

KAMYLLA RAFAELLA SENA ALBUQUERQUE

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS ESSENCIAIS
SOBRE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* CAUSADORAS DA
MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A345a
2017
Albuquerque, Kamylla Rafaella Sena, 1988-
Atividade antibacteriana e antibiofilme de óleos essenciais sobre
estirpes de *Staphylococcus aureus* causadoras da mastite bovina /
Kamylla Rafaella Sena Albuquerque. - Viçosa, MG, 2017.
xiii,78f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.52-71.

1. Mastite. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. Essências e óleos
essenciais. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em
Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 636.2089819

KAMYLLA RAFAELLA SENA ALBUQUERQUE

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS ESSENCIAIS
SOBRE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* CAUSADORAS DA MASTITE
BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

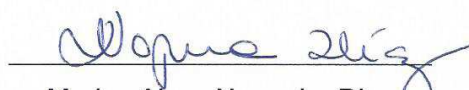
APROVADA: 30 de junho de 2017.



Mateus Ferreira Santana



Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
(Coorientadora)



Marisa Alves Nogueira Diaz
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus, pois é pela fé que enfrentamos os obstáculos e obtemos vitórias;

À UFV e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade;

Ao CNPq e Fapemig pelo auxílio financeiro;

À Profa. Marisa Alves Nogueira Diaz pela oportunidade, pela orientação, pelo acompanhamento durante toda pesquisa e pelos ensinamentos transmitidos;

À Profa. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira pelo apoio e pelas células MAC-T cedidas;

Ao José Luiz do LASA (Laboratório de Síntese de Agroquímicos- UFV) pelos cromatogramas dos óleos essenciais;

À EMBRAPA pelas bactérias cedidas utilizadas no presente estudo;

Aos meus pais e irmãos pelo apoio e carinho;

Ao meu esposo pelo apoio, compreensão e incentivo;

Aos colegas do laboratório Bionat;

Ao acadêmico João Pedro pelo auxílio nos ensaios microbiológicos;

Ao doutorando Viktor pelas análises de citotoxicidade e auxílio nos testes biológicos;

Às amigas de sempre Adna, Nayane, Débora, Poliane, Thaynara, Josiane e Shena que apesar da distância sempre me apoiaram;

Às novas amigas Gislaine, Janaína, Fernanda, Laís e Camila que tornaram ainda mais especial os meus dias, pelo apoio e por estarem sempre dispostas a ajudar.

BIOGRAFIA

Kamylla Rafaella Sena Albuquerque, filha de Israel da Silva Sena e Helena Alves Sena, nasceu em 25 de fevereiro de 1988, na cidade de Ceres, estado de Goiás.

Em março de 2006, iniciou o curso de Bacharelado em Farmácia na Faculdade de Ceres, FACERES, Ceres – Goiás, concluindo-o em janeiro de 2011.

Em março de 2016, ingressou no Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Bioquímica Aplicada, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação da Professora Marisa Alves Nogueira Diaz e em junho de 2017 submeteu-se ao exame final de defesa da dissertação.

SUMÁRIO

LISTAS DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
3.1. Objetivo Geral	7
3.2 Objetivos Específicos	7
4. MATERIAL E MÉTODOS	8
4.1Obtenção dos óleos essenciais	8
4.2 Microrganismos e meios de cultivo.....	14
4.3 Triagem da avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais	15
4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais	15
4.5 Determinação da atividade antibacteriana por diluição em leite	16
4.6 Avaliação da interação entre óleos essenciais e cefoperazona ou combinados.....	18
4.7 Produção de biofilmes na presença dos óleos essenciais	19
4.8 Avaliação da citotoxicidade.....	20
4.9 Seleção e manipulação do pós-dipping	21
4.10 Produção de biofilmes na presença da formulação contendo óleos essenciais.....	21
4.11 Determinação da atividade antibacteriana dos pós-dipping por diluição em leite	22
4.12 Análises cromatográficas dos óleos essenciais	23
4.13 Análises Estatísticas	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24

5.1 Triagem preliminar da atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente à isolados clínicos de mastite	24
5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais ativos	26
5.3 Avaliação da atividade dos óleos essenciais sobre biofilme em formação	29
5.4 Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de diluição em leite.	33
5.5 Avaliação da interação entre os óleos essenciais e o antibiótico cefoperazona ou combinados	35
5.6 Avaliação da toxicidade óleos essenciais ativos frente a células do epitélio mamário bovino MAC-T	38
5.7 Avaliação da atividade dos óleos essenciais ativos sobre biofilme em formação.....	40
5.9 Avaliação da atividade antibacteriana das formulações de pós-dipping pelo método de diluição em leite	42
5.10 Análises cromatográficas dos óleos essenciais	44
5.10.1 Cromatograma do óleo essencial <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Canela) ..	44
5.10.2 Cromatograma do óleo essencial <i>Coriandrum sativum</i> (Coentro)	46
5.10.3 Cromatograma do óleo essencial <i>Origanum vulgare</i> (Orégano)	47
5.10.4 Cromatograma do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (Cravo)	48
5.10.5 Cromatograma do óleo essencial <i>Thymus vulgaris</i> (Tomilho)	49
6. CONCLUSÃO	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS.....	72

LISTAS DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CG/EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
CIB	Concentração Inibitória de Biofilme
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bacteriana Mínima
DMSO	Dimeltisufóxido
MAC-T	<i>Bovine Mammary Epithelial Cells</i>
D.O.	Densidade Ótica
DP	Desvio Padrão
MH	Mueller-Hinton
mL	Mililitro
MTT	Ensaio de Metiltiazol
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
UFV	Universidade Federal de Viçosa

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema das concentrações finais do óleo essencial e do antibiótico, ou dos OEs combinados para determinação do tipo de interação entre eles. Concentração do óleo essencial em vermelho e do antibiótico em preto.....18
- Figura 2.** Estrutura química do cinamaldeído, componente majoritário do óleo essencial de *C. zeylanicum*.....29
- Figura 3.** Efeito dos óleos essenciais na produção de biofilme por *Staphylococcus aureus*. **A** óleos essenciais nas concentrações 2CIM e CIM, **B** CIM/2, **C** CIM/4 e **D** efeito do cinamaldeído na produção de biofilme, nas concentrações 2CIM, CIM, CIM/2 e CIM/4. * $p < 0.05$, comparados com os controles tratados com veículo. Cada barra representa \pm desvio padrão (DP).....30
- Figura 4.** Avaliação da citotoxicidade dos óleos essenciais sobre células MAC-T...39
- Figura 5.** Descrição da porcentagem de inibição das soluções pós-dipping a 3% e 1% sobre o biofilme em formação do isolado de *S. aureus* **A** SA4075 **B** SA4125 e **C** SA4158: *C. zeylanicum* (1), *C. sativum* (7), *O. vulgare* (16), *S. aromaticum* (18) e *T. vulgaris* (19)..... 41
- Figura 6.** Cromatograma do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*.....44
- Figura 7.** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *C. zeylanicum*45
- Figura 8.** Cromatograma do óleo essencial de *Coriandrum sativum*.....46
- Figura 9.** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *C. sativum*....46
- Figura 10.** Cromatograma do óleo essencial de *Origanum vulgare*.....47
- Figura 11.** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *O. vulgare*...47
- Figura 12.** Cromatograma do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.....48
- Figura 13.** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *S. aromaticum*.....48
- Figura 14.** Cromatograma do óleo essencial de *Thymus vulgaris*..... 49

Figura 15. Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *T. vulgaris*...49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação dos óleos essenciais utilizados.....	13
Tabela 2. Nome comum, nome científico, uso na medicina alternativa e principais constituintes dos óleos essenciais usados.....	6
Tabela 3. Sensibilidade dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a antibióticos de diferentes classes. (R) resistente e (S) sensível.....	
Tabela 4. Composição e quantidade dos componentes usados na formulação dos pós-dippings à base dos óleos essenciais, quantidade medida em mililitros	21
Tabela 5. Triagem preliminar da atividade antibacteriana de 20 óleos essenciais de plantas condimentares ou culinárias pelo teste de microdiluição com volumes fixos. Os resultados estão expressos em mg/mL.....	25
Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais e cefoperazona frente aos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> , SA3008, SA3828, SA3917, SA4075, SA4125, SA4157, SA4158 e SA4182.....	27
Tabela 7. Efeito dos óleos essenciais de plantas condimentares na multiplicação de microrganismos causadores de mastite no leite <i>in vitro</i>	34
Tabela 8. Avaliação do tipo de interação dos óleos essenciais ativos com a cefoperazona para isolados de mastite.....	36
Tabela 9. Interação entre os óleos essenciais sobre estirpes de <i>S. aureus</i>	37
Tabela 10. Efeito das formulações pós-dipping contendo óleos essenciais de plantas condimentares na multiplicação de microrganismos causadores de mastite no leite <i>in vitro</i>	45

RESUMO

ALBUQUERQUE, Kamylla Rafaella Sena, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2017. **Avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme de óleos essenciais sobre estirpes de *Staphylococcus aureus* causadoras da mastite bovina.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, Virgínia Ramos Pizziolo e Gaspar Diaz.

A mastite bovina é uma doença caracterizada pela inflamação mamária, causada principalmente pelo agente etiológico *Staphylococcus aureus*. O protocolo de tratamento é a antibioticoterapia, mas a liberação de resíduos no leite e o surgimento de estirpes resistentes tornaram necessário o emprego de novas estratégias. Desta forma, muitos óleos essenciais (OEs) derivados de plantas e seus compostos isolados podem apresentar atividade antibacteriana, tornando-se uma alternativa viável para o tratamento de infecções. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de vinte óleos essenciais de plantas condimentares, puros e incorporados a soluções pós-dipping frente a diferentes estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. Os 20 OEs de plantas condimentares foram investigados quanto a sua atividade antibacteriana através do teste de microdiluição com valores fixos. Na triagem foram utilizadas oito estirpes de *S. aureus* isoladas de campo, nos demais testes apenas três estirpes. Para os OEs que apresentaram atividade antibacteriana determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Foi avaliada a atividade antibacteriana pelo método de diluição em leite para mimetizar o ambiente do úbere. A seguir foram realizados testes de interação, pelo método de *checkerboard* entre os OEs e o antibiótico cefoperazona, e também a interação entre os OEs combinados. A produção de biofilme na presença dos OEs foi detectada por espectrofotometria. Posteriormente foi analisada a citotoxicidade dos OEs em células alveolares mamária bovinas (MAC-T). Apenas 5 OEs apresentaram atividade antibacteriana, OE de cravo, coentro, canela, tomilho e orégano. O OE mais ativo foi o coentro com CIM de 0,15mg/mL. Os OEs foram eficazes no teste de diluição em leite, com valores de inibição entre 10 mg/mL e 20 mg/mL. Os OEs não apresentaram sinergismo quando combinados ao cefoperazona, no entanto alguns demonstraram interação aditiva. Os OEs de orégano e tomilho apresentaram interação aditiva em todas as estirpes. Todos os óleos inibiram a formação de biofilme em doses inibitórias

de CIM e 2CIM, porém em doses CIM/2 e CIM/4 o OE de canela aumentou a produção de biofilme. Nenhum dos OEs apresentou citotoxicidade as células MAC-T, no entanto aumentaram a proliferação destas células, indicando uma possível ação regeneradora tissular. A formulação de pós-dipping contendo coentro, orégano e canela a 1% cada foram efetivas tanto na inibição do biofilme quanto no teste de diluição por caldo. Os resultados sugerem que esses óleos essenciais sejam considerados promissores para o emprego como agentes profiláticos ou como tratamento de mastite bovina.

ABSTRACT

ALBUQUERQUE, Kamylla Rafaella Sena, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2017. **Evaluation of antibacterial and antibiofilm activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, Virgínia Ramos Pizziolo and Gaspar Diaz.

Bovine mastitis is a disease characterized by breast inflammation, mainly caused by the etiological agent *Staphylococcus aureus*. The treatment protocol is antibiotic therapy, but the release of residues in milk and the emergence of resistant strains have made it necessary to employ new strategies. In this way, many essential oils (OEs) derived from plants and their compounds isolated may present antibacterial activity, making it a viable alternative for the treatment of infections. The objective of this work was to evaluate the antibacterial and antibiofilm activity of twenty essential oils from condiment plants, pure and incorporated into post-dipping solutions against different strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. The 20 OEs of condiment plants were investigated for their antibacterial activity through the microdilution test with fixed values. In the screening, eight strains of *S. aureus* isolated from the field were used, in the other tests only three strains. For OEs that presented antibacterial activity, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined. The antibacterial activity was evaluated by the milk dilution method to mimic the udder environment. Interaction tests were performed by the checkerboard method between the OEs and the antibiotic cefoperazone, as well as the interaction between the combined OEs. Biofilm production in the presence of OEs was detected by spectrophotometry. Subsequently, the cytotoxicity of OEs in bovine mammary alveolar cells (MAC-T) was analyzed. Only 5 OEs presented antibacterial activity, clove OE, coriander, cinnamon, thyme and oregano. The most active OE was coriander with MIC of 0.15mg / mL. The OEs were effective in the milk dilution test, with inhibition values between 10 mg / mL and 20 mg / mL. OEs did not show synergism when combined with cefoperazone, however some showed additive interaction. The OEs of oregano and thyme showed additive interaction in all strains. All the oils inhibited the formation of biofilm in inhibitory doses of MIC and 2CIM, but at CIM / 2 and CIM / 4 doses, cinnamon EO increased biofilm production. None of the OEs presented cytotoxicity to

the MAC-T cells, however, they increased the proliferation of these cells, indicating a possible tissue regenerative action. The post-dipping formulation containing coriander, oregano and cinnamon at 1% each were effective both in inhibiting the biofilm and in the broth dilution test. The results suggest that these essential oils are considered promising for use as prophylactic agents or as a treatment for bovine mastitis.

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira no Brasil é de grande relevância para a economia, tanto pelo rendimento fornecido, quanto pela quantidade de empregos estáveis gerados. Segundo o Censo Agropecuário de 2006, a estimativa é de que aproximadamente 1,35 milhões de propriedades rurais estejam voltadas para a produção leiteira (IBGE, 2011).

No entanto apesar da alta produção de leite no país, o rebanho nacional tem produtividade baixa, aproximadamente 1,471 litros/vaca/ano (PLANO MAIS PECUÁRIA, 2014). Uma das principais razões é a mastite bovina, uma enfermidade do rebanho, caracterizada pela inflamação do parênquima mamário, que acomete principalmente o gado leiteiro e promove uma redução da secreção do leite, assim como a alteração dos seus constituintes principais (CARDOZO *et al.*, 2014). A mastite é responsável por perdas econômicas que vão além da produtividade e qualidade do leite, entre elas estão os gastos em tratamentos, serviços veterinários e medidas preventivas (HOLLAND *et al.*, 2015).

A estimativa do prejuízo em escala mundial relacionada à mastite é de, aproximadamente, US\$ 35 bilhões (RUEGG, 2005). As perdas anuais chegam a US\$ 2 bilhões nos Estados Unidos (RAINARD, 2005). Já no Brasil o prejuízo pode ser ainda maior que o alcançado nos EUA e na Europa (COSTA, 2009), devido a diminuição na produção que pode chegar a 15%, correspondendo a uma perda de 2,4 bilhões de litros de leite/ano (DIAS, 2007). Além das perdas econômicas há ainda um risco potencial à saúde pública, devido a distribuição dos patógenos, através do leite e produtos lácteos. Embora a pasteurização seja uma prática comum, podem ocorrer falhas durante o seu processo, além da existência do comércio informal de leite e seus derivados não pasteurizados. (ALTALHI e HASSAN, 2009). Outra preocupação crescente com o uso indiscriminado de antibióticos no controle e tratamento da mastite, é a transferência de resíduos antimicrobianos para a cadeia alimentar o que contribui o aumento da resistência antibacteriana (ANDREWS *et al.*, 2008; AL-HASAN *et al.*, 2009).

A mastite se manifesta de forma clínica ou subclínica (GOMES e HENRIQUES, 2016). O diagnóstico diferencial da forma clínica é mais simples e os sinais

inflamatórios são mais evidentes, o animal pode apresentar edema, aumento da temperatura local, rigidez da mama além de alterações visíveis do leite, como aparecimento de grumos ou secreção purulenta (BRADLEY, 2002; MIDDLETON *et al.*, 2014). A manifestação subclínica não apresenta sinais inflamatórios no animal ou modificações visíveis no leite, mas devido presença da infecção a composição do leite pode sofrer alteração e algumas mudanças podem ser detectadas, como por exemplo, o aumento de células somáticas que é utilizado como um protocolo ouro para o diagnóstico de mastite subclínica (DUARTE *et al.*, 2015).

Esta doença pode ser ocasionada por fatores como infecção bacteriana ou fúngica e trauma, porém a mastite de origem infecciosa é a mais recorrente e maior causadora de danos na produtividade, já que os agentes etiológicos podem ser transmitidos (OLIVEIRA, 2006; TOZZETTI *et al.*, 2008). Epidemiologicamente, a mastite infecciosa pode se diferenciar entre mastite ambiental ou contagiosa, essa diferenciação ocorre pelo modo de transmissão. Na mastite ambiental os agentes etiológicos estão presentes no ambiente onde vive o animal, já na mastite contagiosa os microrganismos são transmitidos de forma direta, ou seja, de animal para animal (.Os agentes etiológicos predominantes na mastite contagiosa são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, e *Mycoplasma* spp. Na mastite ambiental os patógenos mais frequentemente isolados são *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp. (OLIVEIRA *et al.*, 2011; ABEBE *et al.*, 2016).

Os microrganismos mais comumente encontrados nesta infecção são os *Staphylococcus aureus* (PETON e LOIR, 2013), bactérias Gram-positivas, que se alojam especialmente nas glândulas mamárias podendo ser disseminadas aos outros quartos e animais sadios durante a ordenha. Uma preocupação é a associação constante de surtos alimentares e *S. aureus*, esse patógeno é frequentemente considerado responsável por intoxicação típica ocasionada pela ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas pré-formadas (ZELENY *et al.*, 2015). Carnes, leites e seus derivados são constantemente associados em grandes surtos de intoxicação por *S. aureus* em humanos (WANG *et al.*, 2013; ZELENY *et al.*, 2015).

A capacidade adaptativa destes microrganismos no interior do úbere confere a estes patógenos a possibilidade de multiplicação, o que acarreta infecções subclínicas crônicas que são difíceis de serem detectadas e curadas. (NICKERSON, 2011).

Atualmente, o protocolo para o tratamento da mastite é a antibioticoterapia, porém vários problemas relacionados ao seu uso são relatados na literatura (LIU *et al.*, 2014; MUSHTAQ *et al.* 2016).

O uso de antimicrobianos na cultura leiteira pode contribuir para a resistência antimicrobiana, recentemente a Organização Mundial da Saúde (OMS) aprovou um plano de ação global afim de enfrentar a resistência antimicrobiana e publicou uma lista de agentes patogênicos a serem priorizados em pesquisas de novos antibióticos, dentre esses agentes etiológicos diversos patógenos da mastite bovina foram listados, como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* e *Staphylococcus aureus* (World Health Organization, 2015; World Health Organization 2017).

A liberação de resíduos no leite e/ou acúmulo em tecidos animais comestíveis, que podem ocasionar vários efeitos patológicos em humanos como nefropatia, alergia, doença autoimune e carcinogenicidade, transformou o uso de antibióticos na veterinária objeto de preocupação (NISHA, 2008). Ainda, os resíduos de antibióticos no leite cru interferem também nos processos fermentativos, podendo prejudicar a fabricação de todos os seus derivados, como queijo e iogurtes (GRUNWALD e PETZ, 2003). O tratamento por infusão intramamária de antibióticos, principal protocolo para terapia de mastite, foi apontado como principal fator para a contaminação do leite (PIECH *et al.*, 2016).

Além da problemática anterior, cerca de 40% dos casos de mastite é recorrente e advém de infecções anteriores que foram tratadas com antibiótico de forma ineficaz (GOMES *et al.*, 2016). Os biofilmes são apontados frequentemente como fator para infecções recorrentes (VASUDEVAN *et al.* 2003).

Biofilmes são estruturas formadas por uma matriz complexa de microrganismos envoltos em uma espécie de gel composto principalmente por água (95%), polissacarídeos, proteínas, ADN (ácido desoxirribonucleico) e outros componentes orgânicos, que aderem a superfícies bióticas ou abióticas (FLEMMINGE e WINGENDER, 2010). A matriz exopolimérica acumula diversas substâncias do meio

ambiente tais como proteínas do sangue, sais minerais e envolve as células bacterianas, como uma barreira de proteção (PELGRIFT e FRIEDMAN, 2013).

As etapas envolvidas na formação do biofilme são bastante discutidas em diversas teorias. Dentre todas elas, é consenso que na formação do biofilme, a primeira etapa corresponde ao processo de adesão inicial do microrganismo à superfície a ser colonizada, um processo que pode ser reversível. A etapa seguinte é a produção intracelular de moléculas de adesão, secreção de substâncias poliméricas extracelulares, fixação da estrutura e em seguida a liberação de células ou agregados celulares da estrutura do biofilme (FARIA, 2012).

Dentre os mecanismos envolvidos no processo de conservação dos biofilmes o mais importante está relacionado aos mecanismos de *quórum-sensing*, que se fundamenta basicamente na secreção de liberação de moléculas sinalizadoras e autoindutoras, onde a quantidade secretada aumenta de acordo com a ampliação da densidade da população bacteriana. As moléculas autoindutoras, dependendo da concentração, podem ser detectadas pelas bactérias, o que promove alterações na expressão gênica resultando assim, uma alteração de determinado comportamento. Dessa forma, as bactérias de uma formação de biofilme podem sincronizar suas atividades, agindo como organismos pluricelulares (MARTIN, 2015).

Células bacterianas sésseis são mais suscetíveis à ação de antibacterianos, enquanto bactérias envoltas em biofilme possuem uma proteção extra. A grande maioria dos antibióticos possui ação contra o patógeno, contudo para chegar ao seu local de ação e exercer sua função seria necessário hidrolisar a matriz do biofilme, ação não desempenhada pela grande maioria dos antibióticos disponíveis no mercado (BARZAGANI e ROHLOFF, 2015).

Neste contexto, o uso de novas estratégias se tornou necessário frente ao aumento de bactérias não responsivas a antibióticos, a fim de prevenir e controlar o aparecimento de estirpes multirresistentes (DUARTE, 2006).

Os produtos naturais são substâncias ou compostos sintetizados por seres vivos e apresentam vasta diversidade de estruturas químicas e grupos funcionais além de diferentes aplicações biológicas. Estas características os tornaram fonte indispensável para o desenvolvimento de drogas, cosméticos e outros produtos de interesse da sociedade (BOLZANI, 2016). As plantas possuem dois tipos de

metabolismo, o primário pelo qual sintetizam as substâncias essenciais para sua manutenção e o secundário que por meio de vias bioquímicas específicas, transformam os metabólitos primários em metabólitos secundários. (WURTZEL e KUTCHAN, 2016). Estes compostos possuem diferentes funções para as plantas, como proteção contra herbivoria, infecção bacteriana ou fúngica, ação antioxidante, proteção UV e alelopatia. Estes produtos químicos com diversas funções biológicas auxiliam a sua sobrevivência, garantindo vantagem em um ambiente ecológico complexo, o que explica a variedade estrutural destas moléculas. Os metabólitos secundários podem ser classificados de acordo com sua biossíntese, as principais classes são: os terpenos derivados dos isoprenos, os alcaloides derivados de aminoácidos e os fenilpropanoides derivados de aminoácidos aromáticos e acetil-CoA (DZIGGEL *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos por plantas aromáticas, constituídos por combinações complexas de estruturas lipossolúveis de baixo peso molecular, como por exemplo monoterpenos, sesquiterpenos ou fenilpropanóides, compostos voláteis capazes de gerar aromas ou sabores, lipossolúveis, se apresentam no estado líquido a temperatura ambiente e possuem aspecto incolor ou claro (FALEIRO e MIGUEL, 2013). A principal função destes óleos para os vegetais é de proteção contra herbivoria, bactérias e fungos (TOHIDI *et al.*, 2017).

A síntese destes compostos pode ocorrer em todos os órgãos das plantas, como flores, folhas, sementes, raízes, frutos e podem ser armazenados nas células secretoras, células da epiderme, cavidades, ou tricomas glandulares (WASSEM e LOW, 2014; PADALIA *et al.*, 2015). A variabilidade da constituição dos óleos essenciais é inerente a cada espécie, porém o teor destes constituintes são influenciados por condições ambientais como, sazonalidade, altitude, temperatura entre outros (DHOUIOUI *et al.*, 2016). Aproximadamente 35% dos óleos essenciais pesquisados possuem ação antimicrobiana e estudos apontam que existe uma relação entre esta atividade e a composição química dos óleos essenciais. (BAYDAR *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A atividade antibacteriana destes compostos pode ocorrer pela desestruturação do envelope celular, destruição da membrana citoplasmática

causando danos na permeabilidade, alteração de sistemas enzimáticos essenciais para a sobrevivência do microrganismo e até lise celular (AMINZARE *et al.* 2016; ZHANG *et al.* 2016). Em bactérias Gram-positivas os óleos essenciais possuem maior efeito, devido à estrutura da parede celular destes patógenos compostas principalmente por peptidoglicanos, o que permite que as moléculas hidrofóbicas do óleo penetrem nas células. A ação dos óleos essenciais em bactérias depende da quantidade administrada, em menores doses interferem nas enzimas envolvidas na produção de energia, já em maiores concentrações podem desnaturar proteínas (NAZZARO *et al.*, 2013).

Além da atividade antibacteriana, muitos óleos essenciais e seus compostos isolados se mostraram eficazes no combate a biofilme em formação e pré-formado, tornando-se uma alternativa viável para o tratamento de infecções com bactérias com capacidade de formação de biofilme como fator de virulência ou em conjunto com antibióticos que não afetam formas sésseis (MILADI *et al.*, 2017).

As plantas medicinais estão sendo cada vez mais utilizadas para o tratamento de doenças infecciosas, visando diminuir as desvantagens trazidas pelo uso de antimicrobianos tal como a resistência bacteriana. Os óleos essenciais correspondem a forma de apresentação que concentra a maior quantidade de fitoconstituintes com propriedades biológicas ativas (COSTA *et al.*, 2009; POZZATTI *et al.*, 2009), o que justifica a sua aplicabilidade nas indústrias de cosméticos e alimentos (MOSCHONAS *et al.*, 2015).

Neste trabalho objetivou-se avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de óleos essenciais de plantas condimentares sobre diferentes estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina.

2. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de óleos essenciais (OE) puros e associados a solução pós-dipping sobre bactérias causadoras de mastite bovina.

3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais;
- ❖ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos OEs ativos;
- ❖ Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais por diluição;
- ❖ Avaliar o efeito dos óleos essenciais ativos sobre o biofilme em formação;
- ❖ Avaliar a interação entre os óleos essenciais e a cefoperazona ou combinados;
- ❖ Avaliar a toxicidade dos OEs ativos em linhagem de células MAC-T;
- ❖ Manipular uma formulação de pós-dippings;
- ❖ Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* por diluição dos pós-dippings;
- ❖ Avaliar o efeito dos pós-dippings sobre o biofilme bacteriano em formação;
- ❖ Análise cromatográfica dos óleos essenciais.

4. MATERIAL E MÉTODOS





4.1 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados no presente estudo (Tabela 1) foram extraídos em escala industrial por hidrodestilação a arraste de vapor pelas empresas Empório Laszlo (canela, alecrim, noz moscada, laranja, limão siciliano, café, coentro, louro, hortelã pimenta, curry e manjerona) e pela empresa Ferquima Ind. e Com. de Óleos Essenciais (hortelã, gengibre, orégano, tomilho branco, cravo) e pelo Laboratório de Síntese de Agroquímicos – UFV (LASA) (melaleuca, tangerina, lima e eucalipto). Os óleos essenciais das empresas Laszlo e Ferquima foram adquiridos comercialmente, enquanto os óleos do LASA foram doados pelo Laboratório de Síntese de Agroquímicos. Na tabela 2 (Oliveira, 2016 com modificações), estão descritas as plantas que contém óleos essenciais utilizados no presente estudo.






Tabela 1. Identificação dos óleos essenciais utilizados.




Família	Espécie	Nome popular	Parte utilizada	Identificação
Lauraceae	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Canela do ceilão	cascas	1
Rutaceae	<i>Citrus aurantiifolia</i>	Lima comum	cascas dos frutos	2
Rutaceae	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.	Limão siciliano	cascas dos frutos	3
Rutaceae	<i>Citrus reticulata</i>	Tangerina	cascas dos frutos	4
Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i>	Laranja doce	cascas dos frutos	5
Rubiaceae	<i>Coffea arábica</i> L.	Café verde	sementes	6
Apiaceae	<i>Coriandrum sativum</i>	Coentro	folhas	7
Myrtaceae	<i>Corymbia citriodora</i>	Eucalipto limão	folhas	8
Lauraceae	<i>Laurus nobilis</i>	Louro	folhas	9
Myrtaceae	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Melaleuca	folhas	10
Lamiaceae	<i>Mentha arvensis</i>	Hotelã do campo	folhas	11
Lamiaceae	<i>Mentha piperita</i>	Hotelã pimenta	folhas	12
Rutaceae	<i>Murraya koenigii</i>	Curry	folhas	13
Myristicaceae	<i>Myristica fragans</i>	Nóz moscada	sementes	14
Lamiaceae	<i>Origanum marjorana</i>	Manjerona	folhas	15
Lamiaceae	<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	folhas	16
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	ramos	17
Myrtaceae	<i>Syzygium aromaticum</i>	Cravo-da-índia	talo	18
Lamiaceae	<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho branco	folhas	19
Zingiberaceae	<i>Zingiber officinale</i>	Gengibre	raiz	20

Tabela 2. Nome comum, nome científico, uso na medicina alternativa e principais constituintes dos óleos essenciais usados.

Nome comum	Nome científico	Uso na medicina alternativa	Principais constituintes	Referencias bibliográficas
<p>Noz moscada</p> 	<i>Myristica fragrans</i> , Houtt	antitrombótico, antifúngico, antiemético, antiácido, antiinflamatório	α -pineno, β -pineno, ácido mirístico, macelignan	<p>QIU <i>et al.</i>, 2004; CHUNG <i>et al.</i>, 2006; YANG <i>et al.</i>, 2008; JAISWAL <i>et al.</i>, 2009; ZAIDI <i>et al.</i>, 2009; http://www.demonchyaromatics.</p>
<p>Alecrim</p> 	<i>Rosmarinus officinalis</i> , Linn.	anti-hipertensivo, hipoglicemiante, antibacteriano	cineol, α -pineno, canfora	<p>PORTE e GODOY, 2001; AGRa <i>et al.</i>, 2007; http://www.ayhned.com/</p>
<p>Canela</p> 	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> , Blume	analgésico, antiespasmódico, afrodisíaco, antibacteriano	α -terpineno, limoneno, cinamaldeído, eugenol	<p>LIMA <i>et al.</i>, 2005; GAYOSO <i>et al.</i>, 2005; http://www.sundayobserver.lk/</p>
<p>Cravo da índia</p> 	<i>Syzygium aromaticum</i>	antifúngico, antibacteriano, anestésico, analgésico	eugenol, α - pineno, β -pineno, p-cimeno, limoneno, linalol	<p>LIMA <i>et al.</i>, 2006; MATAN <i>et al.</i>, 2006; CARVALHO <i>et al.</i>, 2009; COSTA <i>et al.</i>, 2009; http://www.orvosok.hu/</p>

<p>Melaleuca</p> 	<p><i>Melaleuca alternifolia</i>, Cheel</p>	<p>antibacteriano</p>	<p>terpinen-4-ol, γ-terpieno, α-terpieno, 1,8 cineol, α-pineno</p>	<p>COX <i>et al.</i>, 2001; HAMMER, 2003; CARSON <i>et al.</i>, 2006; http://www.isolebrissago.ch/en/botanic-garden/botanical-cards/myrtaceae/162-myrtaceae</p>
<p>Gengibre</p> 	<p><i>Zingiber officinale</i>, R.</p>	<p>tratamento de artrite, reumatismo, doenças cardiovasculares</p>	<p>geranial, neral, α- zingibereno, ar-curcumeno</p>	<p>SINGH <i>et al.</i>, 2008; TUNTIWECHAPIKUL <i>et al.</i>, 2010; RODRIGUES e LIRA, 2013; http://theida.com/beloved-ginger</p>
<p>Orégano</p> 	<p><i>Origanum vulgare</i>, L.</p>	<p>antibacteriano, antifúngico, antiparasitário</p>	<p>timol, sabineno, terpineol, cariofileno, carvacrol</p>	<p>BAYDAR <i>et al.</i>, 2004; SHAFAGHAT, 2011; http://incontinenciacultural.blogspot.com.br</p>
<p>Laranja doce</p> 	<p><i>Citrus sinensis</i>, L.</p>	<p>antioxidante, antitumoral, ansiolítico, anticonvulsivante, antibacteriano</p>	<p>limoneno</p>	<p>CHOI <i>et al.</i>, 2000; CALLAWAY <i>et al.</i>, 2011; GAÍNZA <i>et al.</i>, 2015; https://en.wikipedia.org/wiki/Orange_(fruit)</p>
<p>Cafeeiro</p> 	<p><i>Coffea arabica</i> L.</p>	<p>Antioxidante</p>	<p>cafeína, 1-hexanol, hexanal, 2-hexanal cafestol, 16-O- metilcafestol</p>	<p>ELIZEI <i>et al.</i>, 2016; CZECH <i>et al.</i>, 2016; QUIJANO-CÉLIS <i>et al.</i>, 2015 http://www.revistacampoenegocios.com.br/o-magnesio-e-as-altas-productividades-do-cafeeiro/</p>

<p>Eucalipto-Limão</p> 	<p><i>Eucalyptus citriodora</i>, Hook</p>	<p>analgésico, anti-inflamatório, antitérmico</p>	<p>α-pineno, 1,8-cineol, pinocarveol-trans</p>	<p>SILVA <i>et al.</i>, 2003; KHALED <i>et al.</i>, 2015; http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?</p>
<p>Hortelã- pimenta</p> 	<p><i>Mentha piperita</i>, L</p>	<p>antiespasmódico, antiemético, analgésico</p>	<p>mentol, mentona, 1,8-cineol, pulegona, acetato de mentila</p>	<p>GRIGOLEIT e GRIGOLEIT, 2005; MCKAY e BLUMBERG 2006; VALMORBIDA <i>et al.</i>, 2006; https://en.wikipedia.org/wiki/Peppermint</p>
<p>Coentro</p> 	<p><i>Coriandrum sativum</i></p>	<p>antimicrobiano, anticonvulsivante, tratamento de ansiedade insônia,</p>	<p>2E-decenal, decanal 2E-decen-1-ol, n-decanol, 2E-dodecenal, undecanal, linalool</p>	<p>MATASYO <i>et al.</i>, 2009; MSAADA <i>et al.</i>, 2007; BHUIYAN <i>et al.</i>, 2009; NEFFATI e MARZOUK, 2008; http://www.lideragronomia.com.br/2012/02/coentro.html</p>
<p>Louro</p> 	<p><i>Laurus nobilis</i></p>	<p>analgésico, antiinflamatório</p>	<p>1,8-cineole, linalool, sabineno</p>	<p>SILVEIRA <i>et al.</i>, 2014; DADALIOGLU e EVRENDILEK, 2004; SAYYAH <i>et al.</i>, 2003 http://www.sauzedica.com.br/folha-de-louro/</p>
<p>Curry</p> 	<p><i>Murraya koenigii</i></p>	<p>tônico, antitérmico, antifúngico, analgésico</p>	<p>α-pineno, β-cariofileno, β-pineno</p>	<p>VERMA <i>et al.</i>, 2013; RAJENDRAN <i>et al.</i>, 2014; RAINA <i>et al.</i>, 2001 https://sites.google.com/site/paixaogastronomica/home/temperos</p>

<p>Manjerona</p> 	<p><i>Origanum marjorana</i></p>	<p>antisséptico, expectorante, tratamento de reumatismo e insônia</p>	<p>terpinen-4-ol, γ-terpineno, p-cimeno, α-terpineno</p>	<p>HAJLAOUI <i>et al.</i>, 2016; KAROUSOU <i>et al.</i>, 2012; https://poptudo.com/manjerona-usos-beneficios.html</p>
<p>Hotelã do campo</p> 	<p><i>Mentha arvensis</i></p>	<p>tratamento de doenças do trato digestivo, antibacteriano</p>	<p>mentol, isomentona</p>	<p>HUSSAIN <i>et al.</i>, 2010; GUEDES <i>et al.</i>, 2016; AKHTAR <i>et al.</i>, 2012 http://www.lideragronomia.com.br/2012/03/mentas.html</p>
<p>Limão siciliano</p> 	<p><i>Citrus limon</i> (L.) Burm.</p>	<p>antibacteriano, antiviral, antidiabético</p>	<p>D-limoneno; γ-terpineno; β-pineno</p>	<p>GONZÁLES-MOLINA <i>et al.</i>, 2010; SETTANNI <i>et al.</i>, 2014; BOUZENNA <i>et al.</i>, 2016 http://www.uc.pt/noticias/02_NL_2011/07_2011/camoes_plantas/</p>

4.2 Microrganismos e meios de cultivo

Os isolados de campo *Staphylococcus aureus* SA3008, SA3828, SA3917, SA4075, SA4125, SA4157, SA4158 e SA4182, gentilmente cedidos pela Embrapa/CNPGL - Juiz de Fora - MG, foram utilizados neste trabalho. Afim de confirmar que se tratavam de *Staphylococcus aureus*, as culturas bacterianas foram submetidas aos testes de coloração de Gram, prova de catalase, teste de coagulase e teste de DNase. Após a confirmação das estirpes, as culturas bacterianas foram estriadas em placas contendo ágar *Brain Heart Infusion* (BHI; Himedia®) e mantidas por 16 horas a 37°C. Para preparo dos estoques cada isolado foi inoculado em 5 mL de caldo BHI, e mantido em estufa a 37 °C por 16-18 horas. Esse volume foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 850 µL de BHI com adição posterior de 150 µL de glicerol estéril. Os microtubos foram mantidos a - 80 °C. Para determinação da concentração inibitória mínima e da atividade antimicrobiana dos óleos foi utilizado meio de cultura Muller Hinton (MH; Himedia®) e infusão-cérebro-coração (BHI; Himedia®). A sensibilidade das estirpes frente a diferentes antibióticos foi testada anteriormente através do teste de antibiograma pelo grupo de pesquisa do laboratório BIONAT (Tabela 3).

Tabela 3. Sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus aureus* frente a antibióticos de diferentes classes. (R) resistente e (S) sensível.

Antibiótico	<i>Staphylococcus aureus</i>								
	SA3008	SA3828	SA3917	SA4075	SA4125	SA4157	SA4158	SA4182	SA3008
Ampicilina	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Amoxicilina	S	S	S	R	R	S	R	S	S
Cefepima	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefoperazona	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina	S	S	S	R	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	R	S	S	R	S	S
Sulfametoxazol-trimetoprima	S	S	S	S	S	S	S	S	S

4.3 Triagem da avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais

A triagem da avaliação de atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi determinada pela metodologia CLSI (2012) de microdiluição em caldo, com modificações.

Afim de avaliar a existência de atividade antimicrobiana foram escolhidas duas concentrações fixas (10 mg/mL e 1 mg/mL). Os óleos testados foram diluídos em Tween 0,1%. O teste foi realizado em microplaca de 96 poços e no primeiro momento foram adicionados 100 µL de caldo BHI com o óleo nas diferentes concentrações, posteriormente foram adicionados 100 µL de suspensão bacteriana em caldo BHI ajustada para a concentração final de 5×10^6 UFC/mL. Como controle negativo, foi utilizado o emulsificante Polisorbato 80 (TWEEN 80; Sigma®), sem o óleo essencial e como controle positivo foram adicionados 10 µL de cefoperazona a 238,28 mg/mL. A cefoperazona (CEFAVET; SESPO LTDA.) foi utilizada por se tratar de um antibiótico utilizado na veterinária em casos de mastites bovinas recorrentes. Os testes foram realizados em triplicata.

As microplacas foram mantidas em estufa de crescimento a 37°C por 24 h. Após incubação, foram adicionados 50µL de resazurina (0,01%). A leitura das microplacas foi realizada num período de 1 a 4 horas após a adição do indicador.

A resazurina é um corante azul não fluorescente utilizado principalmente para avaliação da multiplicação celular. É um indicador de reação óxido-redução não tóxico que se torna rosa e fluorescente quando reduzido a resorufina por enzimas oxidoredutases dentro de células viáveis. Posteriormente é reduzida a hidroresorufina de característica incolor e não fluorescente (SARKER *et al.*, 2007).

A determinação foi visual e qualitativa, já que os poços com presença de bactérias viáveis são de coloração rósea a transparente e os poços com bactérias não viáveis são de coloração azul. Foram considerados antibacterianos os óleos que inibiram em qualquer uma das concentrações.

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais

Para os óleos que apresentaram atividade antibacteriana foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) pela metodologia padronizada de microdiluição em caldo (CLSI,2012).

Primeiramente, foi realizada uma diluição seriada dos óleos essenciais, em microplaca de 96 poços, onde a 100 µL de meio de cultura BHI foram adicionados 100 µL de óleo a 10 mg/mL; desta solução, 100 µL foram retirados e homogeneizados com 100 µL de meio de cultura na cavidade seguinte, e assim sucessivamente, obtendo-se assim uma série de concentrações dos óleos essenciais variando de 10,0 mg/mL a 0,156 mg/mL. Em cada concentração de óleo foi adicionado 100 µL de suspensão bacteriana, obtendo uma concentração final de 5×10^6 UFC/mL. O controle negativo utilizado foi o emulsificante Polisorbato 80 (TWEEN 80; Sigma®) sem o óleo essencial e ao controle positivo foi adicionado 10 µL de cefoperazona (CEFAVET; SESPO LTDA.). Os testes foram realizados em triplicata.

As microplacas foram mantidas em estufa de crescimento a 37°C por 24 h. Após incubação, foram adicionados 50µL de resazurina (0,01%). A leitura das microplacas foi realizada num período de 1 a 4 horas após a adição do indicador.

A determinação da CIM foi visual e qualitativa, já que os poços com presença de bactérias viáveis são de coloração rósea a transparente e os poços com bactérias não viáveis são de coloração azul. Considerou-se o valor do CIM a concentração do poço azul seguido por um poço com crescimento bacteriano com cores que podem variar de rosa à incolor.

Para a classificação dos valores de CIM, foram considerados valores de CIM abaixo de 0,5 mg/mL como forte inibição, valores de 0,5 mg/mL a 1,5 mg/mL relacionados com inibição moderada e valores acima de 1,5 mg mL inibição fraca (ALIGIANNIS *et al.*, 2001).

4.5 Determinação da atividade antibacteriana por diluição em leite

Os óleos essenciais com os melhores resultados de CIM foram testados utilizando um protocolo modificado do CLSI para o teste de diluição em caldo (MULLEN *et al.*, 2014). O leite pasteurizado UHT (*Ultra High Temperature*) foi comprado numa mercearia local e utilizado no lugar do caldo Mueller-Hinton como meio de crescimento a fim de mimetizar o ambiente do úbere durante o tratamento.

Os óleos essenciais foram testados em concentrações de 10 mg/mL, 20 mg/mL e 30 mg/mL. Estas concentrações teoricamente seriam alcançadas no trimestre de pré-secagem do úbere, desde que a produção de leite esteja entre 0,30 e 2,45 kg / quarto / dia.

Os dois controles negativos foram leite sozinho, para garantir que a pasteurização foi bem-sucedida, e leite + bactérias + cefoperazona em concentrações de 10 mg/mL e 50 mg/mL. O controle positivo foi leite + bactérias, para garantir que as bactérias poderiam crescer no leite. Foram realizadas três repetições de cada concentração de cada tratamento e controle para cada bactéria testada. As réplicas foram randomizadas por data, bactérias e tratamento para minimizar o viés experimental.

Os frascos foram preparados para cada controle e tratamento, adicionando primeiro um volume calculado de leite, depois adicionando o volume de solução de tratamento necessário para estabelecer a porcentagem por volume a ser testada (1%, 2% ou 3%). Após a adição de tratamentos ao leite, os frascos foram agitados em vórtex durante 1 min 30 s. Foram adicionados dez microlitros do caldo de BHI inoculado com os isolados de *S. aureus*, depois os frascos de teste foram agitados em vórtex durante 15 s e colocados em uma incubadora a 37 ° C durante 24 h. Os frascos de teste continham um total de 1 mL de líquido.

Após incubação, os frascos foram agitados em vórtice durante 15 s. A diluição seriada foi utilizada para determinar as contagens bacterianas, utilizando uma alíquota de 0,1 mL do frasco e uma solução salina estéril a 0,85% para criar oito diluições. As diluições foram plaqueadas em placas de Muller Hinton e incubadas durante 24 h a 37 ° C. Foram registradas as unidades formadoras de colônias (UFC) de todas as diluições. As contagens de colônias da menor diluição legível foram utilizadas na análise.

Os resultados são relatados como crescimento de bactérias na amostra de tratamento em relação ao crescimento do controle leite + bactérias. Os tratamentos foram considerados bem sucedidos na redução do crescimento bacteriano se todas as 3 repetições resultaram na redução do crescimento bacteriano em comparação com o controle.

O número médio de unidades formadoras de colônias presentes na amostra após o tratamento foi quantificado utilizando o tratamento e a concentração como variáveis explicativas. Cada tratamento foi avaliado para determinar se as porcentagens médias de crescimento bacteriano para cada tratamento foi significativamente diferente de 0. Se este teste não produziu um valor p significativo ($p < 0,05$), considerou-se que o tratamento tinha a capacidade de eliminar a multiplicação bacteriana.

4.6 Avaliação da interação entre óleos essenciais e cefoperazona ou combinados

Os óleos essenciais que demonstraram melhores resultados de CIM foram avaliados quanto a sua interação com o antibiótico cefoperazona, ou combinados através do método *checkerboard* (PALANIAPPAN e HOLLEY, 2010). Primeiramente foram distribuídos 100 µL de caldo BHI em cada poço da placa de 96 poços. Posteriormente, o antibiótico foi adicionado no eixo das coordenadas na primeira linha da placa em concentração 8X CIM e realizada então a diluição seriada na vertical. O óleo essencial foi adicionado na primeira coluna das abscissas da placa de 96 poços em concentração 8X CIM e realizada a diluição seriada na horizontal. O mesmo procedimento foi realizado com os óleos combinados.

Um volume de 100 µL de suspensão bacteriana, correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland, foi adicionado a cada poço da microplaca de 96 poços, e as placas foram incubadas por 24h a 37°C.

Após as diluições e adição do inócuo, o óleo e o antibiótico, ou os OEs combinados estarão distribuídos nos poços em concentrações que variam de 2X a 1/8X da CIM (Figura 1).

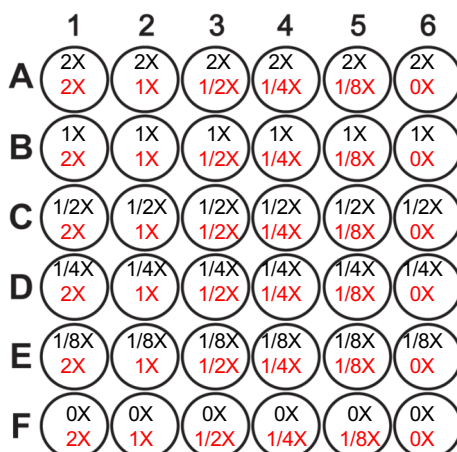


Figura 1. Esquema das concentrações finais do óleo essencial e do antibiótico, ou dos OEs combinados para determinação do tipo de interação entre eles. Concentração do óleo essencial em vermelho e do antibiótico em preto.

A avaliação do crescimento bacteriano foi feita visualmente utilizando de 50 µL de resazurina aos poços.

O efeito das combinações foi avaliado pelo cálculo do índice CIF (Concentração Inibitória Fracionária) para cada combinação usando as fórmulas abaixo. As combinações foram consideradas sinérgicas quando o índice $CIF \leq 0,5$, para $0,5 < \Sigma FIC \leq 1$ a interação é aditiva; para $1 < \Sigma FIC \leq 4$ a interação indiferente; e valores maiores que 4 são de antagonismo (PALANIAPPAN e HOLLEY, 2010).

$$CIF (\text{antibiótico}) = \frac{CIM (\text{antibiótico}) \text{ em combinação}}{CIM (\text{antibiótico}) \text{ sozinho}}$$

$$CIF (\text{óleo essencial}) = \frac{CIM (\text{óleo essencial}) \text{ em combinação}}{CIM (\text{óleo essencial}) \text{ sozinho}}$$

$$\text{Índice CIF} = \Sigma CIF = CIF (\text{antibiótico}) + CIF (\text{óleo essencial})$$

As fórmulas abaixo foram utilizadas para calcular o valor de CIF dos OEs combinados.

$$CIF (\text{óleo essencial 1}) = \frac{CIM (\text{óleo essencial 1}) \text{ em combinação}}{CIM (\text{óleo essencia1}) \text{ sozinho}}$$

$$CIF (\text{óleo essencial2}) = \frac{CIM (\text{óleo essencial 2}) \text{ em combinação}}{CIM (\text{óleo essencial 2}) \text{ sozinho}}$$

$$\text{Índice CIF} = \Sigma CIF = CIF (\text{óleo essencial 1}) + CIF (\text{óleo essencial 2})$$

4.7 Produção de biofilmes na presença dos óleos essenciais

Para a execução deste experimento foram utilizadas as concentrações: 2 X CIM (Concentração Inibitória Mínima), inibitória igual a CIM, subinibitória de $\frac{1}{2}$ CIM e $\frac{1}{4}$ CIM de cada óleo essencial que apresentou atividade antibacteriana.

O procedimento foi realizado segundo a metodologia de Stepanović e colaboradores (2000) com modificações. Um volume de 100 μ l de cultura diluída em meio BHI a 5×10^6 UFC/ml de cada isolado juntamente com 100 μ l de solução de cada óleo essencial será adicionado aos orifícios de placas de microtitulação de 96 poços.

Para o controle positivo, foram empregados 200 µl de cultura bacteriana diluída em caldo BHI. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e a quantificação da produção dos biofilmes analisada pela medida de absorvância. Os orifícios da placa foram lavados três vezes com solução salina (0,85% autoclavada previamente) e secos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 250 µl de metanol (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) e permaneceram durante 15 min. Após secagem, os orifícios foram corados com cristal violeta 2%(Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) por 10 min e lavados com água destilada autoclavada e, novamente, secos a temperatura ambiente. Finalmente foram acrescentados 250 µl de ácido acético glacial 33 % (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) por poço.

A formação do biofilme foi medida por absorvância, em um aparelho leitor de ELISA, com comprimento de onda (λ) de 570 nm. A formação de biofilme foi avaliada comparando-se a densidade óptica do tratamento com o controle. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

4.8 Avaliação da citotoxicidade

As células MAC-T (*Bovine Mammary Epithelial Cells*) foram plaqueadas na concentração de $3,5 \times 10^4$ células/poço. Cada poço recebeu 100 µL de meio DMEM e suspensão de células. As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após este período, foram adicionadas diferentes concentrações dos óleos essenciais mais ativos variando de 5mg/mL a 30mg/mL às células e estas foram incubadas por 72 horas à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Os controles deste ensaio (100% de células viáveis) foram realizados com meio de cultura.

Após este período, o meio contendo os óleos foi retirado, todos os poços foram lavados com tampão salino fosfato (PBS) e foi adicionado em cada poço 100 µL de uma solução de MTT (3-{4,5- dimetiliazol-2-il}-2,5-difeniltetrazólio bromido) a 0,5 mg/mL e as placas foram novamente incubadas nas condições descritas acima por 4 horas. Após este período o MTT foi retirado de todos os poços e em seguida foi adicionado 100 µL de DMSO. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (sem tratamento).

4.9 Seleção e manipulação do pós-dipping

Os pós-dippings foram manipulados utilizando os óleos essenciais *C. zeylanicum* (1), *C. sativum* (7) e *O. vulgare* (16) sozinhos e em combinações. A composição e a quantidade dos componentes utilizados estão descritas na tabela 4.

Tabela 4. Composição e quantidade dos componentes usados na formulação dos pós-dippings à base dos óleos essenciais, quantidade medida em mililitros.

Composição	Soluções pós-dipping									
	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11
Glicerina 3%	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Tween 80 1%	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Água purificada q.s.p.	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Óleos essenciais	(1)	(7)	(16)	(18)	(19)	(1) +(7)	(1)+ (16)	(7)+ (16)	(1)+(7) + (16)	CF*
Concentração	3%	3%	3%	3%	3%	1,5%+ 1,5%	1,5%+ 1,5%	1,5%+ 1,5%	1%+1% +1%	0

Legenda: * CF fórmula pura sem os óleos.

Primeiramente os componentes da fórmula foram pesados, posteriormente os óleos sozinhos e em combinações foram emulsificadas com o Tween 80, logo após essa mistura foi incorporada à água purificada até completa homogeneização. Após a homogeneização foi acrescentado o umectante (glicerina), não foram utilizados conservantes na formulação, pois os mesmos apresentam atividade antibacteriana e poderiam prejudicar os testes. As soluções foram então armazenadas em frasco e mantidas sob refrigeração de 2 a 8°C.

4.10 Produção de biofilmes na presença da formulação contendo óleos essenciais

Para a execução deste experimento foram utilizadas as concentrações: 2 X CIM, inibitória igual a CIM, subinibitória de ½ CIM e ¼ CIM de cada óleo essencial.

O procedimento foi realizado segundo a metodologia de Stepanović e colaboradores (2000) com modificações. Um volume de 100 µl de cultura diluída em

meio BHI a 5×10^6 UFC/ml de cada isolado juntamente com 100 μ l de solução de cada pós-dipping foi adicionado aos orifícios de placas de microtitulação de 96 poços.

Para o controle positivo, foram empregados 200 μ l de cultura bacteriana diluída em caldo BHI e para o controle da fórmula foram utilizados 100 μ l do pós-dipping sem óleo essencial incorporado para evidenciar se as formulações sem os óleos iriam interferir na formação do biofilme. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e a quantificação da produção dos biofilmes analisada pela medida de absorvância. Os orifícios da placa foram lavados três vezes com solução salina 0,85% autoclavada e secos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 250 μ l de metanol (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) e permaneceram durante 15 min. Após secagem, os orifícios foram corados com cristal violeta 2%(Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) por 10 min e lavados com água destilada autoclavada, e novamente, secos a temperatura ambiente. Finalmente foram acrescidos 250 μ l de ácido acético glacial 33 % (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) por poço.

A formação do biofilme foi medida por absorvância, em um aparelho leitor de ELISA, com comprimento de onda (λ) de 570 nm. A formação de biofilme foi avaliada comparando-se a densidade óptica do tratamento com o controle. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

Foram calculados o quanto as diferentes formulações de pós-dipping com óleo essencial interferiram na estrutura do biofilme pelo cálculo abaixo:

$$\text{Inibição do biofilme} = \frac{\text{absorvância em 570nm do pós-dipping}}{\text{absorvância em 570nm do controle positivo}} \times 100$$

4.11 Determinação da atividade antibacteriana dos pós-dipping por diluição em leite

Todas as formulações de pós-dipping foram testadas utilizando um protocolo modificado do CLSI para o teste de diluição de caldo (MULLEN *et al.*, 2014). O leite pasteurizado UHT (Ultra High Temperature) foi comprado numa mercearia e utilizado no lugar do caldo Mueller-Hinton como meio de crescimento.

Os dois controles negativos foram leite sozinho, para garantir que a pasteurização foi bem-sucedida, e leite + bactérias + cefoperazona em concentrações de 10 mg/mL. O controle positivo foi leite + bactérias, para garantir que as bactérias

poderiam crescer no leite. Foram realizadas três repetições de cada concentração de cada tratamento e controle para cada bactéria testada. As réplicas foram randomizadas por data, bactérias e tratamento para minimizar o viés experimental.

Os frascos foram preparados para cada controle e tratamento, adicionando primeiro um volume de 500 µl de leite, depois adicionando o volume de 490µl solução de tratamento na concentração final de 30 mg/mL (v/v). Após a adição de tratamentos ao leite, os frascos foram agitados em vórtice durante 1 min 30 s. Foram adicionados dez microlitros do caldo de BHI inoculado, depois os frascos de teste foram agitados em vórtice durante mais 15 s e colocados em uma incubadora a 37 ° C durante 24 h. Os frascos de teste continham um total de 1 mL de líquido.

Após incubação, os frascos foram agitados em vórtice durante 15 s. A diluição seriada foi utilizada para determinar as contagens bacterianas, utilizando uma alíquota de 0,1 mL do frasco e uma solução salina estéril a 0,85% para criar 8 diluições de 10 vezes. As diluições foram plaqueadas em placas de MH e incubadas durante 24 h a 37 ° C. Foram registradas as unidades formadoras de colônias de todas as diluições. As contagens de colônias da menor diluição legível foram utilizadas na análise.

A porcentagem de crescimento bacteriano foi avaliada em relação ao controle negativo após a determinação da UFC/mL de cada ensaio e controle.

4.12 Análises cromatográficas dos óleos essenciais

Os cromatogramas dos óleos essenciais adquiridos pelas empresas Laszlo e Ferquima foram emitidos pelas próprias empresas e repetidas pelo Departamento de Química da UFV para confirmar os constituintes informados pelas empresas. As análises cromatográficas dos óleos, incluindo os que apresentaram atividade, foram realizadas em equipamento CG-EM SHIMADZU GCMS-QP5050A do Departamento de Química da UFV, coluna cromatográfica DB-5 de 30 m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno e 0,5 micrometros de espessura do filme. As condições usadas foram temperaturas de 220 °C no injetor, modo split (razão: 15), com 40 °C iniciais por 2 minutos acrescidos de 3 °C por minuto até 240 °C, durante 10 minutos. O fluxo do gás foi de 1,8 mL.min⁻¹.

4.13 Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias

comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) com o software estatístico GraphPad Prism version 7.00, GraphPad Software, La Jolla California USA. Neste teste, as amostras com o mesmo índice (abcd) não diferem estatisticamente entre si e as amostras com índices diferentes (abcd) diferem estatisticamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem preliminar da atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente à isolados clínicos de mastite

Os vinte óleos essenciais foram avaliados em relação à atividade antibacteriana pelo método de microdiluição modificado e os óleos que apresentaram atividade foram submetidos ao teste de concentração inibitória mínima (CIM), teste de diluição e avaliação da atividade antibiofilme.

A triagem por microdiluição é um método econômico de realizar uma análise geral quando há uma amostragem moderada, o uso de concentrações fixas permite investigar a atividade antibacteriana e antecipar futuros valores de CIM.

Dos óleos testados, cinco apresentaram atividade antibacteriana frente às estirpes isoladas de *Staphylococcus aureus* (Tabela 5).

Tabela 5. Triagem preliminar da atividade antibacteriana de 20 óleos essenciais de plantas condimentares ou culinárias pelo teste de microdiluição com volumes fixos. Os resultados estão expressos em mg/mL.

OE Identificação	<i>Staphylococcus aureus</i>							
	SA3008	SA3828	SA3917	SA4075	SA4125	SA4157	SA4158	SA4182
<i>C. zeylanicum</i> (1) *	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>C. aurantiifolia</i> (2)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. limon</i> (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. reticulata</i> (4)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sinensis</i> (5)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. arábica</i> (6)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sativum</i> (7) *	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>C. citriodora</i> (8)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. nobilis</i> (9)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. alternifolia</i> (10)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. arvensis</i> (11)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. piperita</i> (12)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. koenigii</i> (13)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. fragans</i> (14)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>O. marjorana</i> (15)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>O. vulgaris</i> (16) *	1	1	1	10	1	1	1	1
<i>R. officinalis</i> (17)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aromaticum</i> (18) *	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>T. vulgaris</i> (19) *	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Z. officinale</i> (20)	-	-	-	-	-	-	-	-

* óleos essenciais com atividade antibacteriana.

Os óleos de canela (1) e orégano (16) demonstraram inibição de 1 e 10 mg/mL, o coentro (7) inibiu todos os isolados com 1 mg/mL, já o cravo (18) e o tomilho branco (19) apresentaram inibição apenas na maior concentração. Apesar de representarem apenas 25% do total de espécies testadas, esse resultado se mostra bastante promissor, já que os óleos essenciais que demonstraram atividade antibacteriana no presente estudo são utilizados como especiarias na alimentação humana e, por isso,

são considerados menos nocivos de uma maneira geral que produtos de origem sintética (Tunc *et al.*, 2000).

Diversos estudos já avaliaram o uso de óleos essenciais no combate a bactéria *S. aureus*, o emprego de produtos naturais pode ser uma alternativa ao uso de antibióticos, devido à diversidade de moléculas bioativas provenientes do metabolismo secundário das plantas. Os resultados do presente estudo corroboram com os resultados obtidos por Raffaella e colaboradores (2017) que utilizaram diferentes métodos de triagem antibacteriana para avaliar a atividade de 11 óleos essenciais extraídos de plantas condimentares frente à bactéria *S. aureus* ATCC 43387 e concluíram que o óleo essencial de *T. vulgaris* (tomilho), *S. officinalis* (sálvia), *C. cassia* (canela-chinesa) e *C. sempervirens* (cipreste) apresentaram atividade contra a bactéria *S. aureus*, enquanto os óleos de *M. alternifolia* (melaleuca), *L. nobilis* (louro), *R. officinalis* (alecrim) e outros, não demonstraram ação antibacteriana.

Segundo Ghabraie e colaboradores (2016) os óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *O. vulgare* e *T. vulgaris* foram efetivos na inibição de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, estirpe usada como referência de patógeno alimentar. Pereira e colaboradores (2008) também demonstraram efeito inibitório de *S. aureus* ATCC 25923 em estudo que avaliou a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *C. citratus*, *O. vulgare* e *S. aromaticum*.

Budri e colaboradores (2015) verificaram a atividade dos óleos essenciais de *S. aromaticum*, *C. zeylanicum* e seu componentes majoritários eugenol e cinamaldeído contra 64 isolados de *S. aureus* de mastite subclínica, e comprovaram a ação bactericida tanto dos óleos essenciais como de seus compostos majoritários.

5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais ativos

A concentração inibitória mínima foi determinada para todos os óleos que apresentaram atividade antibacteriana na triagem preliminar (Tabela 6). Esse teste é utilizado para determinar a menor concentração de um composto capaz de inibir a atividade bacteriana, assim quanto menor for essa concentração maior será a atividade antibacteriana desse composto.

Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais e cefoperazona frente aos isolados de *Staphylococcus aureus*, SA3008, SA3828, SA3917, SA4075, SA4125, SA4157, SA4158 e SA4182.

Óleos essenciais	<i>Staphylococcus aureus</i> ^a							
	3008	3828	3917	4075	4125	4157	4158	4182
<i>C. zeylanicum</i> (1)	0,62	1,25	0,62	1,25	1,25	0,62	0,62	0,62
<i>C. sativum</i> (7)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
<i>O. vulgare</i> (16)	1,25	1,25	0,62	2,5	0,62	1,25	0,62	1,25
<i>S. aromaticum</i> (18)	2,5	2,5	2,5	5,0	5,0	5,0	2,5	2,5
<i>T. vulgaris</i> (19)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	1,25	2,5	2,5
Cefoperazona	0,002	0,002	0,008	0,004	0,016	0,002	0,016	0,008

Legenda: ^a Os valores apresentados representam uma média de três repetições.

Aligianis e colaboradores (2001) classificaram compostos que apresentam um valor de CIM até 0,5 mg/mL como fortes inibidores, para valores entre 0,6 e 1,5 mg/mL inibidores moderados e fracos inibidores aqueles que apresentam CIM acima de 1,6 mg/mL. De acordo com essa classificação apenas o óleo essencial de *C. sativum* (7) apresentou forte inibição com valor de CIM de 0,15 mg/mL para todos os isolados, os óleos de *O. vulgare* (16), *C. zeylanicum* (1) e seu componente majoritário cinamaldeído demonstraram inibição moderada com variação de CIM entre 0,625 mg/mL e 1,25 mg/mL, enquanto os óleos de *S. aromaticum* (18) e *T. vulgaris* (19) apresentaram inibição fraca com valores variando de 2,5 a 5,0 mg/mL.

O óleo essencial de coentro apresentou uma forte inibição para todas as bactérias testadas com valor de CIM de 0,15 mg/mL. Enquanto Casetti e colaboradores (2012) testaram 10 isolados clínicos de estirpes de *S. aureus* sensíveis a metilina e 10 isolados resistentes ao antibiótico, e o resultado da concentração inibitória mínima foi de 2,2 mg/mL para todos os microrganismos.

No entanto, os valores de CIM de *C. sativum* para *S. aureus* é variável e depende da estirpe. Bogovac e colaboradores (2015) em estudo realizado verificaram a eficácia

do óleo essencial de *C. sativum* como agente bactericida contra diversos isolados clínicos e microrganismos de referência ATCC Gram-positivos e Gram-negativos, entre eles *S. aureus* e o valor de CIM para essa bactéria variou de 0,02 mg/mL a 0,04 mg/mL, valores consideravelmente menores que os encontrados nesse estudo.

Ao estudar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de canela Trajano e colaboradores (2010) obtiveram resultados semelhantes aos demonstrados nesse trabalho, o valor do CIM encontrado para o óleo essencial de canela foi igual a 1,25 mg/mL frente a algumas bactérias que se proliferavam em alimentos, sendo uma delas a *Staphylococcus aureus*. Da mesma forma, o OE de *C. zeylanicum* apresentou atividade inibitória contra *S. aureus* ATCC 29213 com valor de CIM de 0,56 mg/mL, valor próximo aos encontrados no presente estudo (UNLU *et al.*, 2010).

Cirino e colaboradores (2015) ao avaliar a propriedade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* concluiu que o valor de CIM para as 3 estirpes de *S. aureus* selecionadas foi de 1,25 mg/mL, valor análogo a alguns resultados desse trabalho. Estudo semelhante foi conduzido por Boskovic e colaboradores (2015), cujos valores da CIM do OE do orégano são bastante significativos. A concentração mínima obtida foi de 0,64 mg/mL, resultado este bastante aproximado dos valores obtidos neste estudo.

Em um estudo que visava avaliar a atividade do óleo essencial de *S. aromaticum* frente a diferentes microrganismos como bactérias e fungos, Fu e colaboradores (2007) utilizando a metodologia de CIM reportaram resultado igual a 1,25 mg/mL em ensaio realizado com *S. aureus* ATCC 6538, resultado inferior ao desse trabalho. Raffaella e colaboradores (2017) evidenciaram valor de CIM superior o reportado nesse estudo para o óleo de *T. vulgaris*, 5 mg/mL, resultado que se aproxima dos valores reportados nesse estudo.

A discrepância de alguns resultados do presente estudo com os dados da literatura pode ser explicada pela variação da composição química que ocorre devido a origem da planta de diferentes áreas geográficas, diferentes períodos sazonais de coleta e até mesmo diferença no método escolhido para extrair o óleo essencial (FALEIRO e MIGUEL, 2013). Outro fator importante na análise dos resultados são os fatores de virulência e capacidades adaptativas dos isolados clínicos utilizados, o que pode levar a uma diferença de concentrações inibitórias mínimas com bactérias ATCC e outros isolados.

A cefoperazona é um antibiótico pertencente à classe das cefalosporinas de terceira geração e é um medicamento utilizado no tratamento de mastites clínicas e subclínicas recorrentes por apresentar um maior espectro de ação. A determinação do CIM foi realizada para avaliar a interação entre a cefoperazona e os óleos essenciais ativos. Os resultados obtidos das estirpes isoladas de *S. aureus* mostraram valores de CIM similares aos relatados na literatura, demonstrando que todos os isolados são suscetíveis a esse antibiótico de acordo com o documento M100-S21 do CLSI (Feßler *et al.*, 2012).

5.3 Avaliação da atividade dos óleos essenciais sobre biofilme em formação

Inicialmente todas as bactérias isoladas de mastite foram submetidas a avaliação da produção de biofilme proposta por Stepanović e colaboradores (2000) e somente três estirpes das oito analisadas demonstraram serem fortes produtoras de biofilme, logo os experimentos a partir dessa etapa foram realizados somente com os isolados SA4075, SA4125 e SA4158.

Os óleos essenciais selecionados foram testados nas concentrações 2CIM, CIM, CIM/2 E CIM/4, afim de garantir sua real atividade contra a formação do biofilme nas doses subinibitórias e não sua capacidade bactericida.

Na figura abaixo todos os resultados estão representados de acordo com as quantidades relativas de produção de biofilme dos *S. aureus* isolados de mastite frente aos óleos essenciais de *C. zeylanicum* (1), *C. sativum* (7), *O. vulgare* (16), *S. aromaticum* (18), *T. vulgaris* (19) e o cinamaldeído (Figura 2). Os resultados foram expressos em produção relativa de biofilme para que fosse possível relacionar o resultado com o controle.

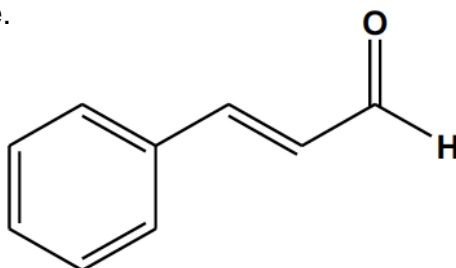


Figura 2. Estrutura química do cinamaldeído, componente marjoritário do óleo essencial de *C. zeylanicum*.

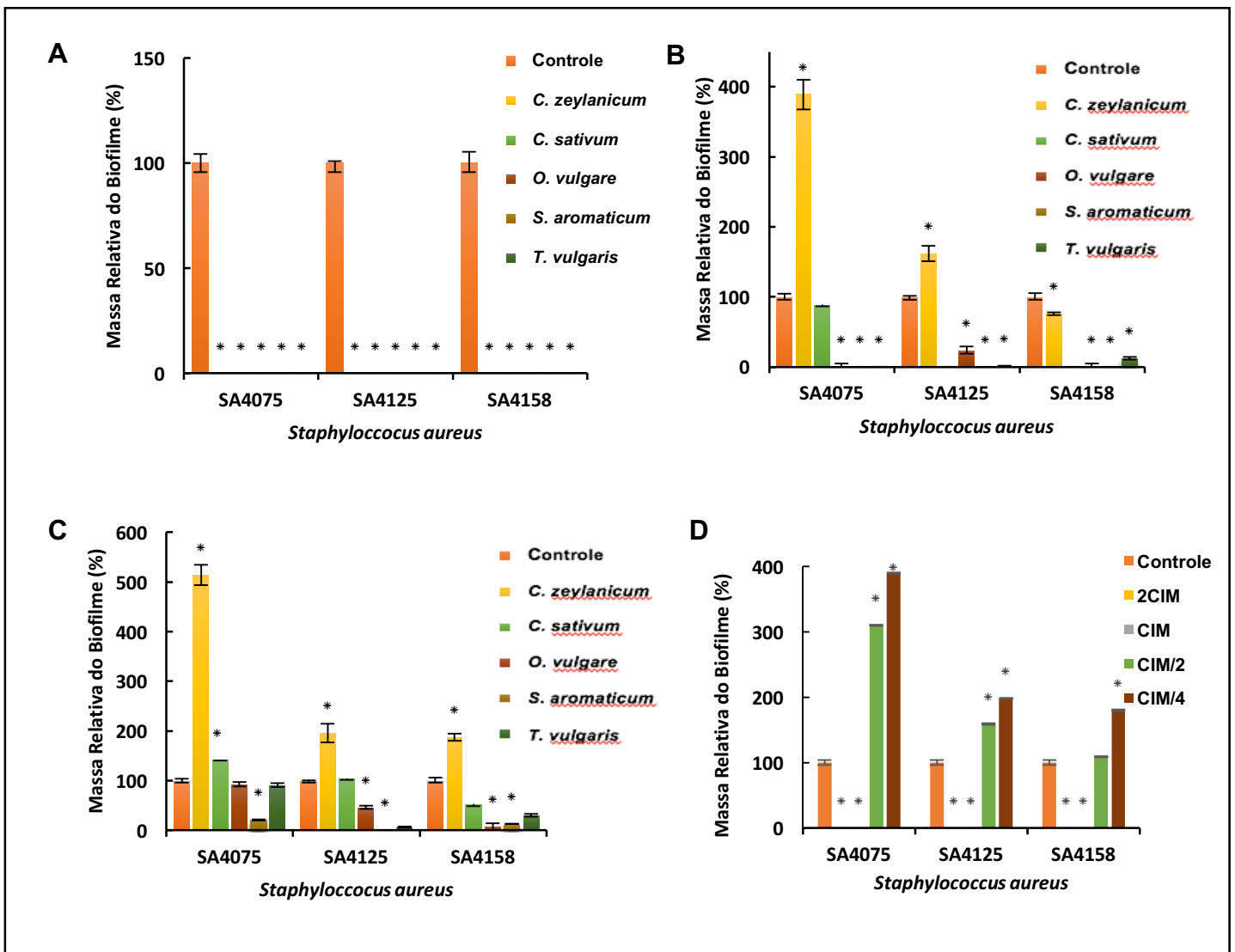


Figura 3. Efeito dos óleos essenciais na produção de biofilme por *Staphylococcus aureus*. **A** óleos essenciais nas concentrações 2CIM e CIM, **B** CIM/2, **C** CIM/4 e **D** efeito do cinamaldeído na produção de biofilme, nas concentrações 2CIM, CIM, CIM/2 e CIM/4. * $p < 0.05$, comparados com os controles tratados com veículo. Cada barra representa \pm desvio padrão (DP).

Os resultados da atividade da inibição de biofilme em formação dos óleos essenciais evidenciaram que nas concentrações inibitórias 2CIM e CIM os cinco óleos testados foram capazes de inibir completamente a formação de biofilme nas três estirpes de *S. aureus* isoladas testadas (Figura 3).

A estrutura do biofilme serve de proteção para as células bacterianas e quando já aderidos são de difícil dispersão, portanto sua formação deve ser prevenida.

Com isso a associação de agentes antimicrobianos naturais capazes de dispersar a matriz exopolissacarídica do biofilme ou impedir sua adesão, é de grande importância para controle e prevenção de doenças como a mastite bovina (ANDRE, 2015).

A lenta difusão de moléculas através da matriz do biofilme e as modificações ocasionadas no metabolismo das células bacterianas promovem as bactérias envolvidas em biofilme maior resistência a fagocitose e aos agentes antimicrobianos e sanitizantes (DOLAN e COSTERTON, 2002). Tais fatores protetores inerentes ao biofilme de *S. aureus* possibilitam que essas bactérias colonizem o epitélio mamário e estabeleçam uma infecção persistente a até mesmo dificultando o tratamento (LASA e PENADÉS, 2006).

O óleo essencial de *S. aromaticum* (18) apresentou valores significantes de inibição de biofilme, na concentração CIM/2 inibiu 100% a formação de biofilme das estirpes SA4075, SA4125 e SA4158. O óleo essencial de *C. sativum* (7) na concentração CIM/2 (0,07 mg/mL) inibiu totalmente a formação de biofilme nas estirpes SA4125 e SA415, enquanto na estirpe SA4075 inibiu somente 10%. Os óleos de *O. vulgare* (16) e *T. vulgaris* (19) se mostraram fortes inibidores da formação do biofilme, pois, na concentração subinibitória de CIM/2 impediram o crescimento da forma séssil de duas estirpes e na terceira inibiram de 75 e 88% respectivamente.

Na concentração de CIM/4 o óleo essencial de *S. aromaticum* (18) inibiu a produção do biofilme nas proporções de 80 a 100% (Figura 3). No entanto os óleos essenciais de *O. vulgare* (16) e *T. vulgaris* (19) exibiram valores de inibição bastante diferentes para os isolados, SA4075 de 7 a 9%, SA4125 de 93 a 54% e SA4158 de 92 a 70%. O óleo essencial de *C. sativum* (7) no valor de CIM/4(0,004 mg/mL) demonstrou resultado interessante de inibição parcial na estirpe SA4158 de 47%, não alterou a formação de biofilme da bactéria SA4125 e estimulou a produção de biofilme na estirpe SA4075.

De maneira similar, o óleo essencial de *C. zeylanicum* (1) estimulou a formação de biomassa de biofilme em todas as estirpes em concentração subinibitória de CIM/4 e nas estirpes SA4075 e SA4125 na concentração de CIM/2, somente na estirpe SA4158 foi capaz de inibir a formação do biofilme em 25%.

O composto isolado do OE de *C. zeylanicum*, cinamaldeído apresentou ação semelhante aos resultados de *C. zeylanicum*, promovendo inibição total da adesão

bacteriana nas concentrações 2CIM e CIM em todas as estirpes, e aumentando a formação nas concentrações sub-CIM.

Nostro e colaboradores (2007) em estudo avaliando os efeitos do óleo essencial de *O. vulgare* e seus componentes carvacrol e timol sobre biofilmes pré-formados e em formação de isolados clínicos de *S. epidermidis* e *S. aureus*, concluíram que o orégano possui ação inibitória na formação do biofilme de *S. aureus* em doses subinibitórias de CIM/2 e CIM/4 com inibição variando de 94% a 27%.

Schillaci e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antibiofilme em formação de *O. vulgare* empregando concentrações subinibitórias sobre estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos e *S. aureus* ATCC 29213, e obtiveram inibição de 32,6 a 77,8% na maior concentração testada, indicando significativa atividade contra a formação de biofilme.

Jafri e colaboradores (2014) verificaram a capacidade dos óleos essenciais de *S. aromaticum*, *T. vulgaris* e seu componentes majoritários, eugenol e timol, em inibir a formação de biofilme de diferentes isolados de *S. aureus* e confirmaram que os óleos essenciais possuem ação antibiofilme e seu compostos majoritários demonstraram capacidade de inibir o biofilme em formação.

Diversos estudos demonstraram que alguns antibióticos em concentrações de sub-CIM podem induzir de forma significativa a formação de biofilme em várias espécies bacterianas durante experimentos *in vitro*. O processo descrito anteriormente é de grande relevância clínica pois, as bactérias tratadas com a concentração inibitória são constantemente expostas às doses subinibitórias durante o tratamento, como no intervalo entre as doses ou em terapias contínuas de baixas dosagens (KAPLAN, 2011).

O resultado do presente estudo para o óleo essencial de *C. zeylanicum* demonstrou que em dose subinibitórias o efeito é antagonista e assim a produção de biofilme é aumentada. Esses dados corroboram com estudo realizado por Ferro e colaboradores (2016) que avaliou a atividade antibiofilme do componente majoritário do óleo essencial de *C. zeylanicum*, o cinamaldeído, e concluiu que em doses sub-CIM em isolados clínicos de *S. aureus* o composto pode aumentar a biomassa do biofilme em até oito vezes em relação ao controle negativo. No entanto, Budri e colaboradores (2015) mostraram que *C. zeylanicum*, *S. aromaticum*, cinamaldeído e eugenol, em doses subinibitórias, inibiram de 52,8% a 74% a formação de biofilme de

estirpes *S. aureus* isoladas de mastite subclínica.

De acordo com Jia e colaboradores (2011) o cinamaldeído promoveu completa inibição da formação de biofilme por *S. aureus* após exposição a doses inibitórias equivalentes a 5CIM para células planctônicas.

5.4 Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de diluição em leite

A avaliação dos óleos essenciais ativos pelo protocolo de diluição em caldo foi realizada com as três estirpes SA4075, SA4125 e SA4158.

Os óleos com menores valores de CIM, ou seja, os inibidores bacterianos mais fortes foram escolhidos para realizar o teste de diluição, *C. zeylanicum* (1), *C. sativum* (7) e *O. vulgare* (16).

A metodologia de diluição em caldo é amplamente utilizada para verificar a atividade antibacteriana de diversos óleos essenciais (HOOD *et al.*, 2003). O caldo Mueller-Hinton foi substituído por leite pasteurizado nesse ensaio para simular o ambiente do úbere, pois os lipídios presentes no leite por possuírem características hidrofóbicas podem interagir com as moléculas dos óleos essenciais diminuindo sua ação antibacteriana (BURT, 2004).

Os resultados foram reportados em porcentagem relativa ao controle positivo composto apenas por leite + bactéria (Tabela 7).

A média de UFC/mL presentes nos controles positivos foram de $1,3 \times 10^8$ para o isolado SA4075, $1,9 \times 10^9$ para SA4125 e $1,6 \times 10^9$ para SA4158 após incubação de 24h. O controle negativo utilizando antibiótico não permitiu a multiplicação bacteriana nas três replicatas.

O óleo essencial de *C. zeylanicum* foi capaz de inibir em 100% o crescimento bacteriano nas três concentrações nas diferentes bactérias. Enquanto o óleo essencial de *C. sativum* inibiu completamente o crescimento de bactérias em todas as concentrações nas estirpes SA4125 e SA4158, contudo na estirpe SA4075 inibiu apenas nas concentrações 20 e 30 mg/mL, já a concentração de 10 mg/mL nessa bactéria não apresentou diferença estatística com o controle positivo.

O orégano conseguiu impedir o total aparecimento de bactérias em todas as concentrações nas estirpes SA4075 e SA4158, no entanto na estirpe 4125 foi capaz de inibir em 93% na concentração de 10 mg/mL e totalmente nas outras concentrações.

Tabela 7. Efeito dos óleos essenciais de plantas condimentares na multiplicação de *Staphylococcus aureus* causadores de mastite, no leite *in vitro*.

<i>S. aureus</i>	Tratamento	Multiplicação bacteriana relativa ao controle nas várias concentrações (mg/mL) dos tratamentos ¹ em porcentagem		
		30 mg/mL	20 mg/mL	10 mg/mL
4075	<i>C. zeylanicum</i> (1)	0±0%	0±0%	0±0%
	<i>C. sativum</i> (7)	0±0%	2±1%	95±3%
	<i>O. vulgare</i> (16)	0±0%	0±0%	0±0%
	Cefoperazona	-	-	0±0%
4125	<i>C. zeylanicum</i> (1)	0±0%	0±0%	0±0%
	<i>C. sativum</i> (7)	0±0%	0±0%	0±0%
	<i>O. vulgare</i> (16)	0±0%	0±0%	7±1%
	Cefoperazona	-	-	0±0%
4158	<i>C. zeylanicum</i> (1)	0±0%	0±0%	0±0%
	<i>C. sativum</i> (7)	0±0%	0±0%	0±0%
	<i>O. vulgare</i> (16)	0±0%	0±0%	0±0%
	Cefoperazona	-	-	0±0%

¹ Crescimento da bactéria em relação ao controle positivo, leite + bactéria, média das três replicatas ± desvio padrão.

Muellen e colaboradores (2014) utilizando a mesma metodologia do presente estudo testaram a atividade antimicrobiana de *T. vulgaris* sobre estirpes isoladas de mastite bovina, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes* e *Streptococcus uberis* e comprovaram que o óleo essencial de *T. vulgaris* foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em todas as bactérias nas concentrações de 20 e 30 mg/mL.

Uma alternativa aos antibióticos sintéticos no combate as infecções e inflamações são os óleos essenciais, eles são utilizados para esses fins por muito

tempo, além de serem biodegradáveis e por possuírem baixo risco de efeitos colaterais. Um fator de diminuição da resistência por parte das bactérias é devido a sua composição, com uma ampla variedade de metabólitos secundários antibacterianos de diferentes estruturas (KALEMBA e KUNICKA, 2003; MAHADY, 2005).

As moléculas isoladas podem apresentar um alto poder antibacteriano, mas o fato de existirem várias substâncias no óleo essencial com diferentes mecanismos de ação indicam que o sinergismo é um fator que torna os óleos essenciais uma atrativa fonte de novos antimicrobianos (RAFFA e PERGOLIZZI, 2011).

5.5 Avaliação da interação entre os óleos essenciais e o antibiótico cefoperazona ou combinados

Para a avaliação da interação entre os óleos essenciais foi empregado o método de diluição seriada *checkerboard*, conhecido também como tabuleiro de damas.

Alguns estudos já reportaram interações entre óleos essenciais e antibióticos, e podem gerar diferentes efeitos como indiferente, aditivo, antagonista ou sinérgico. O efeito aditivo ocorre quando a combinação entre os componentes é igual à soma dos efeitos individuais, já o sinergismo ocorre quando a combinação é maior que a soma dos efeitos individuais (HERMAN *et al.*, 2016).

De acordo com o critério estabelecido para avaliar a interação entre os óleos essenciais e a cefoperazona, observou-se efeito aditivo entre o óleo essencial de *T. vulgaris*, *S. aromaticum* e *C. zeylanicum* com uma Σ CIF variando entre 0,75 e 1 na estirpe SA4125. No isolado SA4075 a interação de adição foi observada apenas entre *C. zeylanicum* e cefoperazona com uma Σ CIF de 1. Somente o isolado SA4158 demonstrou interação indiferente em todas as combinações.

Na tabela 8 encontram-se os resultados da interação entre os óleos de *C. zeylanicum* (1), *C. sativum* (5), *O. vulgare* (8), *S. aromaticum* e *T. vulgaris* (9) com o cefoperazona sobre isolados de *S. aureus*.

A comparação dos resultados dos testes com cefoperazona e óleos essenciais utilizados no presente estudo com trabalhos da literatura se torna difícil devido à escassez de estudos semelhantes, porém, estudos utilizando outros medicamentos pertencentes à mesma classe da cefoperazona tem demonstrado resultados

similares. Toruglo (2011) utilizando protocolo de antibiograma em placa evidenciou leve sinergismo entre ceftriaxona e *C. sativum*, com aumento de 1 mm no tratamento combinado em relação ao antibiótico sozinho.

Duarte e colaboradores (2012) avaliaram a interação entre cefoperazona e óleo essencial de *C. sativum* sobre estirpes gram-negativas *Acinetobacter baumannii* LMG 1025 e LMG 1041. O efeito observado foi aditivo com valor de Σ CIF 0,75 e 1, similar ao encontrado em estirpes de *S. aureus* no presente estudo.

Liu e colaboradores (2015) realizaram uma pesquisa com o objetivo de verificar o sinergismo entre alguns compostos majoritários dos óleos essenciais combinados com o antibiótico estreptomicina, pertencente a classe dos aminoglicosídeos. Os ensaios foram realizados em *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*, foram observadas interações sinérgicas entre o cinamaldeído/antibiótico e timol/antibiótico na estirpe *L. monocytogenes*, enquanto interações aditivas ocorreram entre timol/estreptomicina.

Tabela 8. Avaliação do tipo de interação dos óleos essenciais ativos com a cefoperazona para isolados de mastite.

Estirpe	CIF				
	OE	Controle	OE	Σ CIF	Interação
SA4158	<i>C. zeylanicum</i>	1/2XCIM	1/2XCIM	1	Aditiva
	<i>C. sativum</i>	1XCIM	1XCIM	2	Indiferente
	<i>O. vulgare</i>	1XCIM	1XCIM	2	Indiferente
	<i>S. aromaticum</i>	1XCIM	1XCIM	2	Indiferente
	<i>T. vulgaris</i>	1XCIM	1XCIM	2	Indiferente
SA4125	<i>C. zeylanicum</i>	1/2XCIM	1/2XCIM	1	Aditiva
	<i>C. sativum</i>	1XCIM	1XCIM	2	Indiferente
	<i>O. vulgare</i>	1XCIM	1XCIM	1	Indiferente
	<i>S. aromaticum</i>	1/4XCIM	1/2XCIM	0,75	Aditiva
	<i>T. vulgaris</i>	1/2XCIM	1/2XCIM	1	Aditiva
SA4075	<i>C. zeylanicum</i>	1XCIM	1XCIM	2	Indiferente
	<i>C. sativum</i>	1XCIM	1XCIM	2	Indiferente
	<i>O. vulgare</i>	1XCIM	1XCIM	2	Indiferente
	<i>S. aromaticum</i>	1XCIM	1XCIM	2	Indiferente
	<i>T. vulgaris</i>	1XCIM	1XCIM	2	Indiferente

Na tabela 9 encontram-se os resultados da interação entre os óleos essenciais de *C. zeylanicum* (1), *C. sativum* (5), *O. vulgare* (8), *S. aromaticum* e *T. vulgaris* (9) sobre isolados do *S. aureus*.

Tabela 9. Interação entre os óleos essenciais sobre estirpes de *Staphylococcus aureus*.

Estirpe	Óleo essencial 1	Óleo essencial 2	Σ CIF	Interação
SA4158	<i>T. vulgaris</i>	<i>O. vulgare</i>	1	Aditiva
	<i>T. vulgaris</i>	<i>C. zeylanicum</i>	1	Aditiva
	<i>T. vulgaris</i>	<i>C. sativum</i>	0,75	Aditiva
	<i>O. vulgare</i>	<i>C. sativum</i>	1	Aditiva
	<i>O. vulgare</i>	<i>S. aromaticum</i>	1	Aditiva
SA4125	<i>T. vulgaris</i>	<i>O. vulgare</i>	1	Aditiva
	<i>T. vulgaris</i>	<i>C. sativum</i>	1	Aditiva
	<i>O. vulgare</i>	<i>S. aromaticum</i>	1	Aditiva
SA4075	<i>T. vulgaris</i>	<i>O. vulgare</i>	0,75	Aditiva

Dez combinações foram testadas por estirpe bacteriana, e as combinações não mostradas na tabela são referentes aos valores de interação indiferentes. A interação observada entre *T. vulgaris* e *O. vulgare* nos três isolados foi aditiva com resultado de Σ CIM iguala de 0,75 a 1.

A interação entre *T. vulgaris* e *C. sativum* foi considerada aditiva nas estirpes SA4125 3 SA4158, mesmo resultado obtido com a combinação entre *O. vulgare* e *S. aromaticum* nas mesmas bactérias. *T. vulgaris* demonstrou ainda interação aditiva quando testado em conjunto com *C. zeylanicum* na estirpe SA4158. As combinações entre *O. vulgare* e *C. sativum* ou *S. aromaticum* promoveram um aumento do CIM provando reação de adição quando utilizados em doses sub-CIM na bactéria SA4158.

Goñi e colaboradores (2009) avaliaram a interação entre *C. zeylanicum* e *S. aromaticum* através de duas metodologias distintas, teste de difusão sólida e teste de difusão por vapor, utilizando diferentes linhagens bacterianas de relevância para a indústria alimentícia e dentre elas *S. aureus* (ATCC 29213). O resultado obtido foi de interação indiferente, o que confirma os achados desse estudo.

Probst e colaboradores (2011) utilizando a metodologia de contagem na placa de Ágar, diferente da proposta nesse estudo, avaliou a interação entre produtos naturais como, óleos essenciais e própolis, frente a 15 estirpes de *S. aureus* isolados de material biológico humano. O teste foi realizado com uma mistura dos componentes em uma concentração de CIM/4 e concluíram que o óleo essencial de *C. zeylanicum* e *Caryophyllus aromaticus* (inflorescência) combinados foram sinérgicos, porém o óleo de *T. vulgaris* não demonstrou potencial sinérgico associado ao óleo essencial de *C. zeylanicum*, resultados análogos ao encontrados nas estirpes SA4125 e SA4158. Em contrapartida outro estudo avaliou a interação entre *C. zeylanicum* e *T. vulgaris* através do protocolo de microdiluição, o mesmo utilizado nesse estudo, e obteve resultado de sinergismo (KON e RAI, 2012).

As interações antimicrobianas que promovem o aumento da atividade antibacteriana em doses subinibitórias ocorrem, devido a possíveis fatores de interferência no metabolismo bacteriano, como inibição de enzimas protetoras ou inibição sequencial de uma via bioquímica comum (SANTIESTEBAN-LOPEZ *et al.*, 2007).

5.6 Avaliação da toxicidade óleos essenciais ativos frente a células do epitélio mamário bovino MAC-T

Os óleos essenciais mais ativos de acordo com a concentração inibitória mínima *C. zeylanicum* (1), *C. sativum* (7), *O. vulgare* (16), *S. aromaticum* (18) e *T. vulgaris* (19) foram avaliados quanto a sua toxicidade em células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T).

O potencial citotóxico de cada óleo essencial foi investigado pelo método de redução do sal tetrazólio MTT. A presença dos óleos, nas diferentes concentrações estudadas (5 - 30 mg/mL), foi testado quanto a redução da viabilidade das células epiteliais mamárias em cultura no intervalo investigado de 72 horas.

O resultado da viabilidade celular foi exposto em porcentagem em relação ao controle positivo (Figura 4)

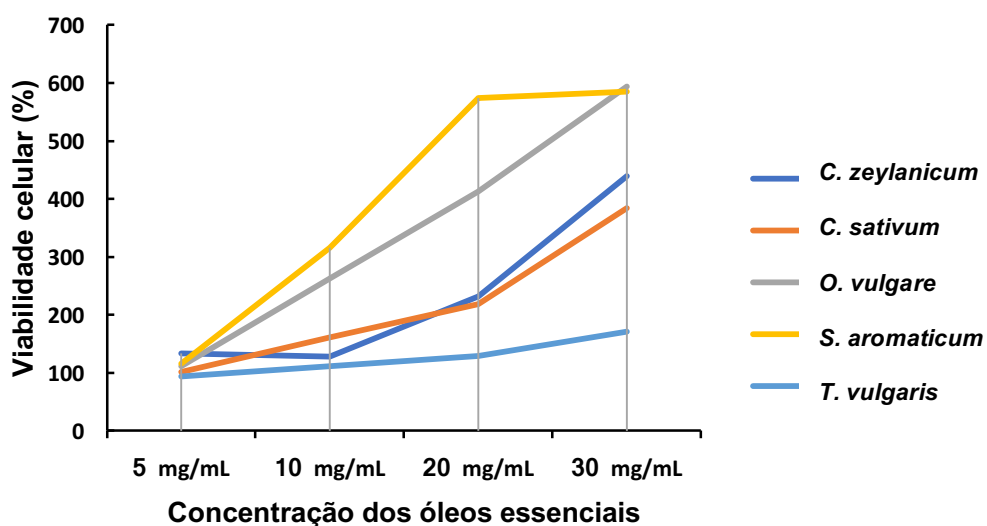


Figura 4. Avaliação da citotoxicidade dos óleos essenciais sobre células MAC-T.

A determinação de qualquer efeito citotóxico dos óleos essenciais em células mamárias bovinas se faz necessária para garantir a segurança em futuros testes *in vivo*. A citotoxicidade dos óleos essenciais ativos foi testada em células do epitélio mamário bovino MAC-T.

Os óleos testados nas concentrações pré-determinadas não apresentaram efeito citotóxico nas células da linhagem MAC-T (Figura 4). No entanto um efeito observado foi a estimulação da proliferação celular em todos óleos essenciais de acordo com o aumento da concentração, o que pode servir para regenerar o tecido do úbere lesados por mastite. Resultado similar foi encontrado por Federman e colaboradores (2016), que avaliou o efeito citotóxico do óleo essencial derivado de citrus e concluiu que em algumas dosagens o óleo foi capaz de aumentar a proliferação de células MAC-T.

Os compostos do OE de *C. zeylanicum* já foram avaliados em estudos anteriores a respeito de sua toxicidade e os compostos álcool cinâmico, cinamaldeído e ácido cinamico apresentaram uma DL50 (Dose letal 50%) acima de 5000mg/kg quando utilizados de forma tópica em coelhos. Na forma de administração oral a DL50 em ratos do álcool cinâmico e ácido cinamico foram relatadas 2000mg/kg e 3570mg/ kg, respectivamente, a DL50 do cinamaldeído foi de 2220mg/kg em ratos. Esses resultados demonstram que os compostos presentes no OE de *C. zeylanicum* apresentam índices de toxicidade baixo, evidenciando sua segurança no uso tópico ou oral nas doses inferiores às relatadas acima (BICKERS *et al.*, 2004).

O óleo essencial de *C. sativum* é considerado um dos óleos essenciais mais utilizados no mundo e seu uso em alimentos são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA), *Federal Emergency Management Agency* (FEMA) e Conselho Europeu (CoE) (BURDOCK e CARABIN 2009). Diversos estudos visando avaliar a atividade antimicrobiana do óleo de coentro com finalidade de uso como aditivo alimentar foram realizados, no entanto o óleo e seus componentes podem ser empregados em outras formulações como agentes sanitizantes ou mesmo no tratamento de infecções (KUNICKA-STYCZYNSKA *et al.*, 2010).

Cleff e colaboradores (2008) realizaram um estudo de toxicidade pré-clínico de OE de *O. vulgare* em ratas Wistar. O experimento foi realizado com grupos tratados via oral, via vaginal e controles, com doses de 3% durante 30 dias e ao final do tratamento, os animais foram analisados e os resultados não evidenciaram qualquer alteração macroscópica nos tecidos do trato reprodutivo e digestivo, assim como no fígado, baço e rins e ainda nas avaliações clínicas, hematológicas e histopatológicas não foram observadas alterações, comprovando a segurança em uso tópico ou oral.

Os resultados encontrados sugerem que além de não apresentarem citotoxicidade, os óleos essenciais testados promoveram um aumento da viabilidade celular do epitélio mamário bovino e pesquisas futuras para elucidar os mecanismos envolvidos nesse processo e a segurança deste achado são sugeridas, visto que esse poder de regeneração pode ser útil no processo de cicatrização durante o tratamento da mastite bovina, diminuindo assim o tempo de recuperação do animal.

5.7 Avaliação da atividade dos óleos essenciais ativos sobre biofilme em formação

A avaliação das soluções pós-dipping com óleos essenciais sozinhos e em combinação nas concentrações 30 mg/mL e 10 mg/mL foi realizada com os biofilmes em formação dos isolados de *S. aureus* SA4075, SA4125 e SA4158 de acordo com metodologia descrita anteriormente. Os resultados estão demonstrados na figura 5.

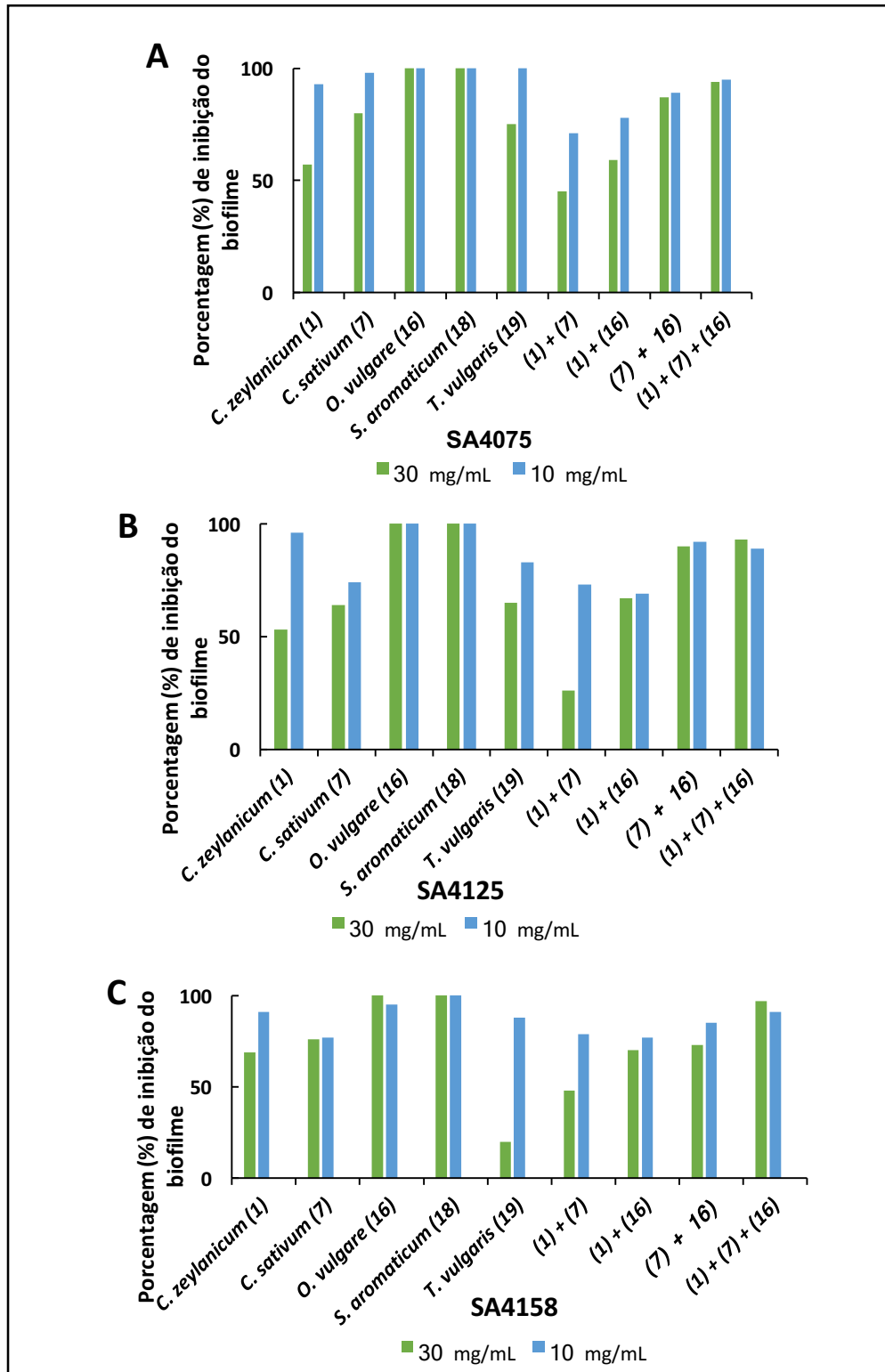


Figura 5. Descrição da porcentagem de inibição das soluções pós-dipping a 30 mg/mL e 10 mg/mL sobre o biofilme em formação do isolado de *S. aureus* **A** SA4075 **B** SA4125 e **C** SA4158: *C. zeylanicum* (1), *C. sativum* (7), *O. vulgare* (16), *S. aromaticum* (18) e *T. vulgaris* (19.)

O óleo essencial de *C. zeylanicum* demonstrou melhor inibição da adesão do biofilme quando incorporada na fórmula em concentração de 10 mg/mL inibindo 93% da formação do biofilme, enquanto na concentração de 30 mg/mL inibiu somente 57% na estirpe SA4075. As combinações entre canela (1) e coentro (7)/orégano (16) seguiram a mesma tendência e promoveram maior inibição em menor concentração diminuindo de 59 a 45% do biofilme, contudo quando em conjunto com os dois óleos inibiu de 94 a 95% em ambas as concentrações.

As melhores inibições foram por parte dos pós-dipping com os OEs de cravo (18) e orégano (16) com inibição total da aderência bacteriana em ambas as concentrações nas bactérias SA4075 e SA4125, na bactéria SA4158 o OE de orégano (16) inibiu 93% na concentração de 10 mg/mL.

Alguns óleos essenciais em maior concentração não foram capazes de inibir a formação do biofilme da mesma forma que as concentrações 2CIM e CIM, mesmo o controle da fórmula sem adição de óleo não interferir na adesão do biofilme. Reação similar de alguns antibióticos em biofilmes (FEDERMAN *et al.*, 2016).

A indução da formação do biofilme pode ser ocasionada por doses subinibitórias e até mesmo por altas dosagens, criando uma curva de dose resposta na qual o antibiótico é mais efetivo sobre biofilmes em determinadas doses (KAPAN, 2011).

O óleo essencial de cravo (18) incorporado na formulação, demonstrou um alto poder de redução da adesão bacteriana de todos os isolados e em ambas as concentrações. Esse resultado pode estar relacionado com o seu componente majoritário, o carvacrol, que possui efeitos específicos sobre as bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, afetando a morfologia celular na arquitetura típica do biofilme e sua adesão às superfícies (SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2011).

5.9 Avaliação da atividade antibacteriana das formulações de pós-dipping pelo método de diluição em leite

A avaliação das formulações de pós-dipping contendo óleos essenciais ativos sozinhos e em combinações foi realizada de acordo com protocolo anterior. Os resultados foram reportados em porcentagem relativa ao controle positivo composto apenas por leite + bactéria (Tabela 10).

Tabela 10. Efeito das formulações pós-dipping contendo óleos essenciais de plantas condimentares na multiplicação de microrganismos causadores de mastite no leite *in vitro*.

Tratamento/Concentração utilizada	Multiplicação bacteriana em relação ao controle nas diferentes estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>		
	4075	4125	4158
<i>C. zeylanicum</i> 3%	0±0%	0±0%	0±0%
<i>C. sativum</i> 3%	0±0%	0±0%	0±0%
<i>O. vulgare</i> 3%	0±0%	0±0%	0±0%
<i>C. sativum</i> 1,5% + <i>O. vulgare</i> 1,5%	0±0%	0±0%	0±0%
<i>C. zeylanicum</i> 1,5% + <i>C. sativum</i> 1,5%	0±0%	0±0%	0±0%
<i>C. zeylanicum</i> 1,5% + <i>O. vulgare</i> 1,5%	0±0%	0±0%	0±0%
<i>C. zeylanicum</i> 1% + <i>O. vulgare</i> 1% + <i>C. sativum</i> 1%	0±0%	0±0%	0±0%
Cefoperazona 1%	0±0%	0±0%	0±0%

Os tratamentos empregados demonstraram forte atividade antibacteriana, esse fator pode ser explicado pela quantidade de óleo essencial utilizada ser bastante superior ao valor de CIM estabelecido nesse trabalho.

Mullen e colaboradores (2014) realizaram um estudo que visava avaliar a atividade antibacteriana de um fitoterápico comercial de uso intramamário a base de OEs, indicado para tratar mastite bovina e aumentar a qualidade do leite. O ensaio foi realizado utilizando a mesma metodologia desse estudo, com bactérias *S. aureus*, *S. chromogenes* e *S. uberis* isoladas de mastite. Apesar da presença do OE de *T. vulgaris*, um antimicrobiano descrito previamente na literatura o resultado foi de ausência de inibição nos isolados de *S. aureus* e *S. uberis*, e inibição parcial de 53% do crescimento em *S. chromogenes*.

O óleo essencial *O. vulgare* possui atividade antimicrobiana por possuir vários compostos fenólicos em sua composição, uma característica inerente de espécies da família Lamiacea. O carvacrol e o timol são conhecidos por apresentarem atividade

antibacteriana e seus mecanismos de ação estão relacionados com o colapso da força próton-motiva bacteriana por depleção de ATP, que como consequência causa morte celular (THORMAR, 2010).

Segundo Zhang e colaboradores (2016) o mecanismo de ação do OE de *C. zeylanicum* contra *S. aureus* está relacionado as mudanças do potencial da membrana bacteriana e danos estruturais que foram observados após análise da microestrutura bacteriana.

5.10 Análises cromatográficas dos óleos essenciais

Os óleos essenciais que apresentaram atividade frente as bactérias foram submetidos a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para determinar seus componente majoritários.

5.10.1 Cromatograma do óleo essencial *Cinnamomum zeylanicum* (Canela)

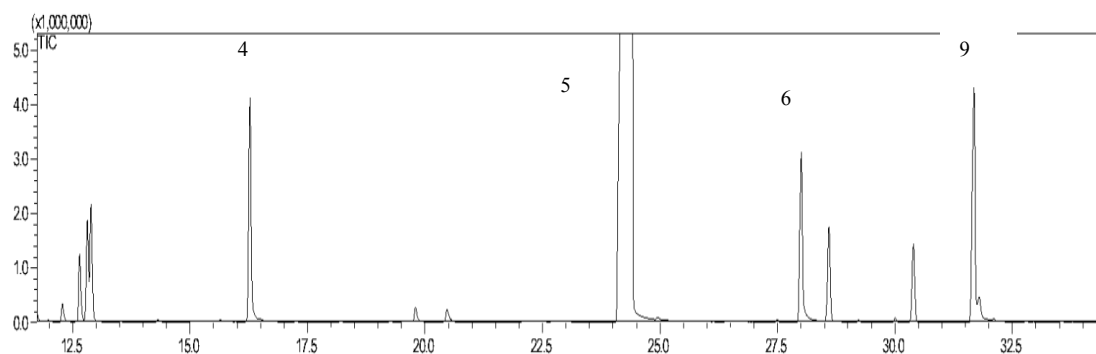


Figura 6. Cromatograma do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*.

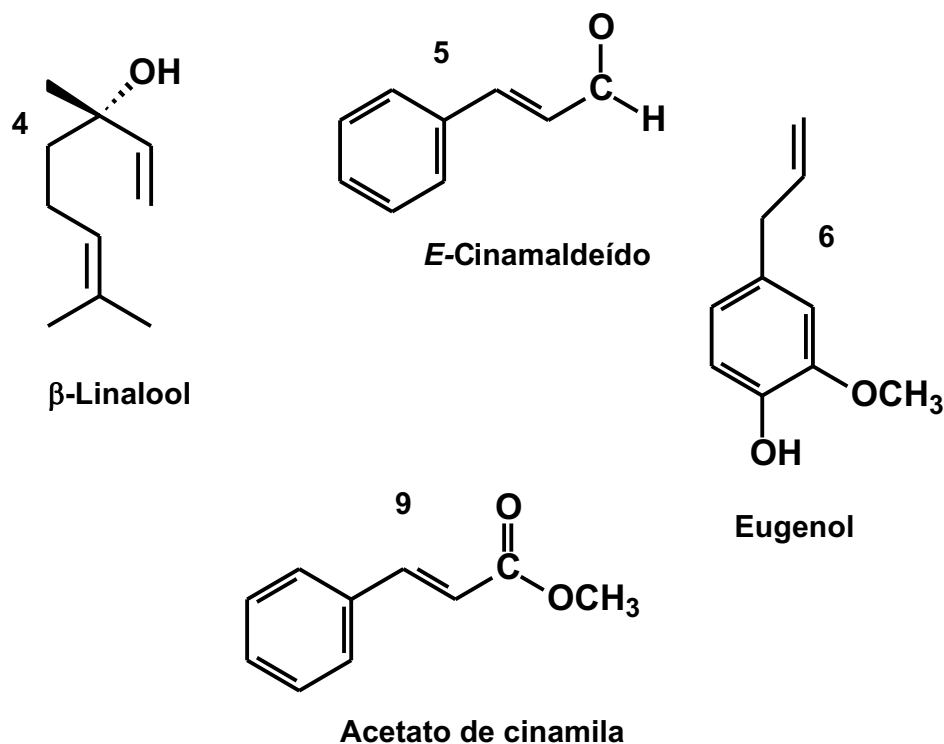


Figura 7. Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *C. zeylanicum*.

Os componentes mais abundantes no óleo essencial da canela do ceilão são os representados na figura 10, *E*-cinamaldeído, eugenol, Acetato de Cinamila e β -Linalol. Os resultados encontrados são confirmados por outros autores que evidenciaram uma similaridade em relação a composição do OE de *C. zeylanicum* (PIOVEZAN, *et al.*, 2014; UNLU *et al.*, 2010).

De acordo com estudos previamente realizados, o *E*-cinamaldeído e o eugenol são capazes de inibir o crescimento de microorganismos, (LEITE A. M., *et al.*, 2007 e SIDDIQUA S. *et al.*, 2014). Segundo pesquisa feita por CANSIAN R. L. *et al.*, 2010 o composto β -Linalol é capaz de inibir o crescimento de linhagens de *Staphylococcus aureus* a uma concentração de 1,75 mg/mL.

5.10.2 Cromatograma do óleo essencial *Coriandrum sativum* (Coentro)

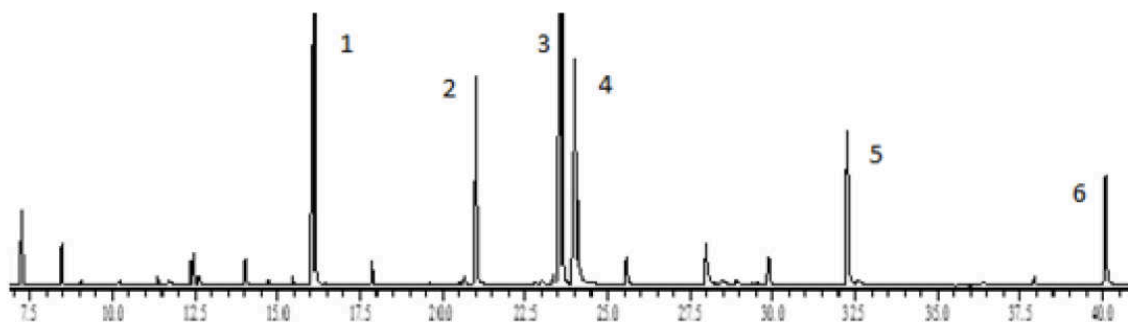


Figura 8. Cromatograma do óleo essencial de *Coriandrum sativum*.

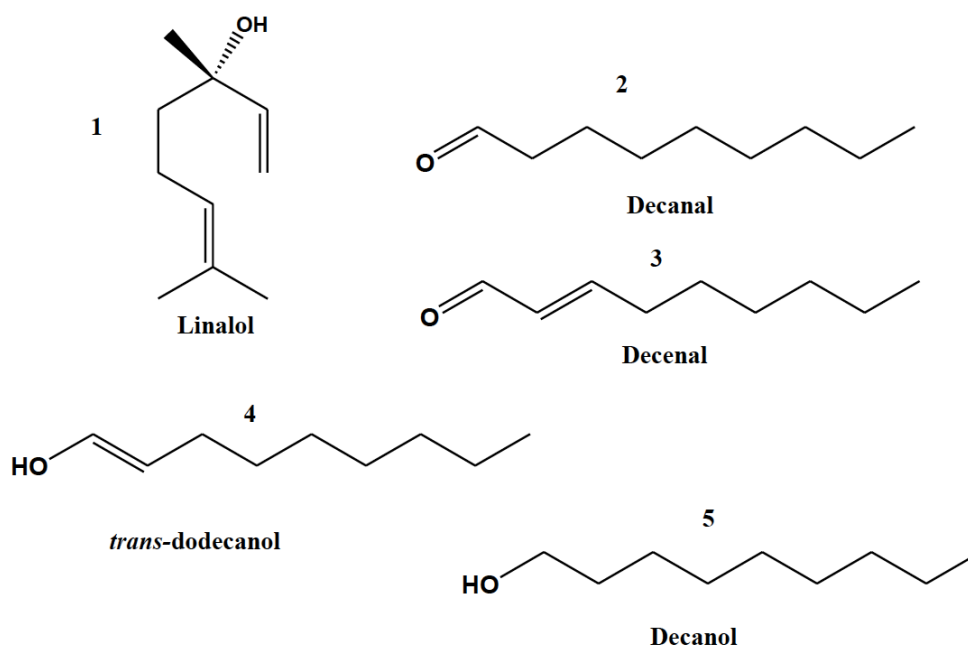


Figura 9. Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *C. sativum*

Bersan e colaboradores (2014) analisaram a constituição química do OE de *C. sativum* e notaram a presença de vários álcoois alifáticos, dentre eles 1-decano, E-2-decen-1-ol, 2-dodec-1-ol e E-2-tetradecen-1-ol, E-3-hexen-1-ol.

Begnami e colaboradores (2009) identificaram os constituintes principais de *C. sativum*, álcoois foram encontrados em maior concentração e aldeídos em menor concentração, entre os compostos alcóolicos foi evidenciada a presença de 1-decanol, 2-E-decenol, 2-Z-dodecenol e 3-hexenol, enquanto os compostos aldeídos em maior quantidade foram o decanal, dodecanal e 2-dodecenal.

Ao analisar a atividade biológica desse OE e suas frações, em diferentes microrganismos, Begnami e colaboradores (2009) apontaram que a atividade antibacteriana do *C. sativum* pode estar relacionada com a quantidade de álcoois em sua composição.

5.10.3 Cromatograma do óleo essencial *Origanum vulgare* (Orégano)

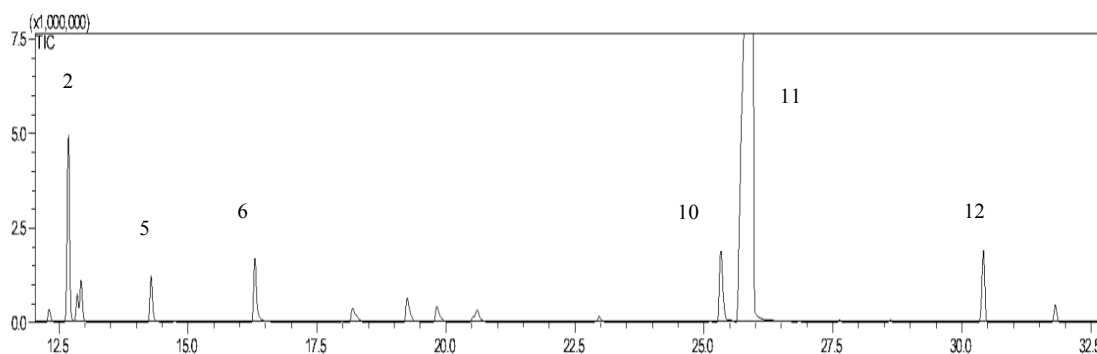


Figura 10. Cromatograma do óleo essencial de *Origanum vulgare*.

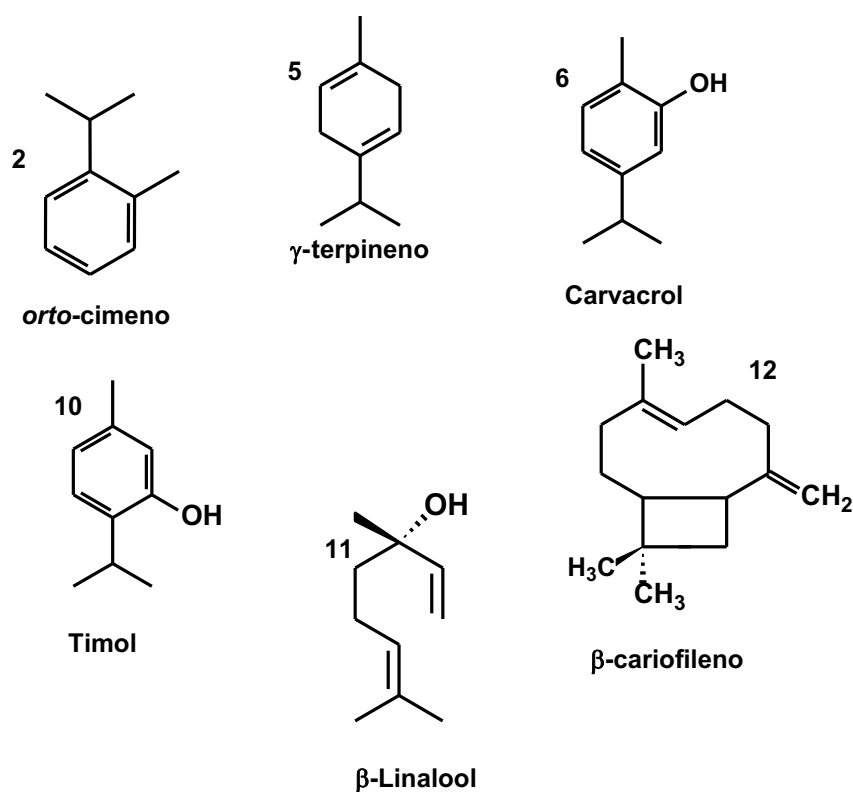


Figura 11. Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *O. vulgare*.

O óleo essencial do orégano é composto, principalmente, por carvacrol, o-cimeno e timol. Teixeira e colaboradores (2013) identificaram carvacrol e timol como componentes majoritários, além da presença de γ -terpineno e cariofileno, em pesquisa fitoquímica de *O. vulgare* de vários quimiotipos. Segundo estudo feito por Gavaric e colaboradores (2015) o carvacrol e o timol são capazes de inibir a atividade bacteriana em conjunto ou isolados. Contudo este óleo também contém porções significativas de β -linalol e γ -terpineno, os quais estão presentes em outros óleos essenciais que, assim como o orégano, apresentam atividade antimicrobiana.

5.10.4 Cromatograma do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (Cravo)

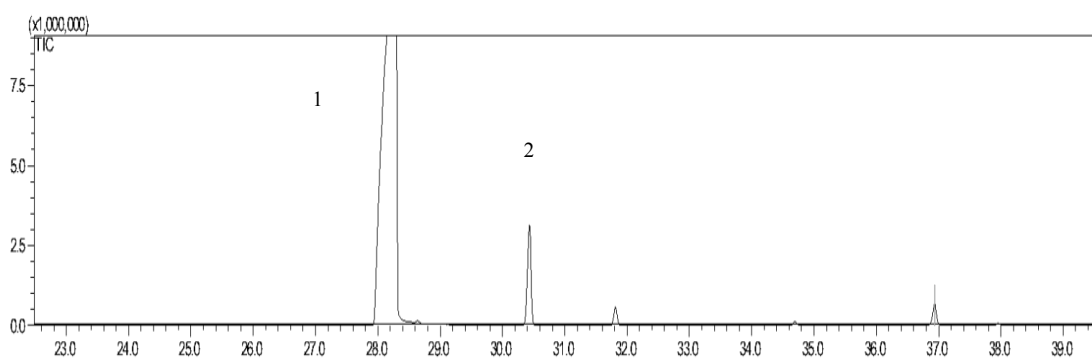


Figura 12. Cromatograma do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.

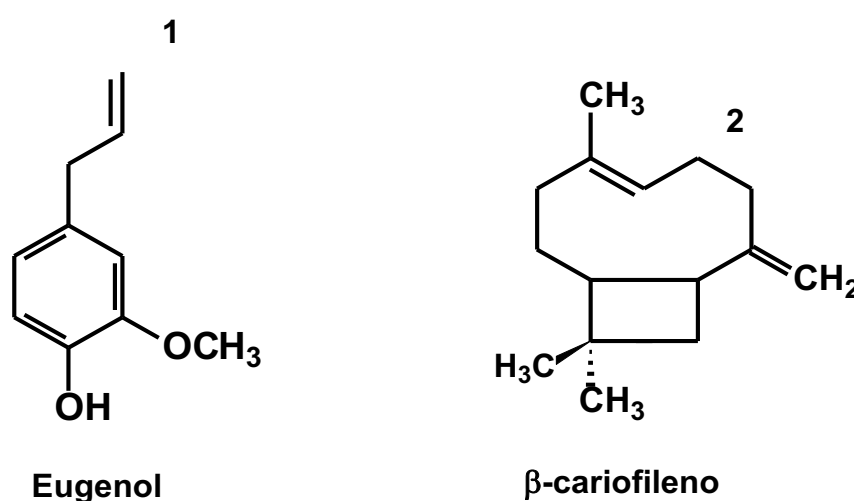


Figura 13. Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *S. aromaticum*.

O componente majoritário do óleo de cravo talo é o eugenol, representando cerca de 96% de toda a composição do óleo. Este alto teor de eugenol pode explicar a atividade antimicrobiana demonstrada pelo cravo talo contra vários microrganismos. O segundo composto mais presente neste óleo é o β -cariofileno que, segundo Toscan e colaboradores (2010) demonstrou potencial de inibição em várias linhagens de microrganismos.

Bauer e colaboradores (2001) reportaram a presença de eugenol em maior quantidade, acetato de eugenol e β -cariofileno em análise fitoquímica de OE de *S. aromaticum*. Resultados semelhantes foram demonstrados por Budri e colaboradores (2015) durante pesquisa fitoquímica e antimicrobiana de OE e compostos majoritários de *C. zeylanicum* e *S. aromaticum*.

5.10.5 Cromatograma do óleo essencial *Thymus vulgaris* (Tomilho)

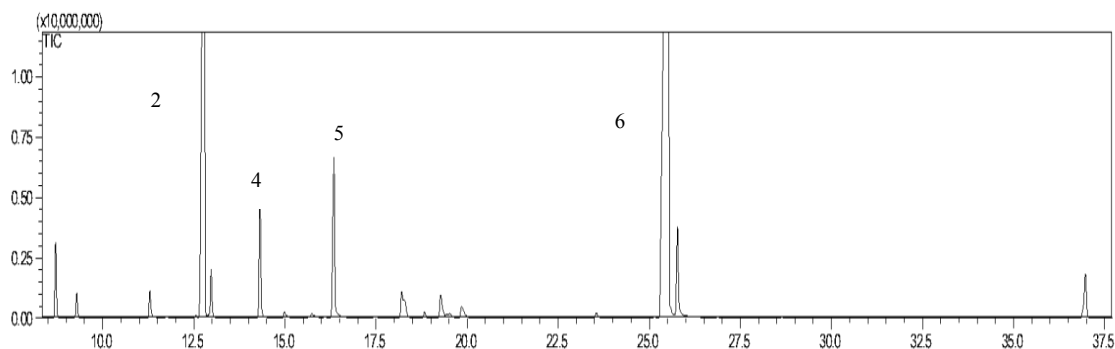


Figura 14. Cromatograma do óleo essencial de *Thymus vulgaris*.

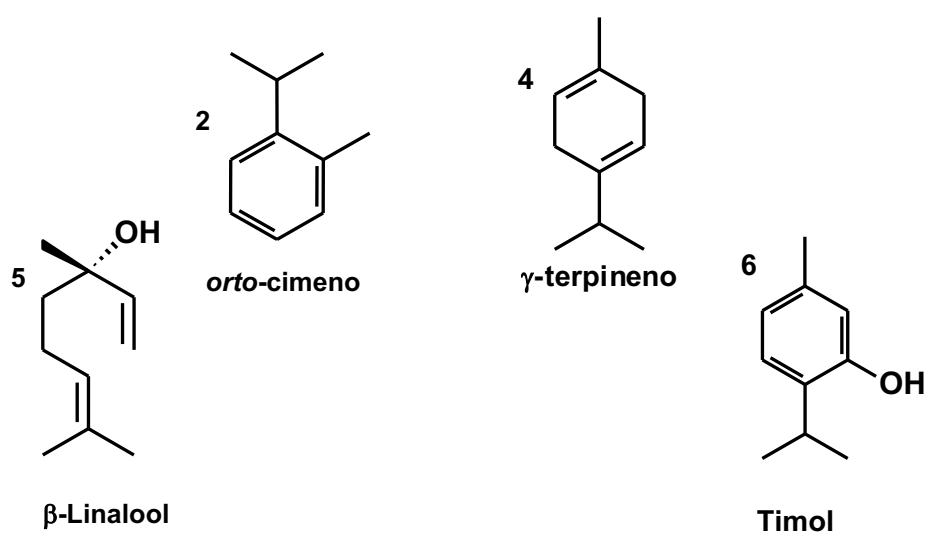


Figura 15. Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *T. vulgaris*.

As fórmulas estruturais dos componentes majoritários presente no OE de tomilho branco estão representadas na figura 18. Lee e colaboradores (2005) detectaram a presença de diversos compostos durante análise fitoquímica do OE de *T. vulgaris*, entre eles identificaram, timol, carvacrol, linalool, α -terpineol e 1,8-cineole, com presença de componente majoritário similar ao encontrado no presente estudo.

Ao comparar este OE com o derivado de orégano, percebe-se que os compostos majoritários do tomilho também estão presentes no OE de orégano. Este fato pode explicar a atividade antibacteriana encontrada em ambos, porém vale salientar que compostos minoritários podem influenciar na atividade antimicrobiana dos óleos tanto positiva quanto negativamente o que pode ser percebido na diferença da CIM nos dois óleos essenciais.

6. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *C. zeylanicum* (1), *C. sativum* (7), *O. vulgare* (16), *S. aromaticum* (18) e *T. vulgaris* (19) inibiram todas as bactérias isoladas de mastite utilizadas no presente estudo pelo método microdiluição. Os menores valores da CIM foram obtidos pelo OE de *C. sativum* (7) para todos os isolados, seguidos pelos resultados de *C. zeylanicum* (1), *O. vulgare* (16), *T. vulgaris* (19) e *S. aromaticum* (18) sendo os dois últimos considerados fracos agente antimicrobianos. Em relação a atividade antibiofilme os óleos essenciais de *S. aromaticum* (18), *O. vulgare* (16) e *T. vulgaris* (19) foram os mais eficazes mesmo quando utilizados em concentrações subinibitórias. O OE de *C. zeylanicum* demonstrou antagonismo em relação a inibição do biofilme em doses inferiores à concentração inibitória mínima.

No teste de interação foi verificada a presença de interação aditiva entre o óleo essencial de *C. zeylanicum* (1), *S. aromaticum* (18) e *T. vulgaris* (19) associado a cefoperazona. Em relação a interação entre os óleos somente os OEs *T. vulgaris* e *O. vulgare* demonstraram interação aditiva em todos os isolados bacterianos.

No teste de citotoxicidade em células da linhagem MAC-T nenhum dos OE apresentaram toxicidade, um aumento na viabilidade celular dependente de concentração foi observado.

Em relação as formulações pós-dipping observamos que a atividade

antibacteriana dos mesmos não foi dependente da concentração visto que os pós-dipping em combinações a 1% e 1,5% apresentaram atividades biológicas significativas. Na produção de biofilme a combinação entre os OE *C. zeylanicum* (1), *C. sativum* (7) e *O. vulgare* (16) a 1% cada promoveu maior redução em todas as bactérias. De forma geral, as associações potencializaram os efeitos dos pós-dipping na inibição da adesão bacteriana e as atividades biológicas tanto dos pós-dipping quanto dos óleos essenciais variaram de acordo com o teste utilizado e a bactéria testada.

Concluimos com o presente estudo que os óleos essenciais *C. zeylanicum* (1), *C. sativum* (7), *O. vulgare* (16), *S. aromaticum* (18) e *T. vulgaris* (19) apresentaram atividade antibacteriana e antibiofilme contra bactérias causadoras de mastite tanto puros quanto incorporados às formulações pós-dipping, sendo considerados agentes promissores para o emprego em produtos de sanitização pós-ordena.

Entretanto, estudos mais detalhados *in vitro* e *in vivo* bem como estudos de avaliação de toxicidade devem ser realizados visando uma possível aplicação profilática e/ou terapêutica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdi-Ali, A., Mohammadi-Mehr, M., & Alaei, Y. A. (2006). Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of antimicrobial agents*, 27(3), 196-200.
- Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., & Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 270.
- Agra, M. D. F., Freitas, P. F. D., & Barbosa-Filho, J. M. (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1), 114-140.
- Akhtar, Y., STEVENS, A., BRADBURY, R., da CAMARA, C. A., & ISMAN, M. B. (2012). Effect of chemical complexity of essential oils on feeding deterrence in larvae of the cabbage looper. *Physiological Entomology*, 37(1), 81-91.
- Aliyiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9), 4168-4170.
- Aminzare, M., Hashemi, M., Azar, H. H., & Hejazi, J. (2016). The use of herbal extracts and essential oils as a potential antimicrobial in meat and meat products: a review. *Journal of Human, Environment and Health Promotion*, 1(2), 63-74.
- Andre, C. (2015). Adesão, formação e composição de biofilme por *Staphylococcus aureus* em poliestireno na presença de nisina.
- Bayazit, V., & Konar, V. (2010). Biochemical and physiological evaluations of Limnoids as potential cancer destroyers. *J Anim Vet Adv*, 9(7), 1099-107.
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., & Karadoğan, T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food control*, 15(3), 169-172.

Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156-164.

Begnami, A. F., Duarte, M. C. T., Furletti, V., & Rehder, V. L. G. (2010). Antimicrobial potential of *Coriandrum sativum* L. against different *Candida* species in vitro. *Food chemistry*, 118(1), 74-77.

Bersan, S. M., Galvão, L. C., Goes, V. F., Sartoratto, A., Figueira, G. M., Rehder, V. L., ... & Duarte, M. C. (2014). Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 451.

Bhuiyan, M. N. I., Begum, J., & Sultana, M. (2009). Chemical composition of leaf and seed essential oil of *Coriandrum sativum* L. from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 4(2), 150-153.

Bickers, D., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J. M., Rogers, A. E., Saurat, J. H., et al. (2005). A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. *Food Chem. Toxicol.* 43, 799–836.

Bogavac, M., Karaman, M., Janjušević, L., Sudji, J., Radovanović, B., Novaković, Z., ... & Božin, B. (2015). Alternative treatment of vaginal infections—in vitro antimicrobial and toxic effects of *Coriandrum sativum* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Journal of applied microbiology*, 119(3), 697-710.

Bolzani, V. D. S. (2016). Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. *Ciência e Cultura*, 68(1), 04-05.

Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., Janjic, J., Djordjevic, J., Starcevic, M., & Baltic, M. Z. (2015). Antimicrobial activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. *Procedia Food Science*, 5, 18-21.

Bouzenna, H., Dhibi, S., Samout, N., Rjeibi, I., Talarmin, H., Elfeki, A., & Hfaiedh, N. (2016). The protective effect of Citrus limon essential oil on hepatotoxicity and

nephrotoxicity induced by aspirin in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 1327-1334.

Bradley, A. J. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal*, 164(2), 116-128.

Budri, P. E., Silva, N. C. C., Bonsaglia, E. C. R., Fernandes, A., Araújo, J. P., Doyama, J. T., ... & Rall, V. L. M. (2015). Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *Journal of dairy science*, 98(9), 5899-5904.

Bukovská, A., Cikoš, Š., Juhás, Š., Il'ková, G., Reháč, P., & Koppel, J. (2007). Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice. *Mediators of inflammation*, 2007.

Burdock, G. A., & Carabin, I. G. (2009). Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 22-34.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

Callaway, T. R., Carroll, J. A., Arthington, J. D., Edrington, T. S., Rossman, M. L., Carr, M. A., ... & Nisbet, D. J. (2011). *Escherichia coli* O157: H7 populations in ruminants can be reduced by orange peel product feeding. *Journal of food protection*, 74(11), 1917-1921.

Cansian, R. L., Mossi, A. J., Oliveira, D. D., Toniazzo, G., Treichel, H., Paroul, N., ... & Serafini, L. A. (2010). Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(2), 378-384.

Cardozo, V. F., Lancheros, C. A., Narciso, A. M., Valereto, E. C., Kobayashi, R. K., Seabra, A. B., & Nakazato, G. (2014). Evaluation of antibacterial activity of nitric

oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis. *International journal of pharmaceutics*, 473(1), 20-29.

Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical microbiology reviews*, 19(1), 50-62.

Carvalho, C. M., Macedo-Costa, M. R., Pereira, M. S. V., Higino, J. S., Carvalho, L. F. P. C., & Costa, L. J. (2009). Efeito antimicrobiano in vitro do extrato de jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg.] sobre *Streptococcus* da cavidade oral. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11(1), p79-83.

Carvalho, I. D. O. (2016). Atividade antibacteriana de óleos essenciais e cremes dentais fitoterápicos em bactérias cariogênicas.

Casetti, F., Bartelke, S., Biehler, K., Augustin, M., Schempp, C. M., & Frank, U. (2012). Antimicrobial activity against bacteria with dermatological relevance and skin tolerance of the essential oil from *Coriandrum sativum* L. fruits. *Phytotherapy Research*, 26(3), 420-424.

Chang, L., Jia, S., Fu, Y., Zhou, T., Cao, J., He, Q., ... & Zhu, H. (2015). Ougan (*Citrus reticulata* cv. Suavissima) flavedo extract suppresses cancer motility by interfering with epithelial-to-mesenchymal transition in SKOV3 cells. *Chinese medicine*, 10(1), 14.

Chung, J. Y., Choo, J. H., Lee, M. H., & Hwang, J. K. (2006). Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine*, 13(4), 261-266.

Cirino, I. C. S., Menezes-Silva, S. M. P., Silva, H. T. D., de Souza, E. L., & Siqueira-Júnior, J. P. (2014). The essential oil from *Origanum vulgare* L. and its individual constituents carvacrol and thymol enhance the effect of tetracycline against *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy*, 60(5-6), 290-293.

Cleff, M. B., Meinerz, A. R., Sallis, E. S., Antunes, T. A., Mattei, A., Rodrigues, M. R., ... & Mello, J. R. (2008). Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleo essencial

do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em ratas Wistar. *Latin Am. J. Pharm*, 27, 704-709.

CLSI, W. (2012). Clinical and laboratory standards institute methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. *Approved Standard M7-A7, CLSI, seventh ed., PA, USA*.

Costa, A. C. D., Santos, B. H. C. D., Santos Filho, L., & Lima, E. D. O. (2009). Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1B), 236-241.

Costa, E. (2009). Mastite: os seus prejuízos em números. *Revista Balde Branco*. <http://www.bichoonline.com.br/artigo>. Acessado março/2017.

Cox, S. D., Mann, C. M., & Markham, J. L. (2001). Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 492-497.

Czech, H., Schepler, C., Klingbeil, S., Ehlert, S., Howell, J., & Zimmermann, R. (2016). Resolving coffee roasting-degree phases based on the analysis of volatile compounds in the roasting off-gas by photoionization time-of-flight mass spectrometry (PI-TOFMS) and statistical data analysis: toward a PI-TOFMS roasting model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(25), 5223-5231.

da Paz LIMA, M., Maria das Graças, B., & Andrade, E. H. A. (2005). Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae).

da Silveira, S. M., Luciano, F. B., Fronza, N., Cunha, A., Scheuermann, G. N., & Vieira, C. R. W. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 86-93.

Dadaloğlu, I., & Evrendilek, G. A. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum*

vulgare) on common foodborne pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 8255-8260.

Dal Pozzo, M., Viégas, J., Santurio, D. F., Rossatto, L., Soares, I. H., Alves, S. H., & Costa, M. M. D. (2011). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. Isolados de mastite caprina. *Ciência Rural*, 11, 54-56.

de Sousa Guedes, J. P., da Costa Medeiros, J. A., e Silva, R. S. D. S., de Sousa, J. M. B., da Conceição, M. L., & de Souza, E. L. (2016). The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 183-192.

Dhouioui, M., Boulila, A., Chaabane, H., Zina, M. S., & Casabianca, H. (2016). Seasonal changes in essential oil composition of *Aristolochia longa* L. ssp. *paucinervis* Batt.(Aristolochiaceae) roots and its antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*, 83, 301-306.

Dias, R. D. C. (2007). Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. *Acta Veterinária Brasileira*, 1(1), 23-27.

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.

Duarte, A., Ferreira, S., Silva, F., & Domingues, F. C. (2012). Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine*, 19(3), 236-238.

Duarte, C. M., Freitas, P. P., & Bexiga, R. (2015). Technological advances in bovine mastitis diagnosis an overview. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1040638715603087.

Duarte, M. C. T. (2006). Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Revista Multiciência, Campinas*, 7(1).

Dziggel, C., Schäfer, H., & Wink, M. (2016). Tools of pathway reconstruction and production of economically relevant plant secondary metabolites in recombinant microorganisms. *Biotechnology Journal*.

Elizei, V. G., Chalfoun, S. M., dos Santos Botelho, D. M., & Rebelles, P. P. R. (2016). Atividade antifúngica, in vitro, do óleo de café verde. *Arquivos do Instituto Biológico*, 83, 01-04.

Faleiro, M., & Miguel, M. (2013). Use of essential oils and their components against multidrug-resistant bacteria. *Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components*, 65-94.

Faria, R. N. (2013). *Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha de Phanera flexuosa (Moric.) LP Queiroz (Caesalpinioideae) e da inibição de fatores de virulência de Staphylococcus aureus resistentes a antibióticos* (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia).

Federman, C., Joo, J., Almario, J. A., Salaheen, S., & Biswas, D. (2016). Citrus-derived oil inhibits *Staphylococcus aureus* growth and alters its interactions with bovine mammary cells. *Journal of dairy science*, 99(5), 3667-3674.

Ferro, T. A., Araújo, J. M., dos Santos Pinto, B. L., dos Santos, J. S., Souza, E. B., da Silva, B. L., ... & Calixto, J. B. (2016). Cinnamaldehyde inhibits *Staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a *Galleria mellonella* model. *Frontiers in Microbiology*, 7.

Feßler, A. T., Kaspar, H., Lindeman, C. J., Stegemann, M. R., Peters, T., Mankertz, J., ... & Schwarz, S. (2012). A proposal of interpretive criteria for cefoperazone applicable to bovine mastitis pathogens. *Veterinary microbiology*, 157(1), 226-231.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.

Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., & Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, 21(10), 989-994.

Gaínza, Y. A., Domingues, L. F., Perez, O. P., Rabelo, M. D., López, E. R., & de Souza Chagas, A. C. (2015). Anthelmintic activity in vitro of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. *Industrial Crops and Products*, 76, 647-652.

Gavaric, N., Mozina, S. S., Kladar, N., & Bozin, B. (2015). Chemical Profile, Antioxidant and Antibacterial Activity of Thyme and Oregano Essential Oils, Thymol and Carvacrol and Their Possible Synergism. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(4), 1013-1021.

Gayoso, C. W., Lima, E. O., Oliveira, V. T., Pereira, F. O., Souza, E. L., Lima, I. O., & Navarro, D. F. (2005). Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia*, 76(2), 247-249.

Ghabraie, M., Vu, K. D., Tata, L., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 332-339.

Gomes, F., & Henriques, M. (2016). Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current microbiology*, 72(4), 377-382.

Gomes, F., Saavedra, M. J., & Henriques, M. (2016). Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathogens and disease*, 74(3), ftw006.

Goni, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food chemistry*, 116(4), 982-989.

González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(2), 327-345.

Grigoleit, H. G., & Grigoleit, P. (2005). Peppermint oil in irritable bowel syndrome. *Phytomedicine*, 12(8), 601-606.

Grunwald, L., & Petz, M. (2003). Food processing effects on residues: penicillins in milk and yoghurt. *Analytica Chimica Acta*, 483(1), 73-79.

Hajlaoui, H., Mighri, H., Aouni, M., Gharsallah, N., & Kadri, A. (2016). Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. *Microbial pathogenesis*, 95, 86-94.

Hammer, K. A., Dry, L., Johnson, M., Michalak, E. M., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2003). Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *Oral microbiology and immunology*, 18(6), 389-392.

Herman, A., Tambor, K., & Herman, A. (2016). Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. *Current microbiology*, 72(2), 165-172.

Holland, J. K., Hadrich, J. C., Wolf, C. A., & Lombard, J. (2015). Economics of measuring costs due to mastitis-related milk loss. In *2015 AAEP & WAEA Joint Annual Meeting*.

Hood, J. R., Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. M. (2003). Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *Journal of Essential Oil Research*, 15(6), 428-433.

Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M., & Cavrini, V. (2002). GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 29(4), 691-700.

Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1827-1836.

IBGE. (2011) Tabulações especiais do censo Agropecuário 2006. Rio de Janeiro: IBGE.

- Jafri, H., Husain, F. M., & Ahmad, I. (2014). Antibacterial and antibiofilm activity of some essential oils and compounds against clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical and Therapeutic Sciences*, 1(1), 65-71.
- Jaiswal, P., Kumar, P., Singh, V. K., & Singh, D. K. (2009). Biological effects of *Myristica fragrans*. *Annual review of biomedical sciences*, 11, 21-29.
- Jia, P., Xue, Y. J., Duan, X. J., Shao, S. H. (2011) Effect of cinamaldehyde on biofilm formation and sarA expression of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 53, 409-416.
- Kalembe, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
- Kaplan, J. B. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs*, 34(9), 737-751.
- Karousou, R., Efstathiou, C., & Lazari, D. (2012). Chemical diversity of wild growing *Origanum majorana* in Cyprus. *Chemistry & biodiversity*, 9(10), 2210-2217.
- Khan, M. K., & Dangles, O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 85-104.
- Klaas, I. C., & Zadoks, R. N. (2017). An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transboundary and Emerging Diseases*.
- Kon, K. V., & Rai, M. K. (2012). Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(7), 775-790.
- Kunicka-Styczyńska, A., Sikora, M., & Kalembe, D. (2009). Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *Journal of applied microbiology*, 107(6), 1903-1911.
- Lasa, I., & Penadés, J. R. (2006). Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in microbiology*, 157(2), 99-107.

- Lee, S. J., Umano, K., Shibamoto, T., & Lee, K. G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91(1), 131-137.
- Leite, A. M., Lima, E. D. O., Souza, E. L. D., Diniz, M. D. F. F. M., Trajano, V. N., & Medeiros, I. A. D. (2007). Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(1), 121-126.
- Lima, I. D. O., Oliveira, R. D. A. G., Lima, E. D. O., Farias, N. M. P., & Souza, E. L. D. (2006). Antifungal activity from essential oils on *Candida* species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(2), 197-201.
- Liu, M., Song, S., Li, H., Jiang, X., Yin, P., Wan, C., ... & Xu, J. (2014). The protective effect of caffeic acid against inflammation injury of primary bovine mammary epithelial cells induced by lipopolysaccharide. *Journal of dairy science*, 97(5), 2856-2865.
- Liu, Q., Niu, H., Zhang, W., Mu, H., Sun, C., & Duan, J. (2015). Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. *Letters in applied microbiology*, 60(5), 421-430.
- Mahady, G. B. (2005). Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Current pharmaceutical design*, 11(19), 2405-2427.
- Maksimović, Z., Stojanović, D., Šoštarić, I., Dajić, Z., & Ristić, M. (2008). Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd.(Lamiaceae) essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(11), 2036-2041.
- Manners, G. D. (2007). *Citrus limonoids*: analysis, bioactivity, and biomedical prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8285-8294.
- Martin, J. G. P. (2015). *Biofilmes de Staphylococcus aureus isolados de laticínios produtores de queijo minas frescal* (Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo).
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A. J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., & Parker, M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International journal of food microbiology*, 107(2), 180-185.

Matasyoh, J. C., Maiyo, Z. C., Ngure, R. M., & Chepkorir, R. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chemistry*, 113(2), 526-529.

McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 20(8), 619-633.

Meister, A., Bernhardt, G., Christoffel, V., & Buschauer, A. (1999). Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects. *Planta medica*, 65(06), 512-516.

Melchior, M. B., Fink-Gremmels, J., & Gaastra, W. (2006). Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53(7), 326-332.

Mendonça, C. L. D., Oliveira, C. M. C., Silveira, J. A. S. D., Sousa, M. G. S. D., Oaigen, R. P., Barbosa Neto, J. D., ... & Silva, N. D. S. (2011). Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará.

Middleton, J. R., Saeman, A., Fox, L. K., Lombard, J., Hogan, J. S., & Smith, K. L. (2014). The National Mastitis Council: a global organization for mastitis control and milk quality, 50 years and beyond. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 19(3-4), 241-251.

Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Chaabouni, Y., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., & Chaieb, K. (2017). Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. *Microbial Pathogenesis*.

Moschonas, G., Geornaras, I., Stopforth, J. D., Woerner, D. R., Belk, K. E., Smith, G. C., & Sofos, J. N. (2015). Effect of Product Dimensions and Surface Browning Method on Salmonella Contamination in Frozen, Surface-Browned, Breaded Chicken Products Treated with Antimicrobials. *Journal of food science*, 80(12), M2815-M2821.

Msaada, K., Hosni, K., Taarit, M. B., Chahed, T., Kchouk, M. E., & Marzouk, B. (2007). Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. *Food Chemistry*, 102(4), 1131-1134.

Mullen, K. A. E., Lee, A. R., Lyman, R. L., Mason, S. E., Washburn, S. P., & Anderson, K. L. (2014). Short communication: an in vitro assessment of the antibacterial activity of plant-derived oils. *Journal of dairy science*, 97(9), 5587-5591.

Mushtaq, S., Rather, M. A., Qazi, P. H., Aga, M. A., Shah, A. M., Shah, A., & Ali, M. N. (2016). Isolation and characterization of three benzylisoquinoline alkaloids from *Thalictrum minus* L. and their antibacterial activity against bovine mastitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 221-226.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.

Neffati, M., & Marzouk, B. (2008). Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions. *Industrial crops and products*, 28(2), 137-142.

Nickerson, S. C. (2011) Mastitis Pathogens | Contagious Pathogens. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, p.408-414.

Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., ... & Blanco, A. R. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of medical microbiology*, 56(4), 519-523.

OLIVEIRA, M. D. S. (2006). Doenças infecciosas em sistemas intensivos de produção de leite. *Documentos/Embrapa Pecuária Sudeste*; 50.

Oliveira, R. D., Lima, E. O., Vieira, W. L., Freire, K. R. L., Trajano, V. N., Lima, I. O., ... & Silva-Filho, R. N. (2006). Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev Bras Farmacogn*, 16(1), 77-82.

- Padalia, H., Moteriya, P., Baravalia, Y., & Chanda, S. (2015). Antimicrobial and synergistic effects of some essential oils to fight against microbial pathogens-a review. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*.
- Palaniappan, K., & Holley, R. A. (2010). Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International journal of food microbiology*, 140(2), 164-168.
- Patil, J. R., Jayaprakasha, G. K., Murthy, K. C., Chetti, M. B., & Patil, B. S. (2010). Characterization of *Citrus aurantifolia* bioactive compounds and their inhibition of human pancreatic cancer cells through apoptosis. *Microchemical Journal*, 94(2), 108-117.
- Pelgrift, R.Y.; Friedman, A.J. (2013) Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.*
- Pereira, A. D. A., Cardoso, M. D. G., Abreu, L. R. D., Morais, A. R. D., Guimarães, L. G. D. L., & Salgado, A. P. S. P. (2008). Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Ciência e Agrotecnologia*.
- Peton, V., & Le Loir, Y. (2014). *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 602-615.
- Piech, T., Majer-Dziedzic, B., Kostruba, A., Grzelak, E. M., & Choma, I. M. (2016). Thin-layer chromatography—direct bioautography as an alternative method for screening of antibiotic residues in milk: A comparative study. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 39(5-6), 292-297.
- Piovezan, M., Uchida, N. S., da Silva, A. F., Grespan, R., Santos, P. R., Silva, E. L., ... & Mikcha, J. M. G. (2014). Effect of cinnamon essential oil and cinnamaldehyde on *Salmonella Saintpaul* biofilm on a stainless steel surface. *The Journal of general and applied microbiology*, 60(3), 119-121.
- Plano Mais Pecuária. (2014) Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília: MAPA/ACS.

- Porte, A., & Godoy, R. L. D. O. (2001). Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 19(2).
- Pozzatti, P., Loreto, É. S., Lopes, P. G. M., Athayde, M. L., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2010). Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. *Mycoses*, 53(1), 12-15.
- Probst, I. S., Sforcin, J. M., VLM, R., Fernandes, A. A. H., & Fernandes Júnior, A. (2011). Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17(2), 159-167.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.
- Qiu, Q., Zhang, G. Y., Sun, X., & Liu, X. (2004). Study on chemical constituents of the essential oil from *Myristica fragrans* Houtt. by supercritical fluid extraction and steam distillation. *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese medicinal materials*, 27(11), 823-826.
- Quijano-Célis, C., Piedrahita, D., & Pino, J. A. (2015). Essential oil of *Coffea arabica* L. var. Castillo leaves from Colombia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(2), 486-488.
- Raffa, R. B., & Pergolizzi Jr, J. V. (2011). Deciphering the mechanism (s) of action of natural products: analgesic peroxide oil as example. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 36(3), 283-298.
- Raffaella, C., Casettari, L., Fagioli, L., Cespi, M., Bonacucina, G., & Baffone, W. (2017). Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 132-140.

- Raina, V. K., Lal, R. K., Tripathi, S., Khan, M., Syamasundar, K. V., & Srivastava, S. K. (2002). Essential oil composition of genetically diverse stocks of *Murraya koenigii* from India. *Flavour and fragrance journal*, 17(2), 144-146.
- Rainard, P. (2005). Tackling mastitis in dairy cows. *Nature biotechnology*, 23(4), 430-431.
- Rajendran, M. P., Pallaiyan, B. B., & Selvaraj, N. (2014). Chemical composition, antibacterial and antioxidant profile of essential oil from *Murraya koenigii* (L.) leaves. *Avicenna journal of phytomedicine*, 4(3), 200.
- Rodrigues, M. L., & Lira, R. K. (2013). Perfil fitoquímico e biológico do extrato hidroalcoólico dos rizomas do gengibre (*Zingiber officinale* roscoe). *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 8(1).
- Ruegg, P. (2005). Premiums, production and pails of discarded milk how much money does mastitis cost you. *Resources Milk Money*, 3, 50-56.
- Santiesteban-Lopez, A., Palou, E., & López-Malo, A. (2007). Susceptibility of foodborne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 486–497.
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321-324.
- Sayyah, M., Saroukhani, G., Peirovi, A., & Kamalinejad, M. (2003). Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. *Phytotherapy Research*, 17(7), 733-736.
- Schillaci, D., Napoli, E. M., Cusimano, M. G., Vitale, M., & Ruberto, A. (2013). *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oil prevented biofilm formation and showed antibacterial activity against planktonic and sessile bacterial cells. *Journal of Food Protection®*, 76(10), 1747-1752.

- Sebei, K., Sakouhi, F., Herchi, W., Khouja, M. L., & Boukhchina, S. (2015). Chemical composition and antibacterial activities of seven *Eucalyptus* species essential oils leaves. *Biological research*, 48(1), 7.
- Settanni, L., Randazzo, W., Palazzolo, E., Moschetti, M., Aleo, A., Guarrasi, V., ... & Germanà, M. A. (2014). Seasonal variations of antimicrobial activity and chemical composition of essential oils extracted from three *Citrus limon* L. Burm. cultivars. *Natural product research*, 28(6), 383-391.
- Shafaghat, A. (2011). Antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oils from flower, leaf and stem of *Origanum vulgare* ssp. *viride* growing wild in north-west Iran. *Natural product communications*, 6(9), 1351-1352.
- Siddiqua, S., Anusha, B. A., Ashwini, L. S., & Negi, P. S. (2015). Antibacterial activity of cinnamaldehyde and clove oil: effect on selected foodborne pathogens in model food systems and watermelon juice. *Journal of food science and technology*, 52(9), 5834-5841.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S. M., Duarte, V. G., Machado, M. I. L., & Matos, F. J. A. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of ethnopharmacology*, 89(2), 277-283.
- Singh, G., Kapoor, I. P. S., Singh, P., de Heluani, C. S., De Lampasona, M. P., & Catalan, C. A. (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, 46(10), 3295-3302.
- Solórzano-Santos, F., & Miranda-Navales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 136-141.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179.

Tao, N., Jia, L., & Zhou, H. (2014). Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food chemistry*, 153, 265-271.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M., Saraiva, J. A., & Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43, 587-595.

Thormar, H. (Ed.). (2010). *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. John Wiley & Sons.

Tohidi, B., Rahimmalek, M., & Arzani, A. (2017). Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*, 220, 153-161.

Toroglu, S. (2011). In-vitro antimicrobial activity and synergistic/antagonistic effect of interactions between antibiotics and some spice essential oils.

Toscan, C. M. (2014). *Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides* (Doctoral dissertation).

Tozzetti, D. S., Bataier, M. B. N., Almeida, L. R. D., & Piccinin, A. (2008). Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas—revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, 6(10).

Trajano, V. N., Lima, E. D. O., Travassos, A. E., & Souza, E. L. D. (2010). Inhibitory effect of the essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaves on some food-related bacteria. *Food Science and Technology (Campinas)*, 30(3), 771-775.

Tunc, I., Berger, B. M., Eler, F., & Dağlı, F. (2000). Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 36(2), 161-168.

Tuntiwechapikul, W., Taka, T., Songsomboon, C., Kaewtunjai, N., Imsumran, A., Makonkawkeyoon, L., ... & Lee, T. R. (2010). Ginger extract inhibits human telomerase reverse transcriptase and c-Myc expression in A549 lung cancer cells. *Journal of medicinal food*, 13(6), 1347-1354.

- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G. V., Zeytinoglu, H. S., & Vural, N. (2010). Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3274-3280.
- Valmorbida, J., Boaro, C. S. F., Marques, M. O. M., & Ferri, A. F. (2006). Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes concentrações de potássio. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8, 56-61.
- Vasudevan, P., Nair, M. K. M., Annamalai, T., & Venkitanarayanan, K. S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary microbiology*, 92(1), 179-185.
- Verma, R. S., Chauhan, A., Padalia, R. C., Jat, S. K., Thul, S., & Sundaresan, V. (2013). Phytochemical diversity of *Murraya koenigii* (L.) Spreng. from western Himalaya. *Chemistry & biodiversity*, 10(4), 628-641.
- Wang, X., Tao, X., Xia, X., Yang, B., Xi, M., Meng, J., ... & Xu, B. (2013). *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken in China. *Food Control*, 29(1), 103-106.
- Waseem, R., & Low, K. H. (2015). Advanced analytical techniques for the extraction and characterization of plant-derived essential oils by gas chromatography with mass spectrometry. *Journal of separation science*, 38(3), 483-501.
- Wurtzel, E. T., & Kutchan, T. M. (2016). Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future. *Science*, 353(6305), 1232-1236.
- Yang, X. W., Huang, X., & Ahmat, M. (2008). New neolignan from seed of *Myristica fragrans*. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 33(4), 397-402.
- Zaidi, S. F. H., Yamada, K., Kadowaki, M., Usmanhani, K., & Sugiyama, T. (2009). Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal

ailments, against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(2), 286-291.

Zeleny, R., Emteborg, H., Charoud-Got, J., Schimmel, H., Nia, Y., Mutel, I., ... & Hennekinne, J. A. (2015). Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment. *Food chemistry*, 168, 241-246.

Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., & Quek, S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 59, 282-289.

ANEXOS

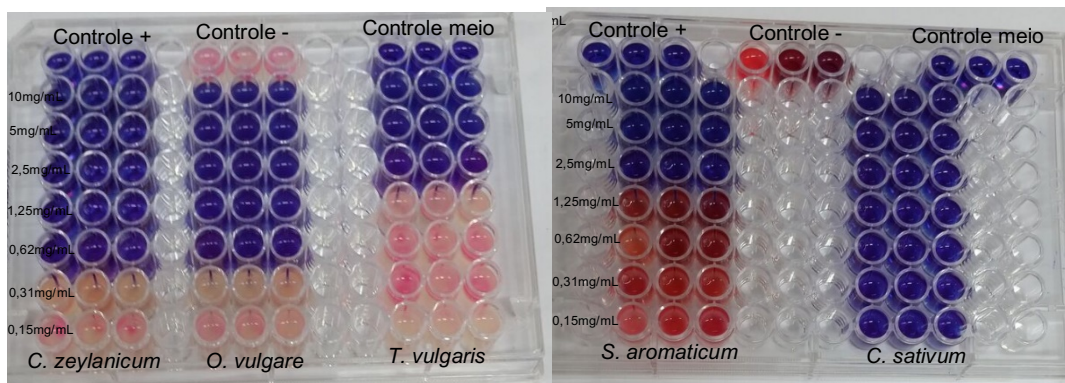


Figura 1A: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *O. vulgare*, *T. vulgaris*, *S. aromaticum* e *C. sativum* sobre o isolado SA4158, concentrações testadas de 10 mg/mL a 0,15 mg/mL.

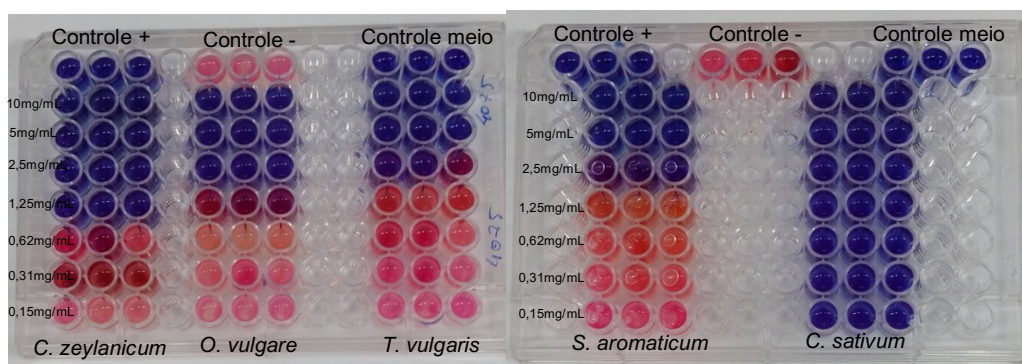


Figura 2A: CIM dos óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *O. vulgare*, *T. vulgaris*, *S. aromaticum* e *C. sativum* sobre o isolado SA4075, concentrações testadas de 10 mg/mL a 0,15 mg/mL.

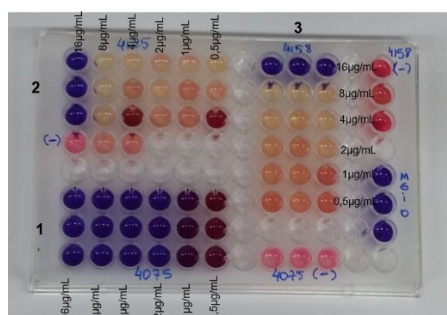


Figura 3A: CIM do antibiótico cefoperazona sobre os isolados SA4075, SA4125 e SA4158, concentrações testadas de 16 µg/mL a 0,5 µg/mL.

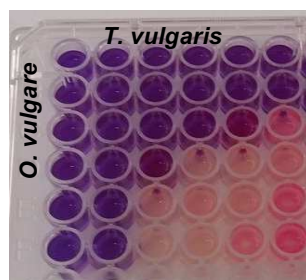


Figura 4A: Interação entre *O. vulgare* e *T. vulgaris* frente ao isolado SA4075.

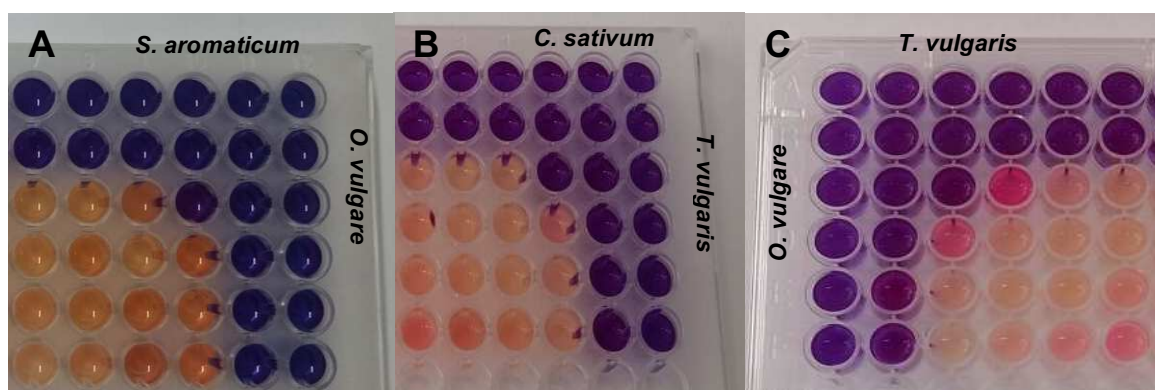


Figura 5A: Interação entre os óleos, (A) *S. aromaticum* e *O. vulgare*, (B) *C. sativum* e *T. vulgaris*, (C) *T. vulgare* e *O. vulgare*, frente ao isolado SA4125.

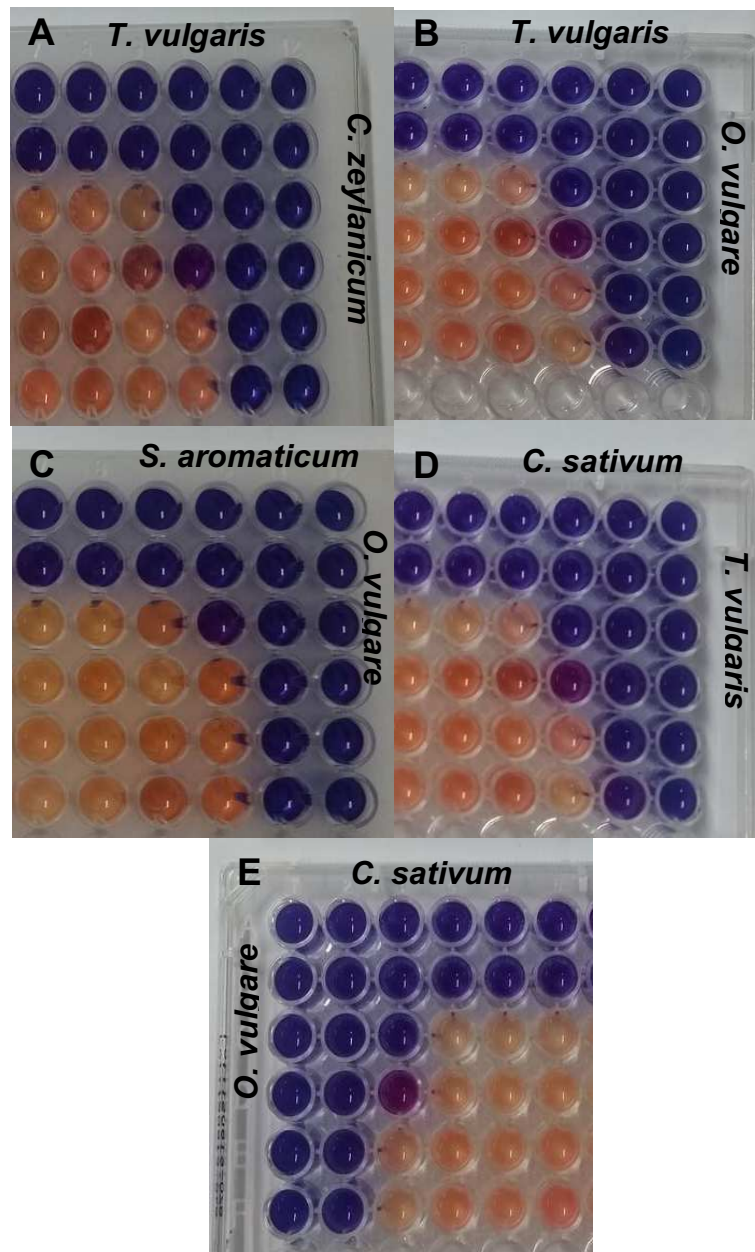


Figura 7A: Interação entre os óleos, (A) *T. vulgaris* e *C. zeylanicum*, (B) *T. vulgaris* e *O. vulgare*, (C) *S. aromaticum* e *O. vulgare*, (D) *C. sativum* e *T. vulgaris*, e (E) *C. sativum* e *O. vulgare*, sobre o isolado SA4158.

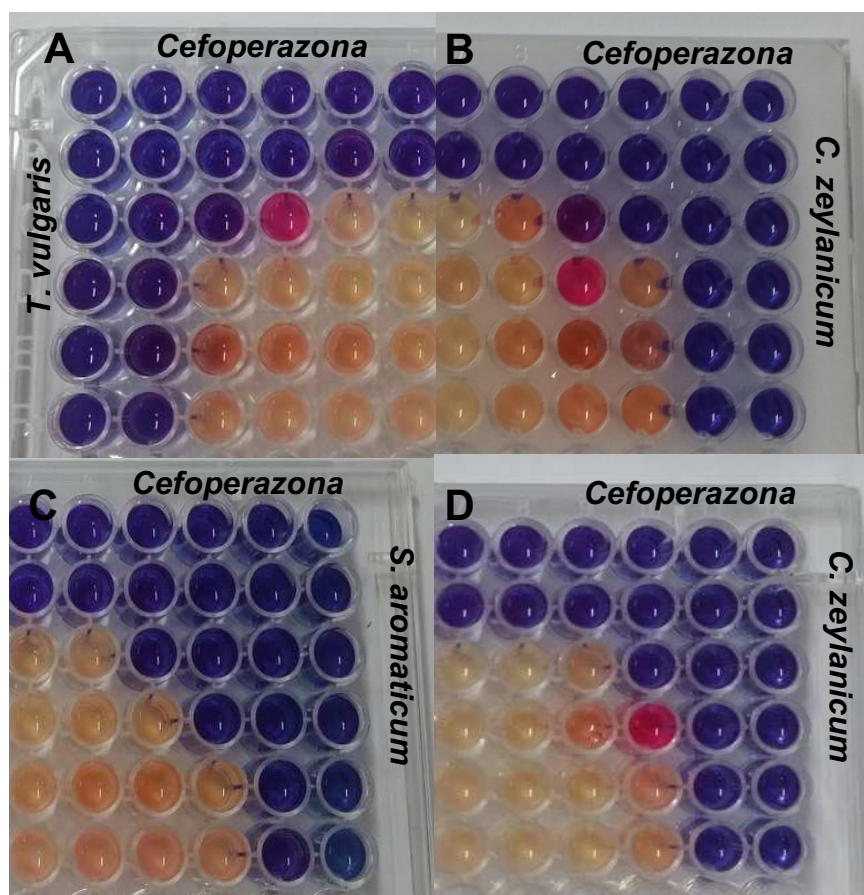


Figura 8A: Interação entre os óleos essenciais e o antibiótico cefoperazona, (A) *T. vulgaris* isolado SA4125, (B) *C. zeylanicum* isolado SA4125, (C) *S. aromaticum* isolado SA4125 e (D) *C. zeylanicum* isolado SA4158.

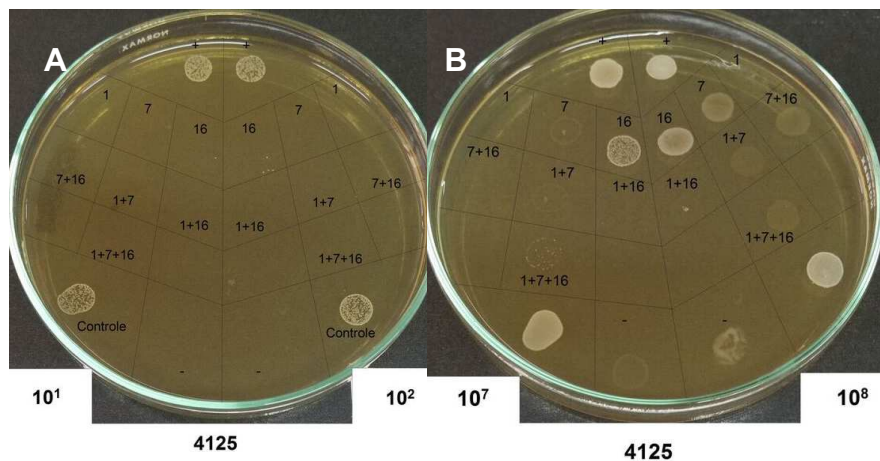


Figura 9A: Avaliação antimicrobiana das formulações pós-dipping por teste de diluição em leite, (1) *C. zeylanicum*, (7) *C. sativum*, (16) *O. vulgare*, (+) bactéria e leite, (-) bactéria, leite e cefoperazona 1%, (controle) formulação sem óleos essenciais e bactéria. (A) diluições 10^2 e 10^1 , (B) diluições 10^8 e 10^7 . Estirpe SA4125.



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2017 020222 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25944455000196

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: Campus UFV, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, sala 04.

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP: 36570-900

País: Brasil

Telefone: (31) 3859 1421

Fax: (31) 3859 2148

Email: propriedadeintelectual@ufv.br

11

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Formulações Farmacêuticas à Base de Óleos Essenciais para Uso como Pós-Dipping

Resumo: A presente invenção refere-se a formulações pós-dipping à base de óleos essenciais, que são ativas contra *Staphylococcus aureus* e outros microrganismos. Essas formulações poderão ser usadas pela indústria farmacêutica na produção de domoicinas do tipo pós-dipping para prevenção e controle de animais com mastite bovina.

Figura a publicar: 1

11