quando observaram que o carvacrol e timol foram mais ativos que o óleo essencial de orégano.

As comparações de nossos resultados com estudos similares devem ser cautelosas, na medida em que a grande maioria dos estudos emprega a técnica de difusão em ágar, fornecendo resultados referentes ao diâmetro de inibição, expressos em milímetros. Mesmo os estudos de microdiluição em caldo na grande maioria dos casos, não seguem procedimentos padronizados internacionalmente, como os aqui empregados. A autobiografia é outra técnica

de avaliação da atividade antimicrobiana que combina cromatografia em camada delgada com difusão em ágar e cujos resultados referem-se aos diâmetros dos halos de inibição e não às CIMs.

A emergência de resistência de *Staphylococcus* aos agentes antimicrobianos constitui-se numa ameaça ao homem e aos animais, sendo decorrente do intenso e indiscriminado uso de antimicrobianos em medicina humana e veterinária (Virdis et al., 2010). No presente estudo, os óleos essenciais e suas frações majoritárias evidenciaram atividades variáveis em função da susceptibilidade dos isolados; todavia, quando se comparou as atividades dos OEs sobre os subgrupos 1 e 2 (formados por diferentes resistotipos) não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) (Tabela 2).

Finalmente, este estudo permitiu evidenciar a nítida especificidade da atividade de alguns óleos essenciais sobre *Staphylococcus sp.* coagulase positivo indicando que para o emprego desses no tratamento de mastites em rebanhos leiteiros deverá levar em consideração tal fato, não podendo, por isso, embasar-se na eleição de apenas uma essência. Estudos adicionais abordando o sinergismo entre óleos essenciais, frações majoritárias e agentes antibacterianos são fundamentais para o desenvolvimento de produtos que possam auxiliar no tratamento da mastite, de significativo impacto na bovinocultura leiteira.

### Conclusões

Este estudo permitiu concluir que: 1) os óleos essenciais de sálvia, manjeriço, alecrim, gengibre; bem como a fração majoritária de cineol não demonstram atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus spp* nas concentrações testadas. Enquanto que os óleos essenciais de orégano, tomilho, canela, lipia; bem como as frações majoritárias de cinamaldeído, timol e carvacrol apresentam atividade antimicrobiana; 2) os óleos essenciais de orégano, lipia e tomilho apresentam atividade antimicrobiana (CIMs e CBMs) similares ou superiores ao óleo essencial de canela. Enquanto que as frações majoritárias apresentam atividades antimicrobianas em concentrações inferiores das encontradas para os óleos essenciais; 3) o timol, carvacrol e cinamaldeído apresentam pequenas variações nas suas atividades inibitórias; no entanto a atividade bactericida do cinamaldeído foi significativamente inferior

as do timol e carvacrol; 4) a susceptibilidade aos óleos essenciais é semelhante entre subgrupos de isolados, independente da resistência aos antimicrobianos usados no tratamento da mastite.

#### Bibliografia

BASKARAN, A.S. et al. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1423-1429, 2009.

CALSAMIGLIA, S. et al. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

DALAMARE, et al. Antibacterial activity of essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, p. 603-608, 2007.

DINGWELL, R. T. et al. Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for cure of *Staphylococcus aureus* infection in the dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 159-168, 2003.

EBERHART, R. J. Management of dry cows to reduce mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 6, p. 1721-1732, 1986.

ERSKINE, R. J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F. J. Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 109-138, 2003.

FU, Y. et al. Investigation of antibacterial activity of rosemary essential oil against *Propionibacterium acnes* with atomic force microscopy. **Phytotherapy Research**, v. 73, n. 12, p. 1275-1280, 2007.

HELANDER, I.M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3590-3595, 1998.

HENDRY, E. R. et al. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1219-1225, Dec 2009.

JUERGENS, U. R. et al. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 17, n. 5, p. 281-287, 2004.

NCCLS 2006. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5th ed. Approved standard document M7-A6, Wayne, P.A.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, p. 191-195, 2004.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis**: counter attack. Naperville: Babson Bros, 1991. 150 p.

POZZATTI, P. et al. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 950-956, 2008.

SANTURIO, J.M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37, p.803-808, 2007.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2004.

VIRDIS, S. et al. Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative *Staphylococci* Isolated from Goats with Subclinical Mastitis. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, p. 517060, 2010.

**Tabela 1** – Suscetibilidade de isolados de *Staphylococcus sp.* causadores de mastite em bovinos

OEs e FMs	Atividade antimicrobiana				
	CIM ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )			CBM ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	
	Faixa	MG*	CIM 50	Faixa	MG*
Orégano	800 – 3200	1600 <sup>B</sup>	1600	1600 - 6400	2288 <sup>B</sup>
Lipia	800 – 3200	1562 <sup>B</sup>	1600	1600 - 6400	2707 <sup>B</sup>
Tomilho	800 – 3200	1564 <sup>B</sup>	1600	1600 - 3200	2370 <sup>B</sup>
Canela	800 – 3200	2032 <sup>A</sup>	1600	1600 - 6400	4263 <sup>A</sup>
Carvacrol	200 – 1600	584 <sup>CD</sup>	800	200 - 3200	732 <sup>C</sup>
Timol	200 – 800	427 <sup>D</sup>	400	400 - 6400	856 <sup>C</sup>
Cinamaldeído	400 – 800	598 <sup>C</sup>	800	400 - 6400	2238 <sup>B</sup>

CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima; CIM 50 = Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 50 % dos isolados; \*MG= Média Geométrica, onde letras iguais na mesma coluna indicam atividade antimicrobiana similar; OEs = Óleos Essenciais; FMs = Frações majoritárias.

**Tabela 2** – Comparação entre o resistotipo de *Staphylococcus* coagulase positiva a antibacterianos com a suscetibilidade dos mesmos frente a óleos essenciais e suas frações majoritárias.

Isolados	Resistotipo	n°R	CIM de OEs e FMs (µg/ml)						
			Ov	Lg	Cz	Tv	cv	cn	tm
26	N.D.	0	1600	1600	3200	1600	400	800	400
5	AMO-NAL	2	1600	1600	800	1600	400	400	400
13	AMO-NAL	2	1600	3200	3200	1600	400	800	400
19	NAL-TET	2	1600	3200	3200	1600	400	800	400
33	AMO-TET	2	1600	1600	1600	1600	1600	400	400
35	CIP-NOR	2	1600	1600	1600	1600	800	800	200
2	LIN-NAL-TET	3	1600	1600	1600	1600	400	400	800
6	NAL-NOR-TET	3	1600	1600	3200	1600	400	800	400
32	AMO-NAL-TET	3	1600	800	1600	1600	1600	400	400
36	OXA-AMO-RIF	3	1600	800	1600	1600	800	400	200
40	GEN-EST-NAL	3	800	800	1600	1600	1600	800	400
17	OXA-AMO-NAL-TET	4	1600	1600	3200	1600	400	800	800
23	OXA-AMO-NAL-TET	4	1600	1600	3200	800	400	400	400
43	EST-NAL-TET-RIF	4	800	3200	1600	1600	1600	800	800
18	OXA-AMO-NAL-TET-RIF	5	1600	1600	3200	1600	400	800	800
39	GEN-EST-ERI-LIN-NAL	5	1600	800	1600	800	800	400	800
42	ERI-LIN-NAL-TET-RIF	5	1600	3200	1600	1600	1600	800	400
1	OXA-AMO-LIN-NAL-ENO-TET	6	1600	1600	1600	1600	400	400	400
16	OXA-AMO-EST-LIN-NAL-TET	6	1600	1600	3200	3200	200	800	400
41	EST-ERI-LIN-NAL-TET-RIF	6	1600	800	1600	1600	1600	800	400
11	OXA-EST-ERI-LIN-NAL-TET-RIF	7	800	3200	3200	1600	400	800	400
3	OXA-AMO-EST-ERI-LIN-NAL-TET-RIF	8	1600	1600	1600	1600	400	400	400
24	OXA-AMO-EST-ERI-LIN-NAL-TET-RIF	8	1600	1600	3200	1600	400	800	400
27	OXA-GEN-EST-ERI-LIN-NAL-TET-RIF	8	1600	800	1600	1600	1600	400	400
7	OXA-GEN-EST-ERI-LIN-NAL-NOR-TET-RIF	9	1600	1600	1600	1600	400	400	200
9	OXA-AMO-EST-ERI-LIN-NAL-ENO-TET-RIF	9	3200	1600	3200	1600	400	800	400

**Tabela 2** – Comparação entre o resistotipo de *Staphylococcus* coagulase positiva a antibacterianos com a suscetibilidade dos mesmos frente a óleos essenciais e suas frações majoritárias. (continuação...)

10	<i>OXA-AMO-GEN-EST-ERI-LIN-NAL-TET-RIF</i>	9	3200	1600	3200	1600	400	800	400
15	<i>OXA-AMO-GEN-EST-ERI-LIN-NAL-TET-RIF</i>	9	1600	3200	3200	3200	200	800	400
29	<i>OXA-AMO-GEN-EST-ERI-LIN-NAL-TET-RIF</i>	9	1600	800	800	1600	1600	400	800
21	<i>OXA-AMO-EST-ERI-LIN-NAL-CIP-NOR-TET-RIF</i>	10	1600	3200	3200	1600	400	800	800
22	<i>OXA-GEN-EST-ERI-LIN-NAL-CIP-NOR-TET-RIF</i>	10	1600	1600	800	800	200	800	200
37	<i>OXA-AMO-GEN-EST-ERI-LIN-NAL-CIP-NOR-TET-RIF</i>	11	3200	800	1600	1600	800	400	400
	P	-	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Es = Óleos Essenciais; FMs = Frações Majoritárias; CIM = Concentração Inibitória Mínima; Ov = *Oreganum vulgare*; Lg = *Lippia graveolens*; Cz = *Cinnamomum zeylanicum*; Tv = *Thymus vulgaris*; cv = carvacrol; cn = cinamaldeído; tm = timol; n°R = número de resistência a agentes antimicrobianos; ND = não detectado; NS = não significativo (valores de  $P > 0,05$  ao teste de Mann-Whitney)

**CAPÍTULO 3**  
**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E**  
**SUAS FRAÇÕES MAJORITÁRIAS FRENTE À *Staphylococcus***  
***sp.* ISOLADOS DE MASTITE CAPRINA.**

Artigo a ser submetido a Revista Ciência Rural, sendo apresentado segundo suas normas de publicação.

**Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e suas frações majoritárias frente à *Staphylococcus sp.* isolados de mastite caprina.**

**Antimicrobial activity of essential oils and their majority constituents against *Staphylococcus sp.* isolated from goat mastitis.**

RESUMO

Avaliou-se a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OEs) de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (lipia), *Zingiber officinale* (gengibre), *Salvia officinalis* (sálvia), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Ocimum basilicum* (manjeriço), bem como as frações majoritárias carvacrol, timol, cinamaldeído e cineol frente a 33 isolados oriundos de rebanhos leiteiros caprinos, sendo 27 isolados classificados como coagulase negativos. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas através da técnica de microdiluição em caldo. Observou-se atividade antimicrobiana, inferior ou igual à máxima concentração testada ( $6400 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) para os OEs de orégano, lipia, tomilho, canela, bem como para as frações majoritárias de carvacrol, timol e cinamaldeído. Observou-se que os OEs de orégano e tomilho foram igualmente os mais ativos. O óleo essencial de canela foi menos ativo que os primeiros, porém mais ativo do que o Óleo Essencial de lipia. As frações majoritárias carvacrol, timol e cinamaldeído apresentaram-se mais ativas do evidenciado pelos óleos essenciais. Entretanto, considerando a CIM, as frações majoritárias, carvacrol e cinamaldeído foram igualmente os mais ativos que o timol. Por outro lado, as frações majoritárias de carvacrol e timol evidenciaram atividades bactericidas similares, mas o cinamaldeído foi significativamente menos ativo do que as demais frações.

*Palavras-chave:* mastite; *Staphylococcus spp*; fitoterapia; óleos essenciais

## ABSTRACT

The antimicrobial activity of some essential oils was evaluated as it follows: *Oreganum vulgare* (oregano), *Thymus vulgaris* (thymus), *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamom), *Lippia graveolens* (mexican oregano), *Zingiber officinale* (ginger), *Salvia officinalis* (sage), *Rosmarinus officinalis* (rosemary) e *Ocimum basilicum* (basil), as well as the majoritary constituents carvacrol, thymol, cinnamaldehyde and cineole against 33 isolates from dairy herds of goats being 27 isolates classified as coagulase-negative staphylococci. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined to each isolate by using broth microdilution method. Lower antimicrobial activity or equal to the maximum tested ( $6400 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) were observed on the essential oils of oregano, mexican oregano, thymus, cinnamom as well as to majoritary constituents of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde. It was noticed that the essential oils of oregano and thymus were equally the most active. The essential oil of cinnamon was less active than the first ones, though more active than the essential oil of mexican oregano. The majoritary constituents carvacrol, thymol, cinnamaldehyde presented themselves more active than the verified by the essential oils. However, considering the MIC, the majoritary constituents, carvacrol and cinnamaldehyde were equally more active than thymol. On the other hand, the major constituents of carvacrol and thymol presented similar bactericidal activities, but cinnamaldehyde was significantly less active than the other constituents.

*Key words:* mastitis, *Staphylococcus ssp.*, phytotherapy, essential oils.

## INTRODUÇÃO

O rebanho caprino brasileiro é estimado em 11,2 milhões de animais, sendo que aproximadamente 92,2% estão na região Nordeste. A produção de leite de cabras desempenha papel relevante como fonte de proteínas e constituindo-se em importante fator sócio-econômico para os pequenos produtores, através da utilização de seus subprodutos (LIMA,

2000). A falta de organizações de criadores, aliada à carência de assistência técnica especializada, além da precariedade do manejo higiênico-sanitário, são alguns dos entraves que prejudicam o crescimento da atividade. Os problemas sanitários, nutricionais e de manejo em geral, limitam o potencial produtivo dos animais (VIEIRA et al., 1998).

A mastite infecciosa é causada por uma ampla variedade de microrganismos. Os agentes contagiosos são representados por *Staphylococcus* coagulase positiva (*S. aureus*) e pelos *Staphylococcus* coagulase negativa, como o *S. epidermidis*, *S. caprae*, *S. agalactiae*, além do *Corynebacterium bovis*. Há também agentes ambientais como as enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klesbsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*), *Nocardia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, fungos e algas (CONTRERAS et al., 2007).

Para tratamento da mastite a infusão intramamária de antibióticos é o método de maior utilização. Entretanto, as taxas de cura obtidas com antibióticos são, geralmente, insatisfatórias e dependem muito dos patógenos envolvidos (EBERHART, 1986; DINGWELL et al., 2003). O uso de agentes antibacterianos em animais, incluindo os casos de mastites, pode determinar a emergência de bactérias resistentes (BERGHASH et al., 1983; PYORALA, 2009). Além do mais, o uso de antimicrobianos para tratamento de mastite tem sido a fonte de resíduos de antibióticos no leite. (ERSKINE et al., 2003). Devido aos problemas mencionados com o uso de agentes antibacterianos, novas alternativas terapêuticas têm sido pesquisadas para controlar a mastite no rebanho leiteiro como a própolis e derivados de plantas (VARGAS et al., 2004; BASKARAN et al., 2009).

Os OEs, derivados de plantas utilizadas como condimentos, representam um grupo de antimicrobianos naturais que têm sido tradicionalmente usados para preservação de alimentos ou para acentuar gosto ou aroma destes. Os OEs constituem-se em complexas misturas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas (SIMÕES ; SPITZER, 1999); cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos

orgânicos fixos, em diferentes concentrações, nos quais, um composto farmacologicamente ativo é majoritário. Assim, no orégano, temos o carvacrol (3 a 17%); no tomilho, o timol (40%) e, na canela, o cinamaldeído (75%) (FARMACOPEA ITALIANA, 1998). Os OEs extraídos de orégano, tomilho canela, entre outros, têm potencial antimicrobiano significativo (BURT, 2004; KALEMBA et al., 2002); todavia, a maioria das publicações estabelece generalizações sobre estas atividades frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos, incluindo limitado número de representantes de cada espécie (HAMMER et al., 1999; SMITH-PALMER et al., 1998). Com esta perspectiva, é fundamental avaliar, à luz de técnicas microbiológicas modernas e padronizadas, a atividade de óleos essenciais sobre *Staphylococcus sp.*, um dos principais patógenos causador de mastites em rebanhos leiteiros.

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a susceptibilidade de isolados de *Staphylococcus sp.*, de origem caprina, frente aos OEs extraídos de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (lipia), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (sálvia), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Zingiber officinale* (gengibre) e as frações majoritárias carvacrol, timol, cinamaldeído e cineol.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Microrganismos*

Foram estudados 33 isolados agentes de mastite caprina, provenientes do Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal do Vale do São Francisco. Os isolados foram identificados, por provas fenotípicas como: 1) *Staphylococcus sp* coagulase positiva; 2) *Staphylococcus sp.* coagulase negativa 3 (Tabela 2).

### *Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos*

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão em ágar (CLSI M31-A3; 2008). Foram avaliados os seguintes antimicrobianos: oxacilina (5µg),

amoxicilina (30µg), gentamicina (30µg), estreptomicina (10µg), eritromicina (10µg), lincomicina (30µg), ácido nalídixico (30µg), ciprofloxacina (30µg), norfloxacina (10µg), enrofloxacina (5µg), tetraciclina (30µg) e rifampicina (30µg). O teste susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado pelo método clássico de Kirby-Bauer (disco difusão em Agar, conforme atualização do CLSI, 2008). Os microrganismos em estudo foram sub-agrupados em : 1) isolados totalmente sensíveis ou resistentes até 6 antibacterianos diferentes; 2) isolados resistentes a 7 ou mais antibacterianos (Tabela 2).

#### *Óleos essenciais e frações majoritárias*

Na Figura 1 é apresentado à relação dos óleos essenciais e frações majoritárias avaliadas.

Óleo essencial e Frações Majoritárias	Plantas condimentares (espécie)	Família das plantas	Composição (Fração majoritária)
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	carvacrol (92,6%)
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	γ-terpineno (64%)
Lipia	<i>Lippia graveolens</i>	Verbenaceae	carvacrol (56,8%) e o-cimeno (32,2%)
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Laureaceae	Z-iso Eugenol (93,3%)
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	1,8-cineol (28,59%) e cânfora (26,31%)
Sálvia	<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	cis-tujona (40,61%)
Manjerição	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	linalol (32,22%) e 1,8-cineol (23,61%)
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	zingibereno (20,81%)
Carvacrol	-	-	Carvacrol (99,5 %)
Timol	-	-	Timol (99%)
cinamaldeído	-	-	cinamaldeído (99%)
Cineol	-	-	cineol (97%)

**Figura 1** - Relação de óleos essenciais e frações majoritárias testados com respectivas composições.

#### *Determinação das concentrações inibitórias mínimas*

Após pesagem de 1g, cada óleo foi diluído em metanol até atingir a concentração de 640mg/ml (Solução I). A seguir, diluiu-se a 1:100 em Caldo Muller-Hinton, obtendo-se a concentração de 6400µg/ml (Solução II).

As CIMs foram determinadas com base no documento M1-31(CLSI, 2008). Inicialmente foi realizada a distribuição de 100µL de Caldo Muller-Hinton em poços de uma placa de microtitulação. A seguir, 200µL da Solução II de cada óleo essencial foram acrescentados aos primeiros poços e, após homogeneização, transferiu-se para o segundo e assim, sucessivamente, obtendo-se concentrações finais de: 6400, 3200, 1600, 800, 400, 200, 100 µg/ml. O inóculo foi preparado, a partir de colônias desenvolvidas no ágar Muller-Hinton, obtendo-se uma suspensão bacteriana em salina, com turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland ( $1 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>). Desta suspensão, inocularam-se 10µl ( $1 \times 10^5$ ) em cada poço contendo os óleos essenciais incorporados ao caldo Muller-Hinton. As microplacas foram incubadas a 35°C/ 24h, em condições de aerobiose. A determinação das CIMs consistiu em registrar a menor concentração do óleo essencial ou fração majoritária capaz de causar inibição total do crescimento. Estes ensaios foram realizados em triplicatas.

#### *Determinação das concentrações bactericidas mínimas*

Definida como a menor concentração dos óleos essenciais capaz de causar a morte do inóculo, foi determinada a partir dos poços onde, após 24h de incubação não houve crescimento bacteriano visível. Destes transferiu-se uma alíquota de 10µl para a superfície do ágar Muller-Hinton. Após 24h de incubação a 35°C, registrou-se a menor concentração dos óleos essenciais ou fração majoritária que não evidenciou crescimento bacteriano. Os ensaios também foram realizados em triplicatas.

### *Análise Estatística*

O teste de Mann Whitney foi empregado para comparar duas amostras independentes, visando observar se os diferentes grupos em estudo apresentavam perfis de suscetibilidade semelhantes ou não, frente a determinado óleo essencial.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados evidenciaram susceptibilidade variável frente às concentrações dos óleos essenciais (OEs) e frente às frações majoritárias (FMs). As médias geométricas para as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) foram: canela [CIM = 2102  $\mu\text{g/ml}$  e CBM = 3786  $\mu\text{g/ml}$ ]; lípia [CIM = 2942  $\mu\text{g/ml}$  e CBM = 5188  $\mu\text{g/ml}$ ]; orégano [1441  $\mu\text{g/ml}$  e CBM = 2487  $\mu\text{g/ml}$ ]; tomilho [CIM = 1471  $\mu\text{g/ml}$  e CBM = 2762  $\mu\text{g/ml}$ ]; carvacrol [CIM = 762  $\mu\text{g/ml}$  e CBM = 1471  $\mu\text{g/ml}$ ]; cinamaldeído [CIM = 875  $\mu\text{g/ml}$  e CBM = 2468  $\mu\text{g/ml}$ ] e timol [CIM = 1060  $\mu\text{g/ml}$  e CBM = 1566  $\mu\text{g/ml}$ ] (Tabela 1). Considerando-se os subgrupos formados pelo fator de patogenicidade coagulase, os isolados coagulase positiva e negativa apresentaram sensibilidade similares ( $P > 0,05$ ) frente as concentrações de atividades encontradas para cada óleo essencial ou fração majoritária testados (Figura 1). Também não foi evidenciado diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os subgrupos 1 e 2 formados por resistotipos (Tabela 2).

Considerando-se as médias geométricas das CIMs, os óleos essenciais de orégano e tomilho foram igualmente os mais ativos. O óleo essencial de canela foi menos ativo que os OEs de orégano e tomilho e significativamente mais ativo do que o OE de lípia ( $P \leq 0,05$ ). Enquanto que as frações majoritárias foram mais ativas que os óleos essenciais ( $P \leq 0,05$ ) com exceção das CBMs do cinamaldeído que foram similares as CBMs dos óleos essenciais de orégano e tomilho. Comparando as frações majoritárias, o carvacrol e cinamaldeído foram igualmente os mais ativos quanto as CIMs e o timol foi o menos ativo (Tabela 1).

A emergência de resistência de *Staphylococcus* às drogas antimicrobianas constitui-se numa dupla ameaça ao homem e aos animais, sendo decorrente do intenso e indiscriminado uso de antimicrobianos em medicina humana e veterinária. VIRDIS et al. (2010) encontraram multiresistência a antibacterianos em *Staphylococcus spp.* portadores do gene *mecA*. No presente estudo, os óleos essenciais e suas frações majoritárias evidenciaram atividades variáveis em função da susceptibilidade dos isolados; todavia, quando se comparou as atividades dos OEs sobre os subgrupos 1 e 2 (formados por diferentes resistotipos) não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) (Tabela 2). Nesse sentido as semelhanças de susceptibilidade entre os grupos estudados seguem em concordância com achados de (NOSTRO et al., 2004); esses pesquisadores não encontraram diferenças de susceptibilidade entre os grupos de *Staphylococcus* resistentes a metilina (MRS) e sensíveis à metilina (MSS) frente o carvacrol e o timol.

A maior concentração de carvacrol e timol em óleos essenciais explicam a maior atividade antimicrobiana de alguns OEs (NOSTRO et al. 2007). O óleo essencial de canela, utilizado neste estudo apresentava alta concentração Z-iso Eugenol (93,3%). Conforme BASKARAN et al. (2009) os isolados de *Staphylococcus aureus* requereram maiores concentrações de eugenol para serem inibidas da mesma forma que o carvacrol ou cinamaldeído.

SARTORATTO et al., 2004 relataram atividade para óleo essencial de manjeriço frente isolados de *Staphylococcus aureus* CCT2740. FU et al. (2007) verificaram atividade do óleo essencial de alecrim frente as cepas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. DALAMARE et al. (2007) observaram atividade do óleo essencial de sálvia frente a alguns isolados de *Staphylococcus spp.* HENDRY et al. (2009) encontraram atividade do cineol frente a isolados de *Staphylococcus aureus*, porém a atividade foi inferior ao óleo essencial de eucalipto com 81% de cineol. No presente estudo,

os OEs de gengibre, manjeriço, alecrim, sálvia e a fração majoritária cineol não evidenciaram nenhuma atividade antibacteriana frente aos microrganismos avaliados.

As comparações de nossos resultados com estudos similares devem ser cautelosas, na medida em que a grande maioria dos estudos emprega a técnica de difusão em ágar, fornecendo resultados referentes ao diâmetro de inibição, expressos em milímetros; mesmo os estudos de microdiluição em caldo, na grande maioria dos casos, não seguem procedimentos padronizados, como os aqui empregados. A autobiografia é outra técnica de avaliação da atividade antimicrobiana que combina cromatografia em camada delgada com difusão em ágar e cujos resultados referem-se aos diâmetros dos halos de inibição e não às CIMs.

Finalmente, este estudo permitiu evidenciar a nítida especificidade da atividade de alguns óleos essenciais sobre isolados de *Staphylococcus spp.* indicando que para o emprego desses no tratamento de mastites em rebanhos leiteiros deverá levar em consideração tal fato, não podendo, por isso, embasar-se na eleição de apenas numa essência. Estudos adicionais abordando o sinergismo entre óleos essenciais, frações majoritárias e drogas antibacterianas são fundamentais para o desenvolvimento de produtos que possam auxiliar no tratamento da mastite, de significativo impacto na produção leiteira de caprinos.

## CONCLUSÕES

Este estudo permitiu concluir que: 1) os óleos essenciais de orégano, tomilho, canela, lipia; bem como as frações majoritárias de cinamaldeído, timol e carvacrol apresentam atividade antimicrobiana; 2) os óleos essenciais de orégano e tomilho apresentam atividades antimicrobianas (CIMs e CBMs) similares ou superiores aos óleos essenciais de lipia e canela. Enquanto que as frações majoritárias apresentam atividades antimicrobianas em menores concentrações das encontradas para os óleos essenciais; 3) o carvacrol e cinamaldeído apresentam pequenas variações nas suas atividades inibitórias; no entanto a atividade bactericida do cinamaldeído foi significativamente inferior as do timol e carvacrol; 4) a

susceptibilidade aos óleos essenciais é semelhante entre subgrupos de isolados, independente da resistência aos antimicrobianos usados no tratamento da mastite.

## BIBLIOGRAFIA

BASKARAN, A.S. et al. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1423-1429, Apr 2009.

BERGHASH, S. R. et al. Effects of antibiotic treatment of nonlactating dairy cows on antibiotic resistance patterns of bovine mastitis pathogens. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 24, n. 5, p. 771-776, Nov 1983.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. **Int J Food Microbiol**, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug 1 2004.

CONTRERAS, A. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.68, p.145-163, 2007.

DELAMARE, A. P. L. et al. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, p. 603-608, 2007.

EBERHART, R. J. Management of dry cows to reduce mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 6, p. 1721-1732, Jun 1986.

ERSKINE, R. J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F. J. Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 109-138, vi, Mar 2003.

FARMACOPEA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA. X Edizione. Roma: Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, 1998. V.I, p.206-210.

FU, Y. et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytother Research**, v. 21, n. 10, p. 989-994, Oct 2007.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, Jun 1999.

HENDRY, E. R. et al. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1219-1225, Dec 2009.

KALEMBA, D.; KUSEWICZ, D.; SWIADER, K. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 3, p. 288-291, May 2002.

LIMA, L. A. Ovinocaprinocultura na Agricultura familiar. Informativo do Centro Nacional de Caprinos CNPC/EMBRAPA. Sobral, n.11, jun-jul., 2000.

- NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiol Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, Jan 30 2004.
- NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**. n. 56, p.519–523, 2007.
- PYORALA, S. In vitro studies as supporting evidence on the efficacy of antimicrobials for mastitis treatment. **Journal Applied Microbiology**, v. 107, n. 6, p. 2116-2117, Dec 1 2009.
- SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.
- SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202-1205, 1996.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: 1999.
- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 118-122, Feb 1998.
- VARGAS, A. C. et al. Alcoholic propolis extract: antimicrobial activity. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, jan-fev 2004.
- VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; XIMENES, L. F. Epidemiologia e controle as principais parasitoses de caprinos nas regiões semi – áridas do Nordeste. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 50p, 1998.
- VIRDIS, S. et al. Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative *Staphylococci* Isolated from Goats with Subclinical Mastitis. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, p. 517060, 2010.

Tabela 1 – Comparação das atividades antimicrobianas dos óleos essenciais de orégano, lipia, tomilho e canela com atividade antimicrobiana das frações majoritárias carvacrol, timol e cinamaldeído.

OEs e FMs	Atividade antimicrobiana				
	CIM ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )		CIM 50	CBM ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	
	Faixa	MG*		Faixa	MG*
Orégano	800 - 3200	1441 <sup>C</sup>	1600	1600 - 6400	2487 <sup>C</sup>
Lipia	1600 - 6400	2942 <sup>A</sup>	3200	3200 - 6400	5188 <sup>A</sup>
Tomilho	800 - 3200	1471 <sup>C</sup>	1600	800 - 6400	2762 <sup>C</sup>
Canela	1600 - 3200	2102 <sup>B</sup>	1600	1600 - 6400	3786 <sup>B</sup>
Carvacrol	800 - 1600	767 <sup>E</sup>	800	800 - 3200	1471 <sup>D</sup>
Timol	200 - 1600	1060 <sup>D</sup>	1600	400 - 3200	1566 <sup>D</sup>
Cinamaldeído	800 - 1600	875 <sup>E</sup>	800	800 - 6400	2468 <sup>C</sup>

CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima; CIM 50 = Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 50 % dos isolados \*MG = Média Geométrica, onde letras iguais na mesma coluna indicam atividade antimicrobiana similar

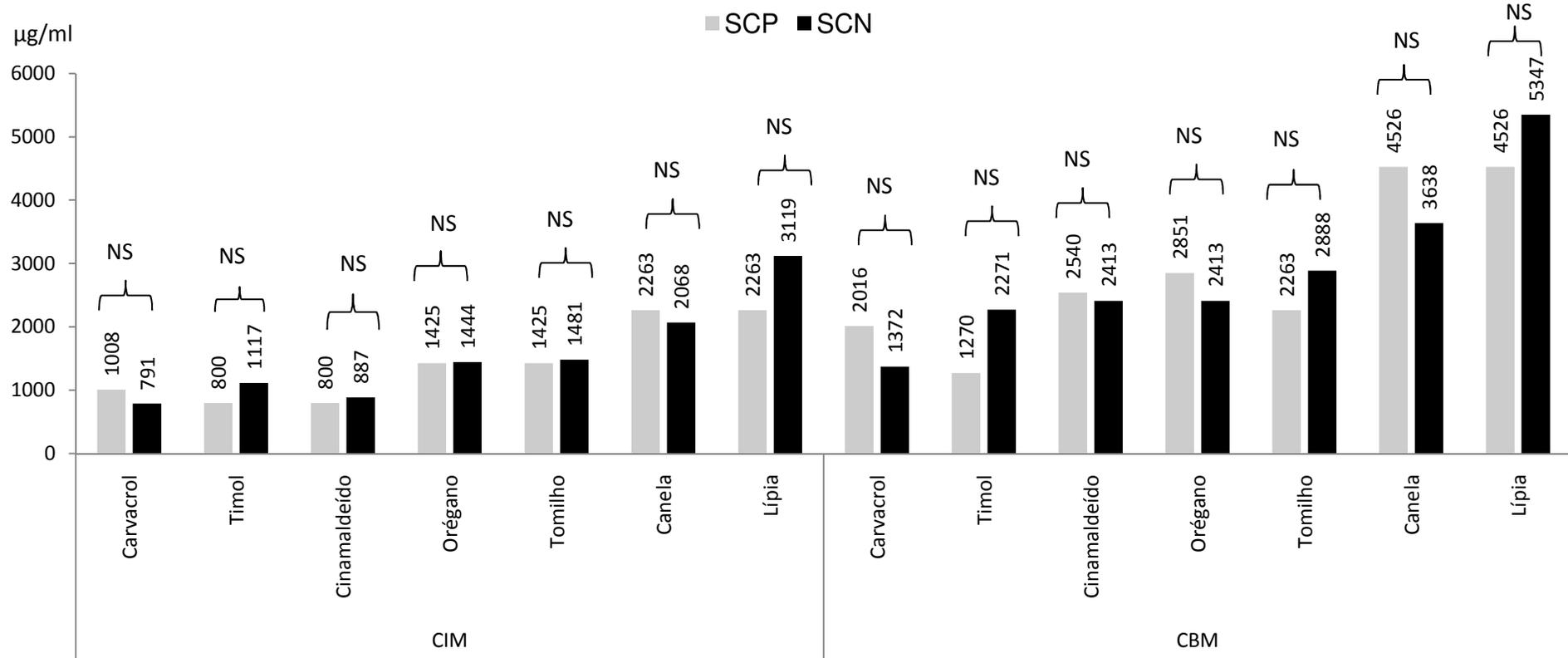
**Tabela 2** - Susceptibilidade de *Staphylococcus sp* frente a diferentes agentes antimicrobianos e relação com a atividade antimicrobiana de Óleos essenciais e Frações Majoritárias de especiarias.

Isolado	Resistotipo	nºR	CIM de OEs e FMs (µg/ml)						
			Ov	Lg	Cz	Tv	cv	cn	tm
1- SCN	EST-NEO	2	1600	3200	1600	1600	800	800	1600
7 - SCN	EST-NEO	2	1600	3200	1600	1600	800	800	1600
27 - SCN	NAL-NOR	2	1600	3200	1600	1600	400	800	1600
2 - SCN	EST-OXA-NAL	3	800	3200	1600	1600	800	800	800
5 - SCN	NEO-NAL-NOR	3	1600	3200	3200	1600	400	800	1600
19 - SCN	EST-NEO-NAL	3	1600	3200	3200	1600	1600	800	1600
13 - SCN	EST-NEO-NAL-CIP-NOR	5	800	3200	1600	1600	800	800	1600
22 - SCN	OXA-AMP-AMO-NAL-TET	5	1600	6400	1600	1600	800	1600	1600
26 - SCN	ERI-AMP-AMO-NAL-TET	5	1600	3200	3200	1600	400	800	1600
37 - SCN	NEL-ERI-AMO-NAL-TET	5	1600	3200	1600	1600	400	800	800
38 - SCN	EST-NEO-NAL-CIP-NOR	5	1600	3200	3200	800	800	800	1600
40 - SCN	OXA-AMP-AMO-NAL-TET	5	1600	3200	1600	800	800	800	1600
12 - SCP	EST-NEO-AMO-NAL-CIP-NOR	6	1600	1600	3200	3200	1600	800	800
32 - SCN	EST-NEO-ERI-LIN-NAL-TET	6	800	3200	3200	1600	800	800	1600
41 - SCN	EST-NEO-ERI-LIN-NAL-TET	6	1600	3200	1600	1600	800	800	800
3 - SCN	ERI-LIN-AMP-AMO-NAL-TET-DOX	7	1600	3200	3200	1600	800	800	400
4 - SCP	EST-NEO-LIN-NAL-NOR-ENO-RIF	7	1600	1600	3200	800	800	800	400
8 - SCN	EST-NEO-OXA-AMP-AMO-NAL-TET	7	1600	3200	1600	800	800	1600	800
16 - SCN	EST-NEO-ERI-LIN-AMP-AMO-TET	7	3200	3200	1600	1600	800	800	800
21 - SCN	EST-NEO-ERI-LIN-AMP-AMO-TET	7	1600	3200	3200	1600	800	800	1600
31 - SCN	EST-NEO-ERI-LIN-AMP-AMO-NAL	7	1600	3200	3200	800	400	800	1600
39 - SCN	EST-NEO-OXA-AMO-NAL-CIP-NOR	7	1600	3200	1600	800	800	800	1600
36 - SCP	EST-NEO-LIN-NAL-NOR-ENO-TET-RIF	8	1600	3200	1600	1600	800	800	1600
43 - SCN	EST-NEO-ERI-LIN-CRO-AMP-AMO-RIF	8	1600	3200	1600	1600	800	1600	800
34 - SCN	NEO-ERI-LIN-OXA-AMP-AMO-TET-DOX-RIF	9	800	3200	1600	800	800	800	1600
35 - SCN	EST-NEO-LIN-AMO-NAL-NOR-ENO-TET-RIF	9	1600	3200	1600	800	800	800	1600
44 - SCP	EST-NEO-LIN-AMP-NAL-NOR-TET-DOX-RIF	9	1600	3200	3200	1600	1600	800	800

**Tabela 2** - Susceptibilidade de *Staphylococcus sp* frente a diferentes agentes antimicrobianos e relação com a atividade antimicrobiana de Óleos essenciais e Frações Majoritárias de especiarias. (continuação...)

6 – SCN	EST-NEO-ERI-LIN-OXA-CRO-AMP-AMO-NAL-RIF	10	800	1600	3200	3200	800	800	200
15 - SCN	EST-NEO-ERI-LIN-OXA-CRO-AMP-AMO-NAL-RIF	10	3200	3200	1600	3200	800	800	800
10 - SCN	EST-NEO-ERI-LIN-OXA-CRO-AMP-NAL-CIP-NOR-ENO	11	1600	1600	3200	1600	800	800	800
11 – SCP	EST-NEO-LIN-CRO-AMP-AMO-NAL-NOR-ENO-TET-DOX-RIF	12	1600	1600	1600	1600	800	800	400
17 - SCN	EST-NEO-ERI-LIN-CRO-AMP-AMO-NAL-NOR-TET-DOX-RIF	12	800	3200	1600	3200	800	1600	1600
25 – SCP	EST-NEO-ERI-OXA-AMP-AMO-NAL-CIP-NOR-ENO-TET-DOX-RIF	13	800	3200	1600	1600	800	800	1600

OEs = Óleos Essenciais; FMs = Frações Majoritárias; CIM = Concentração Inibitória Mínima; Ov = *Oreganum vulgare*; Lg = *Lippia graveolens*; Cz = *Cinnamomum zeylanicum*; Tv = *Thymus vulgaris*; cv = carvacrol; cn = cinamaldeído; tm = timol; n°R = número de resistência a agentes antimicrobianos; SCN = *Staphylococcus coagulase negativa*; SCP = *Staphylococcus coagulase positiva*



**Figura 1** – Comparação das susceptibilidades de isolados *Staphylococcus sp* (coagulase positiva (SCP) versus coagulase negativa (SCN)) quando submetidos as atividades antimicrobianas (CIM = Concentração Inibitória Mínima e CBM = Concentração Bactericida Mínima) dos óleos essenciais e de frações frajoritárias. NS = não significativas, pelo teste de Mann-Withney, P=0,05

## CAPÍTULO 4

### DISCUSSÃO GERAL

Os rebanhos leiteiros de caprinos e bovinos estão sujeitos a mastites causadas por *Staphylococcus sp.* que podem apresentar diversas características de patogenicidade e resistência. Fatores diversos podem predispor diferentes grupos de microrganismos como causa da mastite. Em caprinos, é mais comum que as mastites sejam causadas por bactérias contagiosas do que por origem ambiental; assim, entre as mais isoladas estão os *Staphylococcus epidermidis*, genericamente nomeados “coagulase negativa” (MORONI et al., 2005; LANGONI et al., 2006). Por outro lado, em bovinos SCHUKKEN et al., (2009) citam a importante participação de *Staphylococcus sp.* “coagulase positiva” nos casos de mastite.

Numa interpretação genérica, com base nas médias das CIMs e nas CBMs, o presente estudo evidenciou que as atividades dos óleos de orégano e tomilho foram superiores a de canela. Resultados semelhantes foram observados por NOSTRO et al., (2004), que avaliaram a suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) e aos resultados observados por SANTURIO et al. (2007), ao avaliarem a suscetibilidade de sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. Nesse sentido, ao se caracterizar a atividade antimicrobiana, em isolados de bovinos e caprinos frente às frações majoritárias dos óleos essenciais, foi observado que o carvacrol, timol e o cinamaldeído, principais frações do orégano, do tomilho e da canela respectivamente, apresentaram algumas diferenças; o carvacrol e timol apresentaram maior atividade quando comparados ao trans cinamaldeído o que está de acordo com os achados de HELANDER et al.(1998). Nos isolados de caprinos, foi observado que ao cinamaldeído apresentou CIMs menores que o timol, o que está de acordo com os achados de BASKARAN et al. (2009). Conforme SANTURIO et al. (2007) a capacidade de inibição dos óleos essenciais de tomilho e orégano estão diretamente correlacionados com a quantidade dos componentes fenólicos carvacrol e timol. Esta correlação também foi observada por SANTOYO et al. (2006) onde óleos essenciais ricos somente na fração majoritária de carvacrol, apresentaram atividades antimicrobianas maiores.

No Brasil, a maioria dos agentes utilizados para tratamento da mastite caprina são produtos comerciais registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para tratamento de mastite bovina. Sendo assim, é importante que pesquisas no

desenvolvimento de novos produtos sejam, também, direcionadas para atender necessidades da produção leiteira de caprinos. Os resultados obtidos indicam que existe certo grau de especificidade para isolados de caprinos e bovinos (**ARTIGOS**). Portanto, a susceptibilidade a drogas antibacterianas e pesquisas de fatores genéticos de resistência ainda serão alvos de novas buscas. Nesse sentido KWIECINSKI et al. (2009) relatam que isolados de *Staphylococcus aureus* são potenciais produtores de biofilmes, apresentam maior resistência a ação de antibióticos e às defesas do hospedeiro, resultando em persistência e dificuldade ao tratamento das infecções.

## **CAPÍTULO 5**

### **CONCLUSÕES**

1. Verificou-se que os óleos essenciais de sálvia, manjeriço, alecrim e gengibre não demonstram atividade antibacteriana nas condições e concentrações testadas.
2. Os óleos essenciais de orégano e tomilho apresentam atividades antimicrobianas (CIM e CBM) similares e superiores ao óleo essencial de lipia e canela. Enquanto que as frações majoritárias apresentam atividades antimicrobianas em concentrações menores das encontradas para os óleos essenciais.
3. A caracterização de subgrupos por resistência a drogas antibacterianas e espécies não determinam diferenças de susceptibilidade a óleos essenciais e frações majoritárias.
4. O óleo essencial de lipia e a fração majoritária timol apresentam atividades em concentrações menores para isolados de bovinos, do que em relação aos de caprinos. Isso indica que existe um grau de especificidade para cada grupo pesquisado.

## CAPÍTULO 6

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDURAHMAN, O. A. et al. Relations between udder infection and somatic cells in camel (*Camelus dromedarius*) milk. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 36, n. 4, p. 423-431, 1995.

ALMEIDA, R. A. et al. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 6, p. 1021-1026, Jun 1996.

AGÊNCIA NACIONAL de VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução CNNPA nº 12, de 1978**, p. 60.

ARCHER, G. L. *Staphylococcus aureus*: A Well-Armed Pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, p. 1179-1181, May 1998.

BARKEMA, H. W. et al. Invited review: The role of contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4717-4729, Oct 2009.

BASKARAN, S.A. et al. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1423-1429, Apr 2009.

BEAN, N. H.; GRIFFIN, P. M. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 9, p. 804-817, 1990.

BENCHAAR, C. et al. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4352-4364, 2006.

BERGHASH, S. R. et al. Effects of antibiotic treatment of nonlactating dairy cows on antibiotic resistance patterns of bovine mastitis pathogens. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 24, n. 5, p. 771-776, Nov 1983.

BRITO, M. A. V. P. et al. Minimum inhibitory concentrations for ten antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 2001, n. 5, p. 531-537, Oct 2001.

BRUGALLI, I. et al. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. **In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS**, 1., 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, p. 167-182, 2003.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters Applied Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 162-167, 2003.

CÁCERES, A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, 1999.

CARDOZO, P.W. et al. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum and a mixture of cinamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high concentrate diet. **Journal Animal Science**, v.84, p. 2801–2808, 2006.

CASAMIGLIA, S. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. **Journal of Dairy Science**. v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

COLLI, V. C.; PIZZOLITTO, A. C.; RADDI, M. S. G. Determinação da resistência de *Staphylococcus aureus*: um desafio? **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 1, p. 99-102, 2009.

CIFTCI, A. et al. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 254-26, 2009.

COSTA, L. M. et al. Análise da sensibilidade do *Staphylococcus aureus* hospital aos antimicrobianos no período 1988-1993. **In: Programa Oficial e Resumos de Trabalhos do VIII Congresso Brasileiro e Infectologia**, Porto Alegre, Resumo nº 111. p. 87 1994.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. **Revista de Educação Continuada do CMRV-SP**, v.1, p.3-9, 1998.

DE, U.K.; MUKHERJEE, R. Expression of cytokines and respiratory burst activity of milk cells in response to *Azadirachta indica* during bovine mastitis. **Tropical Animal Health Production**, p. ....,2008.

DELAMARE, A. P. L. et al. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, p. 603-608, 2007.

DINGWELL, R. T. et al. Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for cure of *Staphylococcus aureus* infection in the dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 159-168, Jan 2003.

DOMADIA, P. et al. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by inamaldehyde. **Biochemical Farmacology**, v.74, n.6, p.831-840, 2007.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 22, p. 308-316, 2000.

EBERHART, R. J. Management of dry cows to reduce mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 6, p. 1721-1732, Jun 1986.

ELGAYYAR, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1019-1024, 2001.

ERSKINE, R. J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F. J. Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary Clinical North America Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 109-138, Mar 2003.

FANG, W.; PYORALA, S. Mastitis-causing *Escherichia coli*: serum sensitivity and susceptibility to selected antibacterials in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 1, p. 76-82, Jan 1996.

FARMACOPEA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA. X Edizione. Roma: Istituto Poligrafico e Zecco dello Stato, 1998. V.I, p.206-210.

FERREIRA, L. M. et al. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p-1228-1234, 2006.

FIGUEIREDO, J.B. Mamite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa. In: Congresso Brasileiro De Reprodução Animal, Belo Horizonte: **Anais:... CBRA**, 1995, v.11, 180p.

FREITAS, M.F.L. et al. Perfil de Sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto Biologia**, São Paulo, v. 72, n. 2, p.171-177, 2005.

FU, Y. et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytother Research**, v. 21, n. 10, p. 989-994, Oct 2007.

GIANNENAS, I. et al. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. **Archive Animal Nutrition** v. 57, p.99–106, 2003.

HAMILL, R. J.; VANN, J. M.; PROCTOR, R. A. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by culture bovine aortic endothelial cells: models for postadherence events in endovascular infections. **Infection Immunology**, v. 54, p. 833-836, 1986.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, Jun 1999.

HELANDER, I.K. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, p.3590-3595, 1998.

HUIJPS, K. et al. Costs and efficacy of management measures to improve udder health on Dutch dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, p. 115-124, Jan 2010.

HUIJPS, K.; LAM, T. J.; HOGEVEEN, H. Costs of mastitis: facts and perception. **Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 1, p. 113-120, Feb 2008.

KALEMBA, D.; KUSEWICZ, D.; SWIADER, K. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 3, p. 288-291, May 2002.

KUNG, L. Jr. et al. A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.4793–4800, 2008.

KWIECINKI, J.; EICK, S.; WÓJCIK, K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 4, p. 343-347, April 2009.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LANGONI, H., DOMINGUES, P.F., BALDINI, S. Goat mastitis: their agents and susceptibility face to the antimicrobial. **Revista brasileira Ciência Veterinária**, v.13, p. 51-54, 2006.

LARANJA DA FONSECA; SANTOS, M.V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo-MG: Lemos Editorial, 2000, 176p.

LEE, K. W. et al. Essential oils in broiler nutrition. **International Journal of Poultry Science**. v. 3, p. 738–752. 2004.

LEE, J. H. Methicillin (oxacilin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied. Environmental Microbiological**, v. 69, p-6489-6494, 2003.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LOUHI, M. et al. Relevance of sensitivity testings (MIC) of *S. aureus* to predict the antibacterial action in milk. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 39, n. 4, p. 253-262, Jun 1992.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal Medicine*, v. 339, n.8, p. 520-532, 1998.

MANZANILLO, E.G. et al. Effects of plant extracts on performance and lower gut microflora of early wened piglets. **Journal Animal Science**, v. 79, suppl. 1, 473p. 2001.

MITSCH, P. et al. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. **Poultry Science**, v.83, p. 669–675, 2004.

MORONI, P. Subclinical Mastitis and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian herds. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 1694-1704, 2005.

MUKHERJEE, R.; DASH, P.K.;RAM, G.C. Immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* (L) in bovine subclinical mastitis. **Research in Veterinary Science**. v.79, p.37-43, 2005.

NICKERSON, S. C. Control of heifer mastitis: antimicrobial treatment-an overview. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 128-135, Feb 16 2009.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**. n. 56, p.519–523, 2007.

NOSTRO A., BLANCO A.R., CANNATELLI, M.A. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, p.191-195, 2004.

NOVAK, F. R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em leite humano ordenhado. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999. 102p.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. Vencendo a luta contra a mastite. 1 ed. Campinas: Milkbuzz, 191p. 2002.

PLANTAMED. Plantas e ervas medicinais e fitoterápicos. Disponível em <[www.plantamed.com.br](http://www.plantamed.com.br)> acesso em 16 de março de 2010.

PLATEL, K.; SRINIVASAN K. Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 55-59, 2000.

PHILPOT, W. N. Control of mastitis by hygiene and therapy. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 1, p. 168-176, Jan 1979.

POL, M.; RUEGG, P.L. Treatment Practices and Quantification of Antimicrobial Drug Usage in Conventional and Organic Dairy Farms in Wisconsin. **Journal of Dairy Science**. v. 90, n. 1, p.249–261, 2007.

POZZATTI, P. et al. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 12-15, Jan 2010.

POZZATTI, P. et al. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida spp.* **Can J Microbiol**, v. 54, n. 11, p. 950-956, Nov 2008.

PRESTES, D. S.; FILATI, A.; CECIM, M. S. Suscetibilidade à mastite: Fatores que a influenciam- Uma revisão. **Revista Faculdade Zootecnia Veterinária e Agronomia**, v. 9, n. 1, p. 48-59, 2003.

PYORALA, S. In vitro studies as supporting evidence on the efficacy of antimicrobials for mastitis treatment. **Journal Applied Microbiology**, v. 107, n. 6, p. 2116-2117, Dec 1 2009.

PYORALA, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 3-8, Feb 2009.

QUEIROGA, C.L. et al. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. **Fitoterapia**, v.78 p.327–328, 2007.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. Editora Atheneu – São Paulo, 116p. 2005.

ROTA, M.C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, n.19 p.681–687, 2008.

SAINI, R. et al. Oregano essential oil reduces necrotic enteritis in broilers in Proc. 52nd West. Poultry Dis. Conf., Sacramento, CA. Vet Extension, Univ. Calif., Davis. p. 95–97, 2003b.

SAINI, R. et al. Oregano essential oil reduces the expression of coccidiosis in broilers. Proc. 52nd West. Poultry Dis. Conf., Sacramento, CA. Vet. Extension, Univ. Calif., Davis. P. 97–98, 2003a.

SALGUEIRO, L. R. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. **Planta Medica**, v. 69, n. 1, p. 80-83, 2003.

SANTOYO, S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 4, p. 790-795, 2005.

SANTURIO, J. M. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n.3, 2007.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202-1205, 1996.

SCHNELLMANN, C. et al. Presence of New *mecA* and *mph(C)* Variants Conferring Antibiotic Resistance in *Staphylococcus spp.* Isolated from the Skin of Horses before and after Clinic Admission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4444–4454, Dec 2006.

SCHOENFELD, E. M.; MCKAY, M. P. Mastitis and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): the calm before the storm? **Journal of Emergency Medicine**, v. 38, n. 4, p. e31-34, May 2010.

SCHUKKEN, Y.H. et al. CNS mastitis: Nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, v.134, p.9-14, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: 1999.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 118-122, Feb 1998.

SORDILLO, L. M.; CONTRERAS, G. A.; AITKEN, S. L. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. **Anim Health Res Rev**, v. 10, n. 1, p. 53-63, Jun 2009.

SOUZA, M. P. et al. Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza: Edições UFC/Laboratório de Produtos Naturais, 1991.

STRUELLENS, M.J. et al. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2599-2602, 1992.

TASSOUL, M.D.; SHAVER, R.D. Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.92, n.4, p. 1734-1740, 2009.

THORBERG, B. M. et al. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4962-4970, Oct 2009.

VARGAS, A. C. et al. Alcoholic propolis extract: antimicrobial activity. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, jan-fev 2004.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Vet Microbiol**, v. 92, n. 1-2, p. 179-185, Mar 20 2003.

VIEGI, L., et al. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, p. 221–244, 2003.

VIRDIS, S. et al. Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative *Staphylococci* Isolated from Goats with Subclinical Mastitis. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, p. 3-6, 2010.

WAGNER, S. A.; JONES, D. E.; APLEY, M. D. Effect of endotoxic mastitis on epithelial cell numbers in the milk of dairy cows. **Am J Vet Res**, v. 70, n. 6, p. 796-799, Jun 2009.

WELLENBERG, G. J.; VAN DER POEL, W. H.; VAN OIRSCHOT, J. T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 27-45, Aug 2002.

YANG, W. Z. et al. Effects of Garlic and Juniper Berry Essential Oils on Ruminant Fermentation and on the Site and Extent of Digestion in Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5671–5681, 2007.