

Natália Arantes Marcelo

**Eficácia de antisséptico para tetos bovinos elaborado com óleo
essencial de alecrim-pimenta no controle de novas infecções
intramamárias**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientadora: Prof^ª. Anna Christina de Almeida

Coorientadores:

Prof. Igor Viana Brandi

Prof. Sérgio Henrique Souza Santos

**MONTES CLAROS
2016**

Natália Arantes Marcelo

Eficácia de antisséptico para tetos bovinos elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta no controle de novas infecções intramamárias

Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Profª. Drª. Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier
(Universidade Estadual de Montes Claros- UNIMONTES)

Drª. Vanessa Amaro Vieira
(Doutora pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal)

Prof. Dr. Mário Henrique França Mourthé
(Universidade Federal de Minas Gerais – ICA/UFMG)

Profª. Drª. Anna Christina de Almeida
Orientadora (ICA/UFMG)

Montes Claros, 06 de julho de 2016.

Marcelo, Natália Arantes.

M314e
2016 Eficácia de antisséptico para tetos bovinos elaborado com óleo essencial de alecrim pimenta no controle de novas infecções intramamárias / Natália Arantes Marcelo. Montes Claros, MG: Instituto de Ciências Agrárias/UFMG, 2016.
79 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

Orientadora: Prof.^a Anna Christina de Almeida.

Banca examinadora: Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier, Mário Henrique França Mourthé, Vanessa Amaro Vieira, Anna Christina de Almeida.

Referências: f: 23-30.

1. Microbiologia – Bactérias. 2. Vacas leiteiras. 3. Produto experimental. I. Almeida, Anna Christina de. II. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. III. Título.

CDU: 579

AGRADECIMENTOS

A realização e execução desse trabalho só foi possível devido a ajuda de várias pessoas, e a todos eles meu muito obrigada!:

Meu primeiro agradecimento é a Deus, que sempre esteve comigo, me amparando e não me deixando cair.

Agradeço ao meu grande e amado avô Edmundo (*in memorian*), pelo grande homem que foi, e que mesmo que seu corpo físico não esteja mais entre nós a sua alma e seu coração sempre me acompanham no meu caminhar. Te amo meu paizão.

A minha tia Rejane (*in memorian*), que foi minha mãe, tia e madrinha, que me ensinou o caminho da verdade, perseverança e honestidade. Que sempre estará ao meu lado não importantando onde esteja, pois sei que dai de cima está aqui comigo sempre, protegendo e guiando meus passos e pensamentos. Meu amor por ti não há medida, é INFINITO...

A pessoa mais importante na minha vida, que sem ela, não sou, minha pequena e linda avó Nilza, uma mulher forte e guerreira, que sempre esteve ao meu lado, me incentivando e ensinando, agradeço por tudo.

A tia Rosana, que desde quando iniciei minha graduação esteve ao meu lado me dando todo suporte necessário pra realização da graduação e mestrado, sem ela eu não estaria aqui escrevendo essas palavras. Amo-te muito, e me espera que estou chegando, rs!

Agradeço minha tia Rosália que nos últimos tempos de turbulência foi uma mãezona pra mim, que mesmo com as dificuldades que enfrentamos não perdemos o dom de sorrir e falar besteiras.

A minha mãe e irmã, agradeço o carinho e amor recebido. Amo vocês.

Tio Ovídeo (*in memorian*), você também foi uma das pessoas que me fizeram chegar onde estou, me auxiliando nessa jornada. Não tenho palavras para agradecer o seu carinho por nossa família.

Agradeço imensamente a oportunidade de ter feito parte da Universidade Federal de Minas Gerais no Instituto de Ciências Agrárias, pois para mim foi um sonho realizado.

Agradeço imensamente a minha orientadora e grande mestra, Profa. Anna Christina, por todo conhecimento, paciência e apoio dedicados à minha formação profissional e pessoal. Saiba que me espelho na profissional que é.

Entrou na nossa vida há pouco tempo, mas se tornou uma pessoa muito especial... Que ajuda, puxa orelha, escuta nossas conversas e dá conselhos. Cintya, não poderia deixar de agradecer por todo apoio que me deu durante as análises no laboratório de Sanidade Animal, sem sua crucial ajuda nada disso seria possível. Sou imensamente grata!

As minhas meninas, rs. Gabriela, Mariana e Livia Prates, que tanto me ajudaram nas análises, lavando placas, preparando material e até mesmo coletando amostras nas madrugadas. Agradeço muito mesmo, não tenho palavras pra descrever a gratidão.

Aos meninos do SANILEITE, por toda ajuda durante o experimento.

Ao meu amigo/irmão Rody, não somente pelos anos de amizade, mas agradeço por fazer parte da minha vida e jornada nesse sertão. Só tenho a agradecer a Deus por ele ter te colocado em minha vida. Profissional de sucesso, e amigo de verdade.

As meninas do mestrado: Vanessa (Irmã), Ludmilla e Laydiane (Lora)... Vocês fizeram dessa etapa um pouco mais doce e divertida !!! Sentirei saudades...

Agradeço aos professores Alessandra, Mauro, Kiko e doutora Vanessa Amaro por aceitarem participar da banca, gratidão!

A jornada ainda não acabou ainda há trilhas para percorrer !!!

EPÍGRAFE

"Mar calmo não faz bom marinheiro"

Autor desconhecido

**"É loucura odiar todas as rosas porque uma te espetou.
Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas."**

Antoine de Saint-Exupéry

Pequeno Príncipe

RESUMO

Objetivou-se avaliar efeito de um produto elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) para higienização de tetos sobre microbiota patogênica e multirresistente às drogas provenientes de glândula mamária de bovinos. Bactérias do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* spp. são os micro-organismos mais encontrados em animais com mastite clínica. O uso de antimicrobianos no controle da mastite é preocupante na saúde pública pela seleção de bactérias resistentes, com isso, estudos com plantas medicinais surgem como alternativa ao uso de produtos convencionais. Foram utilizadas amostras de leite e swabs de tetos submetidos a higienização pré e pós ordenha com tratamento de um produto experimental (PEX) à base de óleo essencial do alecrim-pimenta e tratamento com produto convencional (CONV) à base de iodo e clorexidine. Nas amostras de leite analisadas foram identificados 10,42% de *Streptococcus* spp. e 26,56% de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN), não sendo identificado *Staphylococcus aureus*. Não foi observada diferença significativa entre a frequência isolados de SCN e *Streptococcus* spp ($p < 0,05$) nos dois tratamentos. A eficácia do produto experimental (PEX) foi confirmada com taxa de novas infecções intramamárias (NIIM) no valor de 0,41 para SCN e para *Streptococcus* sp. igual a 0, sendo resultados estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) aos obtidos com produto convencional (CONV) e em índices de NIIM dentro do recomendado que é de 0,5. Foi observado alta resistência microbiana a oxacilina, penicilina, eritromicina e tetraciclina, sendo confirmado com a avaliação do índice de multirresistência aos antibióticos (MAR) de 90,9% em *S. aureus* isolados de tetos, 35,61% em SCN isolados dos tetos, 93,9% SCN isolados e leite e 15,78% em *Streptococcus* spp. isolados do leite. Observou-se diferença entre a resistência aos antimicrobianos e ao PEX e entre PEX e oxacilina nos testes de difusão em ágar. As cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo de isolados do leite e tetos eram diferentes e não foi observado identificação de *Staphylococcus aureus* no leite, indicando a eficácia do produto em evitar a colonização do interior da glândula mamária pela microbiota da pele dos tetos. A microbiota isolada da pele dos tetos e do leite foi multirresistente a antimicrobianos convencionais e sensível ao produto experimental elaborado com óleo de alecrim-pimenta indicando ser estes promissor na profilaxia e tratamento de mastite bovina.

PALAVRAS CHAVE: Antisséptico. Fitoterapia. *Lippia origanoides*. Qualidade do leite. Vacas leiteiras.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate a product made with essential oil effect alecrim- pepper (*Lippia origanoides*) for cleaning ceilings on pathogenic and multiresistant microorganisms to drugs from the mammary gland of cattle. Bacterial genera group of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. are microorganisms found in most animals with clinical mastitis. The use of antimicrobials in the control of mastitis is of concern in public health for the selection of resistant bacteria, therefore, studies medicinal plants are an alternative to the use of conventional products. Milk samples were used and swabs of teats subjected to pre and post milking sanitization treatment with an experimental product (PEX) the essential oil of rosemary peppermint base and treating with the conventional product (CONV) based on iodine and chlorhexidine. In the milk samples analyzed were identified 10.42% of *Streptococcus* spp. and 26.56% of coagulase-negative *Staphylococcus* (SCN), not being identified *Staphylococcus aureus*. There was no significant difference between the isolated frequency SCN and *Streptococcus* spp. ($p < 0.05$) in both treatments. The efficacy of the investigational product (PEX) was confirmed with rate of new intramammary infections (NIIM) in the amount of 0.41 to SCN and *Streptococcus* sp. equal to 0, statistically similar results ($p > 0.05$) obtained with the conventional product (CONV) and NIIM index which is within the recommended 0.5. It was observed high microbial resistance to oxacillin, penicillin and tetracycline eritormicina, being confirmed with the assessment of multidrug resistance rate to antibiotics (SEA) of 90.9% in *S. aureus* isolated from ceilings, 35.61% in SCN insulated ceilings, SCN isolated and 93.9% milk, and 15.78% by *Streptococcus* spp. isolated from milk. There was difference between antimicrobial resistance and PEX and between PEX and oxacillin in the agar diffusion test. The strains of coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from milk and ceilings were different and was not observed identification of *Staphylococcus aureus* in milk, indicating the product's efficacy in preventing colonization of the interior of the mammary gland by the microflora of the skin of the teats. Isolated skin microbiota teats and milk was multiresistant to conventional antimicrobials and sensitive experimental product made with rosemary peppermint oil indicating that these promising in prophylaxis and treatment of bovine mastitis.

INDEX-TERMS: Antiseptic. Phytotherapy. *Lippia origanoides*. Milk quality. Dairy cows.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

FIGURA 1 – Frequência de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (A) e <i>Streptococcus</i> ssp.(B) isolados de leite de vacas submetidas a dois tratamentos de higienização dos tetos em um período de seis semanas consecutivas	41
FIGURA 2- Média de número de tetos com NIIM <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (A) e <i>Streptococcus</i> ssp.(B) isolados em amostras de leite provenientes de tetos higienizados com produto convencional e com produto elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta	41
FIGURA 3 - Número de tetos com novas infecções intramamárias por <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (A) e com <i>Streptococcus</i> sp (B) observadas em tetos tratados com produto convencional e produto elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta.....	44

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

TABELA 2 - Perfil (%) de resistência antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus coagulase</i> e <i>Streptococcus</i> spp. isolados de tetos e ou de leite bovino à antibióticos convencionais e à produto experimental à base de óleo essencial de alecrim-pimenta (<i>Lippia organoides</i>)	59
TABELA 3 – Índice de multirresistência aos antibióticos (MAR) frente aos isolados de <i>S.aureus</i> dos tetos, <i>Staphylococcus coagulase</i> negativo (SCN) dos tetos e leite e de <i>Streptococcus</i> spp. do leite no tratamento com produto convencional e com produto experimental à base de óleo essencial de alecrim-pimenta (<i>Lippia organoides</i>)	68
TABELA 4- Médias de halo de inibição de crescimento microbiano por ação de produto experimental elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta em teste de difusão em ágar..	69
TABELA 5 - Associação entre isolados microbianos de leite e tetos bovinos MAR e resistente a um produto experimental e Resistente ao produto experimental e à oxacilina	70

ANEXO

TABELA 1 – Frequência (%) de amostras que apresentaram resistência, sensibilidade e sensibilidade intermediária de isolados de <i>S.aureus</i> e SCN dos tetos, <i>Streptococcus</i> spp. e SCN do leite de vacas	83
---	----

LISTA DE FÓRMULAS

ARTIGO 1

Equação 1: Fórmula para determinação da Eficácia de Produto Experimental	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEUA	Comissão de Ética de Uso Animal
CCS	Contagem de Células Somáticas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMT	<i>Califórnia Mastist Test</i>
CT	Caneca Telada
CVN	Produto convencional à base de clorexidina e iodo
DEL	Dias em Lactação
EIT	Escore de Integridade do Teto
EST	Escore de Sujidade do Teto
hVISA	Heteroresistência de <i>Staphylococcus aureus</i> à Vancomicina
IIM	Infecções Intramamárias
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
MRCoNS	<i>Staphylococcus coagulase negativo metilina resistentes</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina
NIIM	Novas Infecções Intramamárias
PBP	Proteínas de ligação à penicilina
PEX	Produto experimental à base de óleo essencial de alecrim-pimenta
PROB	Probabilidade
SCN	Estafilococcus coagulase negativa
TSA	<i>Tryptona Soy Agar</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VISA	Resistência Intermediária de <i>Staphylococcus aureus</i> à Vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Vancomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Mastite na produção leiteira	17
3.2 Antissépticos e desinfetantes comerciais utilizados em tetos de vacas leiteiras	18
3.3 <i>Lippia origanoides</i> (alecrim-pimenta)	18
3.4 Antissépticos e desinfetantes a base de óleo essencial utilizados em tetos de vacas leiteiras.....	19
3.5 Multirresistência bacteriana a antibióticos comerciais	20
3.6 Micro-organismos avaliados	22
3.6.1 <i>Staphylococcus</i> spp.	22
3.6.2 <i>Streptococcus</i> spp.	22
REFERÊNCIAS	23
4 ARTIGO(S)	31
4.1 Artigo 1 -. Uso de produto a base de alecrim-pimenta (<i>Lippia origanoides</i>) na redução das infecções intramamárias em vacas de leite.....	31
4.2 Artigo 2 -. Perfil de sensibilidade de isolados bacterianos da pele de tetos e de leite bovino a um produto experimental elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta (<i>Lippia origanoides</i>)	52
ANEXOS	
ANEXO 1 - DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO CEUA (Comissão de Ética de Uso Animal)	82
ANEXO 2 - TABELA 1 – Frequência (%) de amostras que apresentaram resistência, sensibilidade e sensibilidade intermediária de isolados de <i>S.aureus</i> e SCN dos tetos, <i>Streptococcus</i> spp. e SCN do leite de vacas.....	83

1 INTRODUÇÃO

O uso de antibióticos é uma das principais ferramentas para eliminação de infecções intramamárias e representa estratégia essencial para controle desta enfermidade, mas a utilização de forma inadequada e indiscriminada seleciona cepas multirresistentes, o que dificulta o controle sanitário no rebanho com mastite bovina (MOTA *et al.*, 2012).

Staphylococcus aureus é o micro-organismo de maior importância, considerado que poderão estar presentes nos animais, ambiente de ordenha e humanos, bem como na produção de clones multirresistentes que circulam entre hospedeiros e/ou reservatórios e que acarreta em problemas na saúde pública (SANTIAGO-NETO *et al.*, 2014).

Considerados patógenos secundários, *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) possuem papel importante na mastite, embora com menor virulência, tem sido problemático na diminuição da produção de leite (TENHAGEN *et al.*, 2006), bem como na produção de toxinas e forte resistência aos antimicrobianos (GUIMARÃES *et al.* 2013; SILVA *et al.*, 2014).

A multirresistência às drogas tem sido o maior desafio da atualidade no tratamento de mastite bovina. Pesquisas que visam elucidar a presença de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA) no Brasil, e uma possível associação de cepas multirresistentes com menor sensibilidade aos óleos essenciais são importantes no que diz respeito à epidemiologia, bem como suporte científico na elaboração de novos produtos no tratamento de mastite bovina e elaboração de programas de controle da enfermidade (SANTIAGO-NETO *et al.*, 2014; SCHWARZ *et al.*, 2010).

O uso de extratos vegetais na sanitização de equipamentos e instalações, tratamento e controle de enfermidades dos animais de produção têm sido autorizados por meio da Instrução Normativa Nº64 de 18 de setembro de 2008 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA (BRASIL, 2008).

Plantas medicinais apresentam características farmacológicas devido à capacidade dos endófitos produzirem metabólitos secundários biologicamente ativos com capacidade bactericida (SIQUEIRA *et al.*, 2011), com isso, a terapia alternativa vem se estabelecendo na produção animal como método de utilização dessas substâncias nos animais de produção para reduzir antibióticos nesses produtos (CASTRO, 1999; FAGUNDES, 2003).

Pesquisas relatam diferentes perfis de sensibilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* ao óleo essencial de alecrim-pimenta, composto bio-ativo que está em estudo como produto alternativo (ALMEIDA *et al.*, 2010a; ANDRADE *et al.*, 2014). A identificação genotípica de cepas multirresistentes e possível associação ao perfil de sensibilidade ao óleo essencial permitirão avanços no conhecimento de mecanismos de sensibilidade ao óleo, bem como a presença de cepas MRSA em rebanhos da região.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar efeito de um produto elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta para higienização de tetos sobre microbiota patogênica e multirresistente às drogas provenientes de glândula mamária de bovinos.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a presença de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo e *Streptococcus* spp. em leite de vacas tratadas com antisséptico à base de óleo de alecrim-pimenta para higienização de tetos pré e pós ordenha.
- Analisar índices de eficiência do antisséptico à base de óleo de alecrim-pimenta para higienização de tetos pré e pós ordenha na prevenção de novas infecções intramamárias.
- Identificar *Staphylococcus aureus* dos tetos, *Staphylococcus* coagulase negativo dos tetos e leite e *Streptococcus* spp. do leite multirresistentes a metilina e o perfil de sensibilidade destas cepas a antimicrobiano experimental à base de óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) e convencional à base de clorexidine e iodo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mastite na produção leiteira

Palavra derivada do grego *mastos*, ou mamite, do latim *mammae* (DIAS, 2007). Doença mais estudada e de maior importância econômica na produção leiteira, em que o processo inflamatório da glândula mamária se dá pela inflamação do tecido glandular por traumas físicos, agentes químicos e biológicos, que o modifica patologicamente podendo causar lesões irreversíveis (SOUTO, 2006).

A infecção do úbere é causada pela proliferação de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, alterando a composição do leite, contagem de células somáticas (CCS), qualidade microbiológica, físico e química do leite (DUFOUR *et al.*, 2011). De Vlieghe *et al.* (2012), observaram em seus estudos que a mastite é causada por vários patógenos, sendo as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. as mais frequentes em isolados de leite com casos confirmados da doença.

O diagnóstico de infecções intramamárias (IIM) tem sido debatido por vários anos, e os fatores considerados são os micro-organismos encontrados nas culturas de isolados, número de colônias isoladas puras ou mistas e ocorrência de inflamação no úbere, que na maioria das vezes é contabilizado pela CCS (DOHOO *et al.*, 2011).

A mastite pode ser classificada em duas formas de acordo com a severidade e exteriorização do processo inflamatório (LANGONI, 1999). A forma clínica é caracterizada por alterar visivelmente a glândula mamária ou o leite com presença de sinais da inflamação com dor, febre, calor, perda/redução da função secretora, bem como alteração no aspecto do leite com formação de grumos, pus ou coágulos (LANGONI, 1999; NADER *et al.*, 2007). Na subclínica pode ser observado a redução da produção de leite, aumento de CCS, e só é possível diagnosticar utilizando métodos que permitam a detecção de alterações na composição e constituição do leite. Um desses métodos utilizados é o *California Mastitis Test* (CMT) (HARMON, 1994), produto usado mundialmente no diagnóstico da mastite subclínica, e pode ser empregado no próprio rebanho, no momento em que os animais são ordenhados. Sua interpretação é baseada na observação visual do leite após ser misturado ao reagente ou solução de detergente CMT (SCHALM, NOORLANDER, 1957).

Por ser a doença de maior prevalência nos rebanhos é a que resulta em maior perda econômica devido à redução da produção e gastos com tratamentos intramamários, o que acarreta no descarte do leite, sendo assim, para obter um produto com qualidade são necessários cuidados sanitários com os animais e ambiente de ordenha (KHAN; KHAN, 2006).

O sucesso da atividade leiteira será efetivo se na propriedade houver o controle da mastite, e a eficácia dependerá da forma com que será realizado. O pré e pós *dipping* são importantes ferramentas na redução da contaminação do leite, e essa antisepsia dos tetos com testes de monitoramento são de fundamental importância (MIGUEL *et al.*, 2012).

3.2 Antissépticos e desinfetantes comerciais utilizados em tetos de vacas leiteiras

A utilização de agentes desinfetantes tem como objetivo reduzir a população microbiana e evitar potencial disseminação dos agentes infecciosos, e como não existe um produto ideal, deve-se considerar na escolha um que seja apropriado e observar o espectro de ação, não ser tóxico e irritante a pele do animal e ter custo acessível (PEDRINI; MARGATHO, 2003).

Os principais compostos utilizados na antissepsia de tetos são iodo e cloro, e agem de forma a reduzir a carga microbiana precursora da mastite (AZIZOGLU *et al.*, 2013). Hipoclorito de sódio a 2%, iodo a 0,03% e clorexidina a 0,3% são os componentes mais utilizados no pré-*dipping*, já no pós-*dipping* são iodo a 0,7-1,0%, clorexidina a 0,5-1,0% e cloro a 0,3-0,5% (SANTOS; FONSECA, 2006).

O iodo quando em maior concentração (1% - 2%) apresentam melhor desempenho nos testes *in vitro* frente a micro-organismos, mas em altas concentrações pode deixar resíduos no leite (PEDRINI; MARGATHO, 2003). Estudos realizados por Quirk *et al.* (2013) demonstraram que mesmo na concentração maior, de 1%, o iodo diminuiu significativamente IIM por SCN dos tetos testados, mas para evitar problemas com uso exacerbado, recomenda-se a utilização na concentração de 0,5% (PEDRINI; MARGATHO, 2003).

Medeiros *et al.* (2009) em estudos com *Staphylococcus aureus* quanto à sensibilidade, demonstraram eficiência de 97,8% com iodo na concentração de 0,57%, 2,20% na concentração de 2,5% e 89,9% com clorexidina na concentração de 2% com tempo de ação de 30 segundos no teto do animal, sendo constatado que o iodo e clorexidina foram os compostos com maior atividade desinfetante frente a esse micro-organismo.

O alto poder de penetração do iodo nas células dos micro-organismos pela parede celular, leva à ruptura de proteínas ao ser utilizado nas concentrações de 30 a 50 ppm por tempo não superior a 10 minutos, mas é ineficiente quando se leva em consideração a elevação do pH com possibilidade de alteração do sabor ou odor dos alimentos (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

O cloro usado como desinfetante de tetos no pré e pós *dipping* da ordenha tem alto poder germicida e amplo espectro de ação. O modo de ação é na desnaturação das proteínas da membrana celular microbiana, com isso acarreta na interferência do transporte de nutrientes promovendo perda de componentes celulares. Já o cloreto de sódio (NaCl) corresponde ao sanitizante químico de maior utilização em função da ação rápida, de aplicação fácil e dissociação completa em água (ANTONIOLLI *et al.*, 2005).

3.3 *Lippia origanoides* (alecrim-pimenta)

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) é muito utilizado pela medicina popular, sendo o extrato e óleo essenciais cientificamente testados quanto à atividade antimicrobiana (GOMES *et al.*, 2011).

Lippia origanoides, popularmente conhecida como alecrim-pimenta tem como principais características odor forte e picante, sendo extraído o óleo essencial que possui como

compostos majoritários o timol (22,4%) e carvacrol (37,3%) que atribui forte atividade antimicrobiana e antisséptica (BARRETO *et al.*, 2014ab). O óleo essencial possui elevado valor comercial e apresenta propriedades antisséptica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e larvicida (ALMEIDA *et al.*, 2010), amplamente testados devido ao potencial dos princípios bioativos (GOMES *et al.*, 2011),

Em testes de atividade antimicrobiana com óleo de alecrim-pimenta, Andrade *et al.* (2014) constataram que a dose de 120 µL/mL foi suficiente para inibir o crescimento das amostras de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708). Nesse mesmo estudo foram avaliados os efeitos tóxicos agudos e crônicos em concentrações de 30, 60 e 120 mg/kg de óleo essencial em ratos, e o resultado foi que não houve alterações significativas no peso, comportamento, parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais, não ocorrendo também alterações histopatológicas no fígado, rins e coração sugerindo que o óleo de alecrim-pimenta é atóxico após administração oral em condições agudas ou crônicas.

Para *Streptococcus mutans* foi verificado que *Lippia origanoides* inibiu crescimento com média de halos de 26 mm com 10 µL do óleo essencial impregnados nos discos de papel filtro, e mostra-se promissor quanto ao uso para condimento e antisséptico na medicina popular (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Trabalhos avaliando *S.aureus* isolados de leite demonstram efeito positivo frente a esse micro-organismo mostrando sensibilidade a diferentes concentrações do óleo do alecrim-pimenta. Queiroz *et al.* (2014) observaram que na concentração de 60 µL/mL o halo de inibição formado foi de 10mm, já Costa *et al.* (2011) o halo formado foi de 8,2mm na concentração de 320 µL/mL.

Oliveira *et al.* (2007) observaram média de 18-25mm dos halos de cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA. Em estudos com alecrim-pimenta frente a MRSA, pode-se inferir que a planta atua como fonte moduladora capaz de modificar a resistência fenotípica das bactérias com aumento da permeabilidade celular (BARRETO *et al.*, 2014a; BARRETO *et al.*, 2014b ; SILVA *et al.*, 2015).

3.4 Antissépticos e desinfetantes a base de óleo essencial utilizados em tetos de vacas leiteiras

Plantas aromáticas e seus óleos essenciais são consumidos desde o início da história da humanidade. Utilizados na alimentação para conservação e acrescentar sabor, disfarçar odores e atrair outras pessoas pelo cheiro agradável, mas também como controle de problemas sanitários, influenciando no bem-estar humano e animal (FRANZ, 2010).

Óleo essencial é o produto derivado das plantas, considerado antimicrobiano natural, podendo ser incolor ou ligeiramente amarelado (SINGH *et al.*, 2007). São complexos, voláteis, de odor forte, produzidos a partir de metabólitos secundários e obtidos por arraste de vapor ou hidro-destilação (BAKKALI *et al.*, 2008).

A síntese do óleo pela planta pode ocorrer em todos os órgãos, tais como broto, flor, folha, caule, galho, sementes, frutos e raiz e são armazenadas nas suas células. Os componentes desses óleos podem estar presentes em diversas concentrações na mesma planta, assim considerado uma mistura complexa (BAKALLI *et al.*, 2008) que cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, em que um dos compostos farmacologicamente ativo é majoritário. No alecrim-pimenta, destaca-se o carvacrol (38,6%) e o timol (18,5%) (OLIVEIRA, *et al.* 2007).

Schuch *et al.*, (2008), em seus estudos com extratos de *Eucalyptus ssp*, *Baccharis trimera* e *Tagetes minuta*, avaliando o efeito antibacteriano em micro-organismos envolvidos em mastite bovina, constatou a ação dos extratos sobre o *Streptococcus agalactiae* foi rápida, havendo inativação total aos 30 segundos, e em *S. aureus* aos 10 minutos não apresentava mais células viáveis.

Desinfetantes de tetos pós ordenha à base de plantas medicinais foi objeto de estudo por Schiavon *et al.*, (2011) em que avaliaram a frequência de novas infecções intramamárias (NIIM) com extrato alcoólico de folhas de chinchilo (*Tagetes minuta* L) e macerado de sementes de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) na concentração de 10% demonstrou eficácia frente aos micro-organismos, já que não foi observada diferença estatística entre os tratamentos com o produto convencional a base de iodo

O Sistema Único de Saúde (SUS) juntamente com o Ministério da Saúde difundem o saber popular aliado ao técnico sobre plantas medicinais desenvolvendo pesquisas na utilização correta para cura e tratamento de doenças em humanos (BRASIL, 2006), que vem sendo também adotado para animais.

3.5 Multirresistência bacteriana a antibióticos comerciais

No controle e tratamento de animais leiteiros afetados pela mastite, a terapia antimicrobiana é muito utilizada, e fornece informações com monitoramento e análise dos agentes etiológicos isolados para a melhor escolha do tratamento a ser realizado (ROCHA; MENDONÇA; RIBEIRO, 2014).

Os fatores de prevalência da multirresistência por isolados de *Staphylococcus aureus* podem ser explicados devido aos antibióticos comercializados não surtirem efeito nas bactérias, o que acarreta na dificuldade em tratar animais infectados (OLIVEIRA; MELO; AZEVEDO, 2009), sendo a aplicação de testes de sensibilidade a melhor forma de direcionar a escolha do tratamento (MORONI *et al.*, 2006).

A resistência de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. para mais de dois antibióticos foi observada por diversos autores na literatura (PRIBUL *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2012)

Santos *et al.* (2011) isolando SCN do leite, observaram que 28% das amostras foram resistentes a penicilina e 14 % por tetraciclina, o mesmo encontrado por Nader Filho *et al.* (2007) em que as bactérias apresentaram maior resistência a penicilina.

Staphylococcus aureus resistentes a metilina são conhecidos como MRSA, em que as cepas causadoras da mastite são multirresistentes a todos os antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos. Sua origem de resistência se dá por um gene denominado "mecA" que codifica uma proteína de ligação a penicilina (PBP₂ ou PBP), com genética heterogênea e mecanismos identificados diferenciados (HOLMES; ZADOKS, 2011; SPOHR *et al.*, 2011).

A oxacilina é um dos antibióticos que mantêm sua atividade durante o armazenamento, sendo muito utilizado para o diagnóstico laboratorial de resistência a metilina. Portanto, qualquer bactéria do gênero *Staphylococcus* sp. que sejam resistentes a essa droga devem ser consideradas resistentes a todos antimicrobianos beta-lactâmicos (FEBLER *et al.*, 2010),

Infecções por *S.aureus* em animais com mastite são tratadas principalmente por antibióticos que estão inseridos nos grupos dos aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, entre outros (BARLOW, 2011; KUMAR, YADAV; SINGH, 2011).

Infecções por *S.aureus* são tratados principalmente por macrolídeos, lincosamidas, beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclina (BARLOW, 2011).

Vários isolados de MRSA apresentaram resistência a muitos antimicrobianos tais como penicilina G, gentamicina, estreptomicina, ampicilina, ciprofloxacina e oxatetraciclina, em que são utilizados com frequência em tratamentos de animais com mastite (KUMAR; YADAV; SINGH, 2011).

Tratamentos em animais portadores de bactérias multirresistentes tem maior dificuldade com utilização de medicamentos com amplo espectro, sendo observado por Waller *et al.* (2011) nos isolados de casos de mastite clínica e subclínica em que 12% das cepas foram resistentes a mais de quatro antimicrobianos testados, mesmo com combinações de antibióticos (NAM *et al.*, 2010).

Diversos autores consideram o SCN como agente etiológico em diversos processos infecciosos em humanos e animais. São micro-organismos oportunistas, podem gerar graves infecções ao hospedeiro, sendo que os fatores de multirresistência a antibióticos tem sido muito estudados pela dificuldade no controle e profilaxia (CUNHA *et al.*, 2002; RIGGATI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2006; ZURITA; MEJIA; GUZMN-BLANCO, 2010).

Cultura microbiológica e testes de susceptibilidade são recomendados, tanto na redução do impacto da disseminação da resistência antimicrobiana quanto pela frequência de mutação de genes e seleção bacteriana, isso para que o proprietário faça a escolha adequada do agente antimicrobiano a ser administrado no animal (SCHWARZ *et al.*, 2010).

O teste de difusão em ágar oferece resultados padronizados se uma bactéria é resistente ou susceptível a determinados antimicrobianos auxiliando o seu uso no combate a mastite (SCHWARZ *et al.*, 2010).

Compostos antibacterianos utilizados no combate a mastite tem sido de grande preocupação na saúde pública e segurança alimentar. O uso inadequado apontando como fator seletivo para *Staphylococcus aureus* em glândulas mamárias de vacas e a frequência de utilização desses produtos tem impulsionado novas pesquisas com métodos terapêuticos no controle efetivo da doença, e se faz necessário (AAMER; ABDUL-HAFEEZ; SAYED, 2014).

3.6 Micro-organismos em estudo

3.6.1 *Staphylococcus* spp.

Os *Staphylococcus* sp. são os micro-organismos mais isolados em mastites (BRITO *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2006), pertencentes à família *Micrococcaceae* (TRAVERSO *et al.*, 2003).

Crescem em meio comum, com caldo ou ágar simples, pH 7,0 a 37°C, sendo que as colônias formadas em placas após 18-24 horas de incubação, apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes. A coloração dessas colônias podem variar dependendo do meio utilizado, chegando a acinzentado até o amarelo-ouro, em que a pigmentação aumenta com o tempo de incubação prolongado. No meio ágar sangue acrescido de 5% de sangue ovino pode ser observado halo de hemólise em torno das colônias formadas (KONEMAN *et al.*, 2001).

S.aureus é a bactéria mais prevalente nas infecções de vacas leiteiras (BRITO *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 2005; WAAGE *et al.*, 1999; WATTS, 1988), com alta patogenicidade. São Gram-positivas com formato de cocos, apresenta-se isolada aos pares, cadeias curtas ou agrupados irregularmente, em formato de cacho de uva. Possui três tipos de exotoxina que determinam sua patogenicidade: a hemolisina, a enterotoxina e a leucocidina com capacidade de causar infecções de longa duração que tendem a se tornar crônicas, com baixa taxa de cura e grande perda na produção de leite (BENEDETTE *et al.*, 2008). Alguns autores citam que *S. aureus* é a bactéria mais isolada em casos de mastite clínica e subclínica (BANDEIRA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010).

SCN apresenta grupo heterogêneo associado a infecções da glândula mamária de bovinos, e são encontradas no ambiente, equipamentos de ordenha e pele dos tetos (SANTOS *et al.*, 2010). Quando originados do canal dos tetos, estes podem colonizar a glândula mamária causando infecções, sendo explicada a proliferação principalmente pelo leite residual que oferece aos micro-organismos substratos para seu desenvolvimento causando graves problemas a saúde do animal (QUIRK *et al.*, 2013).

Estudos realizados quanto à frequência de SCN em animais infectados demonstram ampla disseminação nos rebanhos (LOPES *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011; SOUTO *et al.*, 2010).

Piessens *et al.* (2011) em seus estudos indicam que há uma relação de dependência entre SCN encontradas no ambiente de ordenha e no animal, dificultando o controle e prevenção de infecções intramamárias devido à diversidade desses micro-organismos no ambiente, o que causa efeitos maléficos no processo da doença. Portanto, a desinfecção dos tetos de forma adequada se torna necessário e vital para a sanidade dos tetos.

3.6.2 *Streptococcus* spp.

Pertencentes à família *Streptococaceae* do gênero *Streptococcus*. São cocos gram-positivos e geralmente dispostos aos pares ou em cadeias. São anaeróbios facultativos ou estritos e catalase negativos (KONEMAN *et al.*, 2001).

As espécies causadoras da mastite são identificadas como: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*, sendo o *Streptococcus agalactiae* o mais prevalente (ALMEIDA; OLIVER, 1995).

Podem ser isolados de superfícies contaminadas, sendo a mão do ordenhador uma delas. A infecção se manifesta de forma subclínica, de modo que há fixação dessas bactérias no interior da glândula mamária, o que leva ao quadro de inflamação e endurecimento da glândula (SANTOS; FONSECA, 2000).

O controle e diagnóstico será efetivo se houver diferenciação de *Streptococcus agalactiae* das demais, devido à maior susceptibilidade aos antibióticos, sendo facilmente erradicado dos rebanhos enquanto as outras espécies não podem e não respondem as mesmas medidas de prevenção e controle (BRITO; BRITO, 1999).

REFERÊNCIAS

AAMER, A.A.; ABDUL-HAFEEZ, M. M.; SAYED, S.M. Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations (MIC and MBC) of Honey and Bee Propolis against Multi-Drug Resistant (MDR) *Staphylococcus* sp. isolated from Bovine Clinical Mastitis. **Alternative & Integrative Medicine**, v. 3, n. 171 2014. Disponível em: <<http://esciencecentral.org/journals/minimum-inhibitory-and-bactericidal-concentrations-mic-2327-5162-3-171.pdf>>. Acessado em: 25 abr. 2015.

ALMEIDA, A. C.; SOBRINHO, E. M.; PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R.; SANTOS, H. O.; BRANDI I. V.; CANGUSSU, A. S.; COSTA, J. P. R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural**, v.40, n.1, p.200-204, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n1/a415cr1346.pdf>. Acessado em: 04 jun. 2015. (a)

ALMEIDA, M. C. S.; ALVES, L. A.; SOUZA, L. G. S.; MACHADO, L. L.; MATOS, M.C.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1877- 1881, 2010. Disponível em: < http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol33No9_1829_10-AR10044.pdf>. Acessado em: 14 jul.2015. (b)

ALMEIDA, R.A.; OLIVER, S.P. Invasion of bovine mammary epithelial cells by *Streptococcus dysgalactiae*. **Journal of Dairy Science**, v.78, n.6, p.1310-1317, 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9565870>>. Acessado em: 14 jul.2015.

ANDRADE, V.A.; ALMEIDA,A.C.; SOUZA, D.S.; COLEN, K.G.F.; MACEDO, A.A.; MARTINS, E.R.; FONSECA,F.S.A.; SANTOS,L.R. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia organoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34,n.12,p. 1153-1161, 2014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2014001200002>. Acessado em: 14 jun. 2015.

ANTONIOLLI, L. R.; BEVEDETTI, B. C.; SOUZA FILHO, M. S. M.; BORGES, M. F. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi 'pérola' minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 157-160, 2005. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v27n1/24590.pdf>>. Acessado em: 05 jun. 2015.

AZIZOGLU, R. O.; LYMAN, R.; ANDERSON. K. L. Bovine *Staphylococcus aureus*: Dose response to iodine and chlorhexidine and effect of iodine challenge on antibiotic susceptibility. **Journal of Dairy**, v.96, p.993–999, 2013. Disponível em: <

[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(12\)00921-6/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(12)00921-6/pdf). Acessado em: 06 jun.2015.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, C.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541>>. Acessado em: 06 jun.2015.

BANDEIRA, F.S.; PICOLI, T.; ZANI, J.L.; SILVA, W.P.; FISCHER, G. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região Sul do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.01-06, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572013000100001>. Acessado em: 22 jun. 2016.

BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.16, n.4, p. 383-407, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10911-011-9235-z#page-1>>. Acessado em: 25 abr.2015.

BARRETO, H. M.; LIMA, I. S.; COELHO, K. M. R. N.; OSÓRIO, L. R.; MOURÃO, R. A.; SANTOS, B. H. C.; COUTINHO, H. D. M.; ABREU, A. P. L.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Effect of *Lippia organoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Integrative Medicine**, p. 1-16, 2014. Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/266674233_Effectof_Lippia_organoides_HBK_essent ialoilintheresistanceto_aminoglycosides_inmethicillinresistant_Staphylococcus_aureus >. Acessado em: 23 jun. 2016. (a)

BARRETO, H. M.; FONTINELE, F.C.; OLIVEIRA, A.P.; ARCANJO, D.D.R.; SANTOS, B.H.C.; ABREU, A.P.L.; COUTINHO, H.D.M.; SILVA, R.C.; SOUSA, T.O.; MEDEIROS, M.G.F.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.D. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia organoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2014: 1-7, 2014. Disponível em:<<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/305610/>>. Acessado em: 23. Jun. 2016. (b)

BENEDETTE, M. F. SILVA, D.; ROCHA, F.P.C.; SANTOS, D. A. N.; COSTA, E.A.; AVANZA, M. F. B. Mastite bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 11, p.1-5, 1 jul. 2008. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/s8Qkxdp3ibXOROS_2013-6-13-15-52-55.pdf>. Acessado em: 07 jun.2015

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº64, de 18 de dezembro de 2008. Aprova Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. Diário Oficial da União de 19 de Dezembro de 2008, Seção 1, Página 21, Brasília, DF.** Disponível em: <http://ibd.com.br/Media/arquivo_digital/4c297318-e2cb-4784-aa22-f726260ce7e3.pdf> Acessado em: 15 abr. 2014.

BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G. M. M.; BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de Estafilococos coagulase positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 79-82, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782002000100014&script=sci_arttext>. Acessado em: 05 jun. 2015.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n.5, p.531-537, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000500003>. Acessado em: 07 jun.2015.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O . Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Juiz de Fora, v.51, n.2, p.129-135, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09351999000200001>. Acessado em: 07 jun.2015.

CASTRO M. Homeopathy. A theoretical framework and clinical application. **Journal Nurse Midwifery**, v.44, n.3, p. 280-290, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10380446>>. Acessado em: 5 jun.2015.

COSTA, J. P. R.; ALMEIDA, A.C.; MARTINS, E.R.; RODRIGUES, M.N.; SANTOS, C.A.; MENEZES, I.R. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e o extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. **Biotemas**, n.24, p.1-6, 2011. Disponível em:< <https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2011v24n4p1> >. Acessado em: 20 jun. 2016.

CUNHA, M.L.R.S., PERESI, E., CALSOLARI, R.A.O., ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.1, p.70-74, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822006000100013&script=sci_arttext>. Acessado em 07 jun.2015.

CUNHA, M.L.R.S.; LOPES, C.A.M.; UGOLO, L.M.S.S.; CHALITA, L.V.A.S. Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa solados de recém-nascidos. **Jornal de Pediatria**, v.78, n.4, p.279-288, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jped/v78n4/v78n4a06>. Acessado em: 23 jun. 2016.

DE Vlieghe S.; FOX L.K.; PIEPERS S.; MCDougall S.; BARKEMA H.W. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal Dairy Science**, v. 95, n.3, p.1025-1040, 2012. Disponível em: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(12\)00062-8/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(12)00062-8/abstract)>. Acessado em: 13 abr.2015.

DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasileira**,v.1, n.1, p.23-27, 2007. Disponível em: <<http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/acta/article/view/255/95>>. Acesso em: 27 abr.2015.

DOHOO ,I. R.; SMITH,J.; ANDERSEN, S.; KELTON, D. F.; GODDEN, S. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. **Journal Dairy Science**, v.94, p. 250–261, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21183035>>. Acessado em: 14 abr.2015.

DUFOOUR, S.; FRÉCHETTE,A.; BARKEMA,H.W.; MUSSEL, A.; SCHOLL,D.T. Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.563-579, 2011. Disponível em: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(11\)00004-X/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(11)00004-X/abstract)>. Acessado em: 09 abr.2015.

FAGUNDES, H. **Ocorrência de resíduos de antimicrobianos utilizados no tratamento de interrupção de lactação no início da lactação subsequente em animais com período seco recomendado**, 91p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos. Universidade de São Paulo. Pirassununga, SP, 2003. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-05032004-151927/pt-br.php>>. Acessado em: 5 jun.2015.

FEBLER, A.T.; BILLERBECK, C.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.65, p.1576-1582, 2010. Disponível em:<<http://jac.oxfordjournals.org/content/65/8/1576.long>>. Acesso em: 29 abr.2015.

FRANZ, C.M. Essential oil research: past, presente and future. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 3, p. 112-113, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ffj.1983/epdf>> . Acessado em: 07 jun.2015.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. ; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S.S. A . ; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R. A. Perfil de Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto Biologia**, São Paulo, v. 72, n. 2, p.171-177, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2009000700012&script=sci_arttext>. Acessado em: 07 jun.2015.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V.R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v.36, n. 1, p. 64-77, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702011000100005>. Acessado em 20 abr. 2015.

GUIMARÃES, F.F.; NÓBREGA, D.B.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; MARSON, P.M., FIGUEIREDO, J.C.P.; LANGONI, H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n.5,p.2866-2872, 2013. Disponível em: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(13\)00169-0/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(13)00169-0/pdf)>. Acessado em: 23 jun. 2016.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.7, p.2103-2112, 1994. Disponível em: < [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(94\)77153-8/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(94)77153-8/pdf)>. Acessado em: 05 jun.2015.

HOLMES, M.A.; ZADOKS, R.N. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. **Journal of Mammary Gland Bioogy and Neoplasia**, 16: 3733-82, 2011. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21984431>>. Acessado em: 15 jun.2016.

KHAN, M. Z. ; KHAN, A. Basic facts of mastitis in dairy animals: a review. **Pakistan Veterinary Journal**. v. 26, n.4, p.204-208, 2006. Disponível em: < http://pvj.com.pk/pdf-files/26_4/page%20204-208.pdf>. Acessado em: 21 abr.2015.

KONEMAN, E.; WINN JUNIOR, W.; ALLEN,S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER,P.; WOODS, G. **Diagnóstico microbiológico**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.11, 2001.

KUMAR, R.; YADAV, B.R.; SINGH, R.S. Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle. **Journal of Bioscience**, v.36, n.1, p.175-188, 2011. Disponível em: < <http://www.ias.ac.in/jbiosci/mar2011/175.pdf>>. Acessado em: 29 abr.2015.

LANGONI, H.; TONI, F.B.; CABRAL, K.G.; CAVALIERO, M.J. Tratamento da mastite bovina com associação ampicilina + cloraxacilina. **Revista do Núcleo de Pesquisa da Glândula Mamária e Produção Leiteira**, n.3, p.21-23, 1999. Disponível: em: < https://www.researchgate.net/profile/Wildo_Araujo/publication/268328092_TRATAMENTO_DA_MASTITE_BOVINA_COM_AMOXICILINA_E_ENROFLOXACINA_BEM_COMO_COM_A_SUA_ASSOCIAO/links/548e61510cf2d1800d842447.pdf>. Acessado em: 05 jun.2015.

LOPES, M.A.; DEMEU, F.A.; ROCHA, C.M.B.M.; COSTA, G.M.; FRACO NETO, A.; SANTOS, G. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.4, p.477-483, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1808-16572012000400003>>. Acesso em: 15 jun. 2015.

MEDEIROS, N. G. A.; CARVALHO, M. G. X.; LEITE, E. O; PEREIRA, J. M.; PONTES, M. P. S. Detecção de antibióticos no leite "*in natura*" consumido no município de Patos-PB. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 52, p. 147-157, 2009 Disponível em:<

<http://www.ufra.edu.br/editora/revista_52/REVISTA%2052_artigo%2013.pdf> . Acessado em 07 jun. 2015.(b)

MIGUEL, P.R.R.; POZZA, M.S.S.; CARONL. F.; ZAMBOM, M.A.; POZZA, P.C. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e susceptibilidade a agentes antimicrobianos. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 33, n. 1, p. 403-416, 2012. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/6821/10166>>. Acessado em: 12 abr. 2015.

MORONI, P. ; PISONI, G.; ANTONINI, M.; VILLA, R.; BOETCHER, P.; CARLI, S. Short communication: antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. **Journal Dairy Science**, v.89, n.8, p.2973-2976, 2006. Disponível em: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(06\)72569-3/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(06)72569-3/pdf)>. Acessado em: 28 abr.2015.

MOTA, R. A.; MEDEIROS, E.S.; SANTOS, M.V.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; MOURA, A.P.B.L.; COUTINHO, L.C.A. Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 124-130, 2012. Disponível em: < <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/3790>>. Acessado em: 29 abr.2015.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1316-1318, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352007000500032>. Acessado em : 29 abri.2015

NAM, H.M.; LIM, S.K.; KIM, J.M.; KANG, H.M.; MOON, J.S.; JANG, G.C.; KIM, J.M.; WEE, S.H.; JOO, Y.S.; JUNG, S.C. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.10, p.1446-1449, 2010. Disponível em: <<http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?year=2010&vol=20&num=10&page=1446>>. Acessado em: 29 abr.2015.

NASCIMENTO, H. M.; DELGADO, D. A.; BARBARIC, I. F. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, v. 2, n. 1, p. 11-13, 2010. Disponível em: <http://sites.unisanta.br/revistaceciliana/edicao_03/1-2010-11-13.pdf>. Acessado em: 05 jun. 2014.

OLIVEIRA, C.M. SOUSA, M.G.S.; SILVA e SILVA, N.; MENDONÇA, C.L.; SILVEIRA, J.A.S.; OAIGEN, R.P.; ANDRADE, S.J.T.;BARBOSA,J.D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará . **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.2, p.104-110, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011000200002>. Acessado em: 12 jun.2016.

OLIVEIRA, A.A.; MELO, C.B.; AZEVEDO , H.C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.1, p.226-230, 2009. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/8348/1/ARTIGO_DiagnosticoDeterminacaoMicrobiologica.pdf>. Acessado em: 29 abr.2015

PEDRINI S.C.B.; MARGATHO L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivo Instituto Biológico**, v,70, n.4, p.391-395, 2003. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V70_4/pedrini.pdf>. Acessado em 06 jun.2015.

PIESSENS,V.; DE VliegHER, S.; VERBIST,B.; BRAEM, G.; VAN NUFFEL,A.; DE VUYST,L.; HEYNDRIKX,M.; VAN COILLIE,E. Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative *Staphylococcus* species causing bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, v.155, n.1, p.62-71, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889271>>. Acessado em: 16 jun.2016.

PRIBUL, B.R.; PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; COELHOI, S.M.O.; BARBERIS, I.L.; PASCUAL, L.; SOUZA, M.M.S. Resistência bacteriana a ação das bacteriocinas de *Lactobacillus* spp em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**,v.63, n.3, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352011000300029&script=sci_arttext>. Acessado em: 29 abr. 2015.

QUIRK,T.; FOX,L.K.; HANCOCK,D.D.; CAPPER,J.; WENZ,J.; PARK,J. Intramammary infections and teat canal colonization with coagulase-negative *Staphylococcus* after postmilking teat disinfection: Species-specific response. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.4, p.1906-1912, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22459837>>. Acessado em: 20 out. 2015.

RIGATTI, F.; TIZOTTI, M.K.; HORNER, R.; DOMINGUES, V.O.; MARTINI, R.; MEYER, L.E.; KHUN,F.T.; FRANÇA,C.A.; COSTA, M.M. Bacteremias por *Staphylococcus* coagulase negativos oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.6, p.686-690,2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v43n6/17.pdf>>. Acessado em: 20 jun. 2016.

ROCHA, B.; MENDONÇA, D.; RIBEIRO, J.N. Trends in Antibacterial Resistance of Major Bovine Mastitis Pathogens in Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, n. 109, p. 591-592, 2014. Disponível em: <http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12_2014/79-88.pdf>. Acessado em: 25 de ab. 2015.

SANTIAGO-NETO, W.; MACHADO, G.; PAIM, D.S.; CAMPOS, T.; BRITO, M.A.V.P.; CARDOSO, M.R.I.; CORBELLINI, L.G. Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.7, p.613-630, 2014. Disponível em:<<http://www.pvb.com.br/?link=verart&tipo=ID&campo1=1453>>. Acessado em: 24 jun. 2016.

SANTOS, L.L.; COSTA, G.M.; PEREIRA, U.P.; SILVA,M.A.; SILVA, N. Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus* coagulase-negativa. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.70, n.1,p.1-7, 2011. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552011000100001&lng=pt>. Acessado em: 22 jun. 2016.

SANTOS, L.L.; PEDROSO, T.F.F.; GUIRRO, E. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia de Santa Isabel do Oeste, Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.4, p.860-866, 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/download/3654/8360>>. Acessado em: 22 jun. 2012.

SANTOS M. V.; FONSECA L. F. L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. Editora Manole, Barueri, p.314, 2006.

SANTOS, C.D.M.; LEAL, G.S.; ROSSI, D.A. Frequência e susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de leite de vacas com mastites recorrentes de rebanhos da região de Uberlândia-MG. **Veterinária Notícias**, v.12, n.2, p.83-88, 2006. Disponível em:<<http://www.seer.ufu.br/index.php/vetnot/article/view/18816>>. Acessado em: 23 jun. 2016.

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

SCHIAVON, D. B. A.; SCHUCH, L. F. D.; OYARZABAL, M. E. B.; PRESTAS, L. S.; ZANI, J. L.; HARTWIG, C. A. Aplicación de plantas medicinales para La antiseptia de pezones de vacas posordeño. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 16, p. 253-259, 2011. Disponível em: < http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962011000300005&script=sci_arttext>. Acessado em 03 jun.2015.

SCHUCH, L. F. D.; WIEST, J. M.; COIMBRA, H. S.; PRESTES, L. S.; TONI, L.; LEMOS, J. S. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 161-169, 2008. Disponível em:< <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/968>>. Acesso em: 30 abr. 2014.

SCHWARZ,S.; SILLEY,P.; SIMJEE, S.; WOODFORD,N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON,A.P.; GAASTRA,W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Veterinary Microbiology**, v.141, n.1-2, p.1-4, 2010. Disponível em: < <http://jac.oxfordjournals.org/content/early/2010/02/24/jac.dkq037.full.pdf+html>>. Acessado em: 25 abr. 2015

SILVA,N.C.C.; GUIMARÃES, F.F.; MANZI, M.P.; GÓMEZ-SANZ, E.; GÓMEZ, P.; ARAÚJO JUNIOR, J.P., LANGONI, H.; RALL V.L.M.; TORRES, C. Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in milk from cows with mastitis in Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n.2, p. 227-233, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24817534> . Acessado em: 23 jun, 2016.

SINGH, G.; KIRAN, S.; MARIMUTH, P.; ISIDOROV, V.; VINOGOROVA, V. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and various oleorensis of *Elettaria cardamomum* (seeds and pods). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, n.2, p.280-289, 2008. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.3087/abstract>>. Acessado em: 06 jun.2015.

SPOHR, M.; RAU,J.; FRIEDRICH, A.; KLITTICH,G.; FETSCH,A.; GUERRA, B.; HAMMERL, J.A.; TENHAGEN,B.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany. **Zoonoses Public Health**, v.58, n.4, p.252-261, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20630047>>. Acessado em 15 jun. 2016.

SILVA, M. C. P. *et al.* Potentiation of antibiotic activity by *Lippia origanoides* H.B.K. in *Staphylococcus aureus*. In: **II Encontro Estratégico de Ciências Farmacêuticas. II Seminário Ibero Americano de P&D de Medicamentos., 2015**, TERESINA. II ENCONTRO ESTRATÉGICO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS II SEMINÁRIO IBERO AMERICANO DE P & D DE MEDICAMENTOS. TERESINA: Universidade Federal do Piauí, n.2, p.626-627, 2015.

SIQUEIRA, V. M.; CONTI, R.; ARAÚJO, J. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, n. 53, p. 89–95, 2011. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13199-011-0113-7>>. Acessado em: 06 jun.2015.

SOARES L.C. PEREIRA, I.A.; PRIBUL, B.R.; OLIVA, M.S.; COELHO, S.M.O.; SOUZA, M.M.S. Antimicrobial resistance and detection of mec and blaZ genes in coagulase- -negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.8, p.692-696, 2012. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000900008>. Acessado em: 23 jun. 2016.

SOUTO L.I.; MINAGAWA, C.Y.; TELLES, E.O.; GARBUGLIO, M.A.; AMAKU,M.; MELVILLE, P.A.; DIAS, R.A.; SAKATA, S.T.; BENITES, N.R. Correlation between mastitis occurrence and the count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media. **Journal of Dairy Research**, v.77, p.63-70, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19939321>>. Acessado em: 30 nov. 2015.

SOUTO, L.I.M. **Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo**, Brasil, 84 p. Tese

(Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-30052007-15235.php>>. Acessado em: 20 abr. 2015.

TENHAGEN, B.A.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.7, p.2542-2551, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16772573>>. Acessado em: 23 jun. 2016.

TRAVERSO, S. D. CUNHA, L.; FERNANDES, J.C.T.; LORETTI, A.P.; RHODEN, A.; WUNDER JR, E.; DRIEMEIER, D. Mastites com lesões sistêmicas por *Staphylococcus aureus* subesp. aureus em coelhos. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 33, n. 2, p.373-376, mar. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v33n2/15233.pdf>>. Acessado em: 07 jun.2015.

WAAGE, S., MORK, T., ROROS, A. AASLAND, D., HUNSHAMAR, A., ODGAARD, S. A. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. **Journal Dairy of Science**, v. 82, n. 4, p. 712-719, 1999. Disponível em: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(99\)75288-4/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(99)75288-4/abstract)>. Acessado em: 07 jun.2015.

WALLER, K.P.; ASPÁN, A.; NYMAN, A.; PERSSON, Y.; ANDERSSON, U.G. CNS species and antimicrobial resistance in clinical e subclinical bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.152, p. 112-116, 2011. Disponível em: <<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00719073/document>>. Acessado em: 29 abr.2015.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 16, p. 41-66, 1988. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com.ez27.periodicos.capes.gov.br/0378113588901265/1-s2.0-0378113588901265-main.pdf?_tid=b865502a-0d1e-11e5-a310-00000aab0f27&acdnat=1433686309_46b40134d6db06a3ee0c6849aba9f2d6>. Acessado em: 07 jun. 2015.

ZURITA,J.; MEJIA,C.; GUZMAN-BLANCO, M. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **Brazilian Journal Infectologist Disease**, v. 14, n.2, p. 97-106, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702010000800005&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 20 Jun. 2016.

4 ARTIGOS

4.1- ARTIGO 1- Uso de produto à base de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) na redução das infecções intramamárias em vacas de leite

Este artigo foi elaborado seguindo normas da Revista Ciência & Agrotecnologia da UFLA.

Uso de produto a base de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) na redução das infecções intramamárias em vacas de leite

Resumo: Antimicrobianos no controle da mastite são preocupantes na saúde pública por selecionar micro-organismos utilizados inadequadamente, com isso, estudos com plantas medicinais surgem como alternativa ao uso de produtos convencionais. Objetivou-se no presente estudo avaliar eficácia de um produto alternativo experimental à base de óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) na higienização de tetos pré e pós ordenha de vacas da raça Holandês. Foram utilizadas amostras de leite individuais e analisadas seguindo metodologias de isolamento em agar sangue de carneiro e provas bioquímicas, em que foram isolados 10,42% de *Streptococcus* spp. e 26,56% de *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN). Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos com isolados de SCN e *Streptococcus* spp.. Os dois tratamentos não influenciaram na ocorrência de Novas Infecções Intramamárias (NIIM) e os resultados foram semelhantes na desinfecção dos tetos demonstrando eficácia do produto à base de alecrim-pimenta nos tetos.

Index-terms: bovinocultura leiteira, estafilococos, estreptococos, microbiologia.

INTRODUÇÃO

Bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* alteram a composição centesimal, número de células somáticas (CCS), qualidade microbiológica, físico e química do leite (Dufour *et al.*, 2011), sendo *Staphylococcus* spp. encontrado principalmente nas amostras do leite de animais com mastite clínica (De Vliegher *et al.*, 2012).

Staphylococcus coagulase negativo são frequentemente isoladas em leite bovino e consideradas como patógenos secundários, bem como *Streptococcus* spp. (Sampimon *et al.*, 2011; Innings *et al.*, 2005) causando inflamações na glândula mamária (Santos *et al.*, 2011).

O controle da mastite na propriedade é importante ferramenta na redução da contaminação do leite, sendo necessária a antissepsia dos tetos com o pré e pós *dipping* e o monitoramento da produção de leite (Miguel *et al.*, 2012).

Compostos antibacterianos utilizados no controle da mastite têm sido de grande preocupação na saúde pública e segurança alimentar. O uso inadequado apontado como fator seletivo para *Staphylococcus aureus* em glândulas mamárias de vacas e a frequência de utilização desses produtos vem incentivando novas pesquisas com métodos terapêuticos no controle efetivo da doença (Aamer; Abdul-Hafez e Sayed, 2014).

Desenvolver pesquisas que visam valorizar e validar o saber popular para estimular o uso de produtos naturais na produção de alimentos de origem animal é prática valiosa para um país em que a segurança alimentar e acesso à saúde é restrito a alguns grupos (Badke *et al.*, 2010). Dessa forma, as plantas medicinais por conter compostos biologicamente ativos na sua estrutura e características bactericidas são de interesse zootécnico na terapia e produção animal e surgem como alternativa ao uso de

medicamentos convencionais devido ao custo mais elevado (Siqueira *et al.*, 2011), e por estar associado à resistência bacteriana.

Alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) é uma planta arbustiva nativa do semiárido do Nordeste e Norte de Minas Gerais (Martins *et al.*, 2002). Suas folhas apresentam óleo essencial composta por 60% de timol ou mistura de timol e carvacrol, e compostos químicos como flavonóides e quinolonas, sendo esses, agentes antimicrobianos (Lorenzi; Matos, 2002).

O óleo essencial da *Lippia origanoides* possui atividade antimicrobiana comprovada frente à *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* (Almeida *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2011 e Silva *et al.*, 2010)

Produtos utilizando plantas medicinais na sua composição mostram resultados positivos quando utilizados corretamente, com redução significativa da população microbiana. Assim, nessa pesquisa, verificou-se a eficácia frente aos micro-organismos isolados do leite de bovinos recebendo tratamento de um antisséptico alternativo elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) para higienização de tetos no pré e pós ordenha no controle de novas infecções intramamárias.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos animais e escolha dos tetos

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo 230/2014 (ANEXO 1).

Utilizaram-se dezesseis fêmeas 31/32 Holandês X Zebu, totalizando 64 tetos por período de seis semanas, com análise de tetos. Os animais utilizados pertenciam ao setor de bovinocultura leiteira da Fazenda Experimental Hamilton de Abreu Navarro

(FEHAN) localizada no Campus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Montes Claros-MG. Um lote homogêneo foi composto por vacas de 100 a 200 dias de lactação (DEL), com quartos mamários funcionais e sem presença de mastite clínica, diagnosticada pelo teste de caneca telada realizado duas vezes ao dia, durante um mês antes do início do experimento com escore de integridade de mucosa < 3 e escore de sujidade < 4 (Quirk *et al.*, 2014).

As vacas selecionadas foram manejadas em lote separado dos demais animais da propriedade, sendo ordenhadas duas vezes, às 05:00 e 14h30 min, por ordenha mecanizada, tipo balde ao pé. O funcionamento e a limpeza dos equipamentos da ordenha foram realizados diariamente de acordo com a recomendação do fabricante.

Os tetos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: um tratado com produto convencional e o outro com produto teste, sendo realizada de forma aleatória por sorteio, um teto esquerdo e um direito e um anterior e posterior em posição diagonal. Cada grupo foi composto por 32 tetos e a identificação dos tetos tratados com produto teste foi realizada com fitas e amarrados nas patas correspondentes para diferenciação. Adotou-se o protocolo convencional com clorexidine a 1% (Hexiderm®) e iodo a 2500 p.p.m. (ULTRADIP 2500®) respectivamente no pré e pós-*dipping* e protocolo teste com produto experimental elaborado com óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia origanoides*) na concentração de 120 µl/mL elaborado pela Escola de Farmácia da UFMG, utilizado no pré e pós-*dipping*. A elaboração do produto teste atendeu os requisitos para produtos antimicrobianos de uso veterinário conforme recomendações de Brasil (2012).

O produto alternativo foi aplicado por imersão no pré e pós-*dipping*, sendo um aplicador sem retorno para cada um dos tratamentos e permaneceram em contato com os tetos por 30 segundos, sendo o armazenamento do desinfetante verificado e

considerado em conformidade de acordo com as recomendações do fabricante, garantindo aplicação adequada nos tratamentos testados (Ceballos-Martinez *et al.*, 2013).

O teste de caneca telada (CT) foi realizado diariamente nas duas ordenhas no diagnóstico de mastite clínica para acompanhar possíveis lesões ou reações ao produto testado avaliando-se os escores de integridade do esfíncter do teto (EIET) e escore de sujidade (EST) conforme recomendados por Mein *et al.* (2001) e Renau *et al.* (2005). Após cada ordenha era realizado o pós-*dipping* e as vacas monitoradas e mantidas em pé com o fornecimento de alimento por 30 minutos, visando o fechamento total do esfíncter do teto e, conseqüentemente, minimizar a contaminação por patógenos.

Procedimentos para coleta e armazenamento das amostras de leite

A coleta do leite seguiu metodologia de Simões *et al.* (2013), em que os tetos eram previamente limpos com algodão embebidos em álcool na concentração de 70% e os primeiros jatos descartados. Os tetos mais distantes do ordenhador eram primeiramente higienizados evitando a recontaminação. Os frascos com as amostras foram acondicionados em caixas térmicas com gelo e temperatura de aproximadamente 4 a 5°C, sendo encaminhadas ao laboratório de Sanidade Animal do CPCA localizado no Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.

Isolamento e identificação das bactérias

A metodologia de isolamento dos micro-organismos e identificação foi realizada de acordo com Brito *et al.* (2002)., consistindo em inocular 100 µL da amostra de leite com auxílio de alça de *Drigalski* em placas contendo meio Ágar Sangue Ovino desfibrinado a 5%.

Após 48 horas de incubação em estufa a 37°C, procedeu-se avaliação das colônias quanto a tamanho, aspecto, coloração e presença ou ausência de hemólise. Apenas colônias típicas de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. foram posteriormente inoculadas em *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) e *Tryptone Soy Agar* (TSA), para coloração de Gram e provas bioquímicas (Simões *et al.*, 2013).

Identificação dos micro-organismos por provas bioquímicas

Os micro-organismos isolados do leite foram analisados bioquimicamente por metodologias convencionais para identificação de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Quinn, 2005; Brito *et al.*, 2002 e Simões *et al.*, 2013), e posteriormente preservados e armazenados conforme recomendações da Anvisa (2006) na bacterioteca do Laboratório de Sanidade Animal do CPCA do ICA/UFMG.

Avaliação da eficácia do produto teste

Adotaram-se os critérios indicados por Schukken; Rauch e Morelli (2013) com alterações e definiram-se para micro-organismos indicadores da eficácia do tratamento, a presença e ausência de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo e *Streptococcus* spp.

Inicialmente definiu-se o *status* bacteriológico de cada quarto mamário na primeira coleta de leite do período de tratamento usando única amostra. Uma vez que o quarto era identificado como infectado por um micro-organismo específico, caso ocorresse nova infecção com o mesmo agente, esta não foi considerada nova infecção. Para ser considerado como NIIM o quarto, não poderia ter sido identificado anteriormente com qualquer infecção na amostragem do dia de início do experimento e

diante da ocorrência de mastite clínica o animal era excluído do experimento (Ceballos-Martinez *et al.*, 2013; Reyer e Dohoo, 2011).

Os quartos mamários foram identificados como tendo uma nova infecção intramamária (NIIM) quando o mesmo micro-organismo foi isolado em no mínimo duas coletas consecutivas (Ceballos-Martinez *et al.*, 2013) e a cura de NIIM foi determinada quando as amostras estavam livres do patógeno identificado como NIIM em três coletas consecutivas (Quirk *et al.*, 2012).

A avaliação da eficácia do produto foi calculada a partir da redução das taxas de eficácia de redução observadas durante o período experimental comparando os dois produtos conforme recomendado por Ceballos-Martinez *et al.* (2013), a partir da equação:

$$\text{Eficácia de um produto experimental} = \frac{\text{taxa de NIIM com produto experimental}}{\text{taxa de uma NIIM com produto controle}}$$

Equação 1: Fórmula para determinação da Eficácia de Produto Experimental.

Adotou-se também as recomendações de Ceballos-Martinez *et al.* (2013), quanto aos critérios para o produto experimental ser considerado não inferior foi necessário definir uma margem não inferior denominada (d), sendo este de 50% (NMC, 2014).

Definiu-se que:

1) H_0 = taxa nova IMI com produto experimental - Taxa de novo IMI com produto convencional fosse $\geq d$: produto experimental seria inferior ao convencional;

2) H_A = taxa nova IMI com produto experimental - Taxa de novo IMI com produto convencional fosse $< D$: produto experimental não inferior ao convencional.

Análise estatística

Para avaliar a frequência da ocorrência de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., quando se utilizou dois tratamentos como antissépticos locais no pré-*dipping* foi utilizado o GraphPad Prism, Versão 5 (Graphpad, 2015)

A diferença observada na taxa de um novo IMI entre os tratamentos foi calculada pelo teste de qui-quadrado, sendo a hipótese de que não há diferenças na incidência do convencional com o produto teste baseados no pré e pós-*dipping* na redução das infecções que ocorrem naturalmente (Ceballos-Martinez *et al.*, 2013), utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism, Versão 5 (Graphpad, 2011), com o intuito de fazer uma análise comparativa entre os índices de novas infecções intramamárias. Adotou-se a correlação de Pearson avaliando a presença das bactérias nos diferentes tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais achados no presente estudo é que não foram observados casos de mastite clínica e de lesões na mucosa dos tetos dos animais e escore de sujidade. As taxas de diagnóstico de mastite subclínica não diferiram estatisticamente entre si ($p=0,0162$) nos dois grupos de estudo, demonstrando que não houve interferência destes nos resultados.

Sabe-se que uma das características desejáveis de um desinfetante é que não possua toxicidade ou irritativo, promova boa higienização e mantenha integridade dos tetos durante todo o tratamento, o que indica que não promoveu qualquer lesão que pudesse causar danos à pele dos tetos (Pedrini e Margatho, 2003; Nickerson, 2001). Outro fator importante foi o acompanhamento da presença de matéria orgânica na pele dos tetos com avaliação do escore de sujidade, visto que a lavagem dos tetos antes da

ordenha é considerada como um fator de proteção para a mastite (Oliveira *et al.*, 2011) pois visa reduzir a sujidade presente nos tetos e, conseqüentemente, diminuir o número de micro-organismos, que eventualmente possam penetrar no canal do teto durante a ordenha através do esfíncter e desencadear um processo inflamatório.

A ausência de mastite clínica e o acompanhamento dos casos de mastite subclínica dentro de níveis aceitáveis também foram importantes na avaliação da eficácia do produto em teste, uma vez que reduz o nível de contaminação no rebanho.

De 384 amostras de leite totais avaliadas, em nenhuma foi identificada *Staphylococcus aureus*, sendo encontrado 13,54% de positivas para *Staphylococcus* coagulase negativo (n=26/192) e 9,89% para *Streptococcus ssp.* (n=19/192) verificados nos tetos no decorrer do tratamento.

A ausência de *S. aureus* pode ser explicada pelo acompanhamento prévio dos animais para composição do grupo experimental, no qual o critério de exclusão era a presença deste agente, todos os tetos eram saudáveis. A adoção de boas práticas de ordenha durante todo o período experimental e o manejo dos animais em lotes separados dos demais na propriedade podem ter contribuído para a ausência deste patógeno indicando que os dois produtos foram eficientes para evitar que o mesmo adentrasse pelo canal do teto, vindo a causar mastite (Zanette *et al.*, 2010).

Sabe-se da importância de *S. aureus* principalmente por promover tratamentos não efetivos no controle de mastite e por estarem associado ao uso indiscriminado de antibióticos propiciando cepas multirresistentes (Rocha; Mendonça e Ribeiro, 2014), o que reflete também na resistência aos produtos utilizados para higienização dos tetos.

Não foi observada diferença significativa entre as coletas e os tratamentos tanto para *Staphylococcus* coagulase negativa quanto para *Streptococcus ssp* ($p>0,05$) (FIGURA 1).

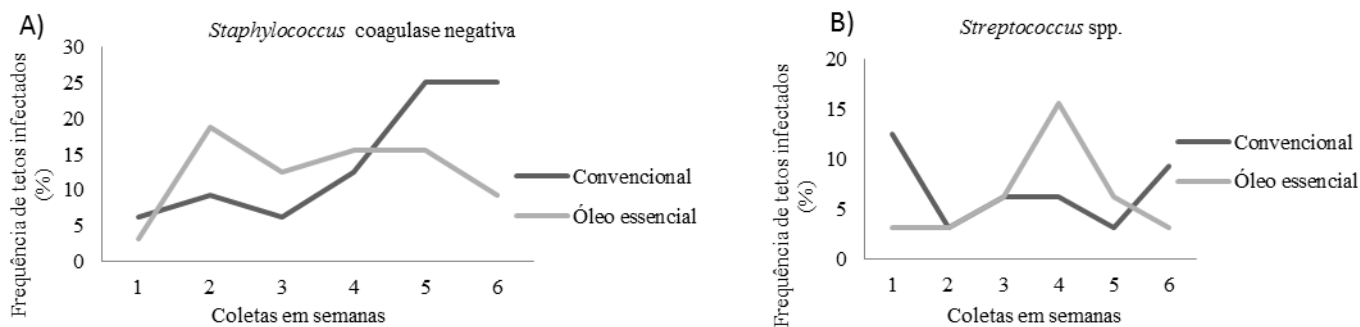


FIGURA 1 – Frequência de *Staphylococcus coagulase negativa* (A) e *Streptococcus spp.*(B) isolados de leite de vacas submetidas a dois tratamentos de higienização dos tetos em um período de seis semanas consecutivas.

Fonte: da autora.

Comparando os isolamentos de micro-organismos ao agrupados por tetos em cada tratamento não houve diferença significativa na frequência de isolamentos de *Staphylococcus coagulase negativa* (A) e de *Streptococcus spp.* (B) entre os dois tratamentos ($p>0,05$) (FIGURA 2).

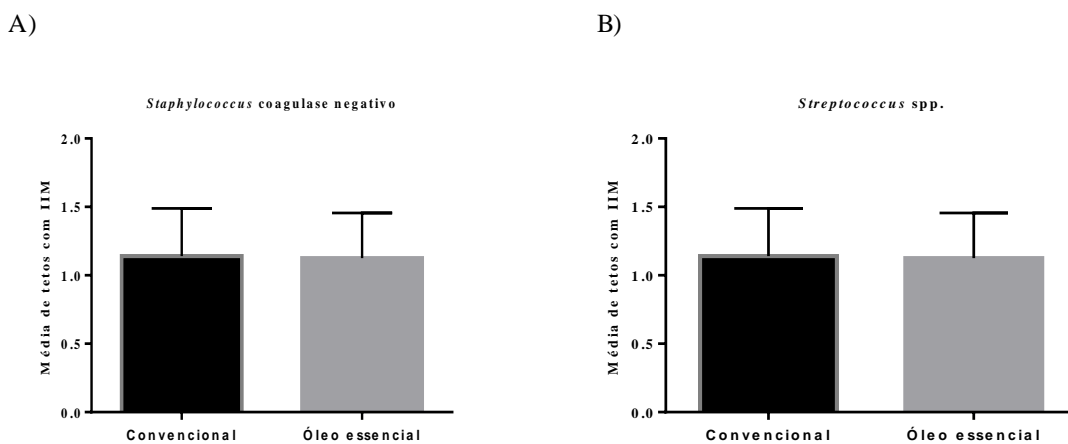


FIGURA 2- Média de número de tetos com NIIM *Staphylococcus coagulase negativa* (A) e *Streptococcus spp.* (B) isolados em amostras de leite provenientes de tetos higienizados com produto convencional e com produto elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta.

Fonte: da autora.

Observa-se que a frequência de *Staphylococcus coagulase negativa* (A) (FIG.1) e *Streptococcus spp.* (B) deve ser considerado, ainda que não tenha ocorrido diferença

significativa entre os produtos utilizados, pois são grupos de micro-organismos potencialmente patogênicos.

Mello *et al.*, 2012, encontraram resultados semelhantes e citam que a presença destes agentes caracterizam ocorrência de mastite contagiosa indicando que medidas profiláticas e adoção de desinfecção de tetos pré e pós ordenha são primordiais no controle de mastite.

Alguns autores consideram *Staphylococcus* coagulase negativa como um grupo de patógenos secundários e que podem causar infecção mamária moderada (Pate *et al.*, 2012) e possuem grande prevalência nos rebanhos bovinos (Dufour *et al.*, 2012; Piessens *et al.*, 2012). No entanto, outros autores citam SCN como agentes causadores de mastite subclínica e clínica, com severos quadros clínicos da doença (Mota *et al.*, 2012 e Pitkala *et al.*, 2004), e podem ser prejudiciais no aumento da CCS do leite (Supré *et al.*, 2011; Paradis *et al.*, 2010) com diminuição da produção de leite (Paradis *et al.*, 2010; Quirk *et al.*, 2012).

O leite residual favorece o desenvolvimento de SCN, assim se transformando em agente infeccioso por atuar como meio de cultura na colonização da pele do teto do animal acarretando a infecção intramamária (Langoni, 2013; Quirk *et al.*, 2012).

Dados atuais indicam a importância do grupo SCN na ocorrência de mastite clínica e subclínica em rebanhos no Brasil e em outros países. A frequência varia de 8,35% (Oliveira *et al.*, 2011) com mastite clínica, e na mastite subclínica 4,8% e 8,35% (Oliveira *et al.*, 2011 e Santos *et al.*, 2011). Em rebanhos brasileiros a frequência de isolamento obtidas foram de 42,7% (Dufour *et al.*, 2014), 24,3% (Picoli *et al.*, 2013) e 9,52% (Souto *et al.*, 2010). Já em rebanhos de outros países a frequência de isolados 81,1%, na Bélgica (Supré *et al.*, 2011), 15% nos Estados Unidos da América (Schukken *et al.*, 2009), 42,7% no Canadá (Dufour *et al.*, 2014). A alta prevalência de SCN nos

rebanhos pode estar relacionada com a deficiência na prática da desinfecção dos tetos com pré e pós ordenha (Quirk *et al.*, 2012).

Ao se avaliar a correlação entre a presença dos agentes isolados no presente estudo com os diferentes tratamentos esta foi negativa (-0,031), indicando também que não houve correlação entre estes parâmetros analisados.

Quirk *et al.* (2012) ao avaliarem a eficácia da solução iodada no pós *dipping* para diminuição da incidência de IIM e colonização dos tetos por SCN, foi observado que houve redução de espécies causadoras de infecções intramamárias nos quartos tratados com iodo em comparação ao grupo controle, mas a espécie de *Staphylococcus chromogenes* apresentou baixa sensibilidade ao produto. Os resultados aqui apresentados, ainda que não tenham sido identificadas as espécies de SCN, a ocorrência de tetos infectados foi estatisticamente semelhante ($p > 0,05$) tanto para o produto elaborado com óleo de alecrim-pimenta quanto para o grupo controle em que se utilizou clorexidine no pré-*dipping* e iodo no pós-*dipping*, sendo estes resultados animadores.

A eficácia do produto experimental elaborado com óleo de alecrim-pimenta aqui analisado obteve taxa de novas infecções no valor de 0,41 para *Staphylococcus coagulase negativa* e para *Streptococcus sp.* igual a 0, estando estas de acordo com as recomendações de Cebalos-Martinez *et al.* (2013), em que neste trabalho que foi adotada como valor de 0,5 para definir eficácia do produto.

Ao se avaliar as taxas de novas infecções intramamárias (FIGURA 3) provocadas por SCN e *Streptococcus spp.* observa-se que estas não foram diferentes a 5% ($p = 0,8884$), pois este valor foi menor que o valor de PROB (0,9711). Ou seja, a utilização dos tratamentos convencional e alternativo não interferiu na ocorrência de novas infecções para os micro-organismos em estudo.

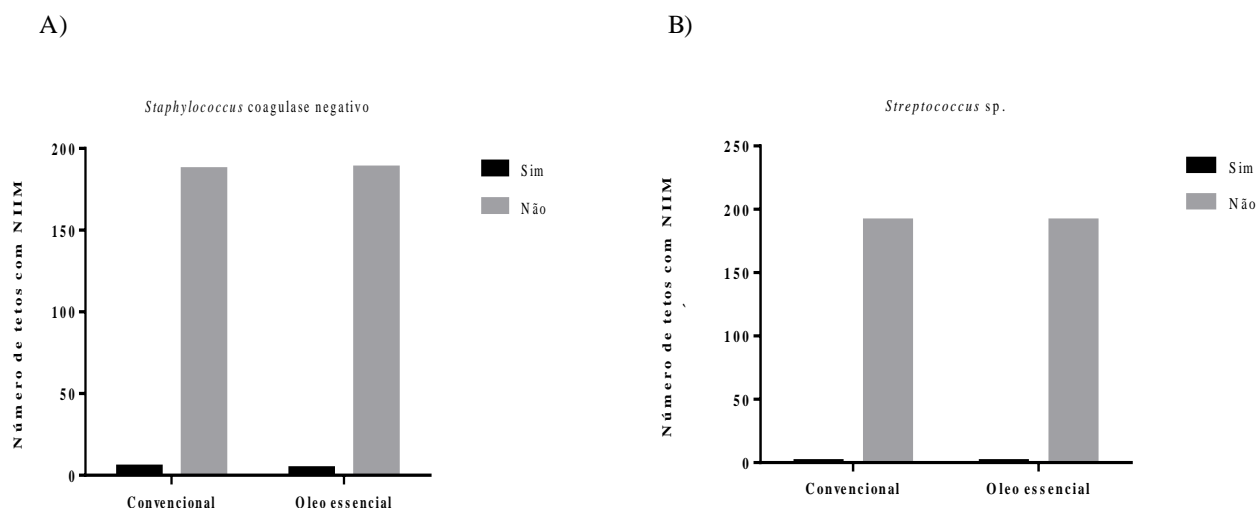


FIGURA 3 - Número de tetos com novas infecções intramamárias por *Staphylococcus* coagulase negativa (A) e com *Streptococcus* spp. (B) observadas em tetos tratados com produto convencional e produto elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta.

Fonte: da autora.

Para *Staphylococcus* coagulase negativa (A) e com *Streptococcus* sp. (B) não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quanto ao número de novas infecções nos dois tratamentos. Ao se avaliar a margem de não inferioridade denominada (d), sendo este de 50% (NMC, 2013), observa-se que a eficácia do produto experimental não é inferior ao convencional (Ceballos-Martinez *et al.*, 2013), visto que esta foi de 0,41 para *Staphylococcus* coagulase negativa e 0 para *Streptococcus* sp. sendo portanto menor que o definido para este trabalho.

Os dados aqui obtidos são importantes, ao se avaliar os resultados com uso de produtos convencionais que apresentaram resultados semelhantes à literatura apresentam dados variáveis quanto a eficácia de produtos utilizados para pré-*dipping* e pós-*dipping* com produtos à base de clorexidine (Medeiros *et al.*, 2009; Pedrini, Margatho, 2003 e Ramalho *et al.*, 2012), e iodo (Boddie *et al.*, 1997; Jones, 1998; Pedrini, Margatho, 2003 e Quirk *et al.*, 2012), mas nenhum trabalho publicado até então

avaliou a eficácia de óleo essencial de alecrim-pimenta em produto para higienização dos tetos.

Existe uma preocupação quanto à presença de resíduos de iodo no leite e acúmulo deste nos tecidos dos animais (Castro *et al.*, 2010 e Schone *et al.*, 2009), além da crescente resistência dos micro-organismos aos produtos convencionais (Medeiros *et al.*, 2009).

Assim, extratos vegetais na sanitização de equipamentos e instalações, tratamento e controle de enfermidades dos animais de produção têm sido autorizados por meio da Instrução Normativa Nº64 de 18 de setembro de 2008 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA (BRASIL, 2008).

Os resultados de eficácia do produto teste têm respaldo em testes *in vitro* que apresentam bons índices de atividade inibitória e bacteriostática do óleo essencial de alecrim -pimenta (Almeida *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2005 e Queiroz *et al.*, 2014) e de toxicidade aguda e crônica em que a dose de óleo de alecrim-pimenta utilizado para elaboração do produto foi de 120 ul/ml não promoveu toxicidade em ratos (Andrade *et al.*, 2014).

CONCLUSÃO

O produto experimental à base de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) frente aos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa e *Streptococcus* pp. de amostras de leite demonstraram efeito semelhante ao produto convencional, com isso validando a teoria de que esse produto pode vir a tornar-se uma alternativa eficiente aos convencionais no manejo de ordenha.

REFERÊNCIAS

- AAMER, A.A.; ABDUL-HAFEEZ, M. M. e SAYED, S.M. Minimum Inhibitory and Bactericidal concentrations (MIC and MBC) of honey and bee propolis against Multi-Drug Resistant (MDR) *Staphylococcus* sp. isolated from bovine clinical mastitis. **Alternative & Integrative Medicine**, 3(171), 2014. Disponível em: <<http://esciencecentral.org/journals/minimum-inhibitory-and-bactericidal-concentrations-mic-2327-5162-3-171.pdf>>. Acessado em: 25 abr. 2015.
- ALMEIDA, A. C. *et al.* Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural**, 40(1):200-204, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010000100034>. Acessado em: 5 jun. 2016.
- ANDRADE, V.A. *et al.* Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34(12):1153-1161, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2014001200002>. Acessado em: 14 jun. 2015.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos. Projeto “Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde”**. Termo de cooperação nº37, 2006.
- BADKE, M.R. *et al.* Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto Contexto Enfermagem**, 21(2):363-370, 2012. Disponível em: <<http://www.index-f.com/textocontexto/2012pdf/21-363.pdf>>. Acessado em: 16 ago. 2016.
- BODDIE R.L., NICKERSON S.C. e ADKINSON R.W. Efficacies of teat germicides containing 0.5% chlorhexidine and 1% iodine during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Dairy Science**, 80:2809-2814, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9406072>>. Acessado em: 13 nov. 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Legislação relacionada aos produtos de uso veterinário**. Secretaria de Defesa Agropecuária - Brasília: MAPA/ACS, 401p., 2012.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº64, de 18 de dezembro de 2008. Aprova Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal**. Diário Oficial da União de 19 de Dezembro de 2008, Seção 1, Página 21, Brasília, DF, 2008.
- BRITO, M. A. V. P. *et al.* Esquema simplificado para identificação de Estafilococos coagulase positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**, 32(1):79-82, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782002000100014>. Acessado em: 12 abr. 2015.

- CASTRO, C. E. *et al.* Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, (13): 293-297, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722011000300007>. Acessado em: 10 jun. 2016.
- CASTRO, B. S. I. *et al.* Iodine Concentration in milk sampled from canadian farms. **Journal of Food Protection**,73(9): 658-1663, 2010. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828472>>. Acessado em: 20 nov. 2015.
- CEBALLOS-MARTINEZ, A. *et al.* Noninferiority trial on the efficacy of premilking teat disinfectant against naturally occurring new intramammary infections using a novel 2-step diagnostic process. **Journal of Dairy Science**,96(12),2013. Disponível em: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(13\)00726-1/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(13)00726-1/abstract)>. Acessado em: 10 jun. 2015.
- COSTA, J. P. R. *et al.*Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e o extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. **Biotemas**, (24):1-6, 2011. Disponível em:<<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2011v24n4p1>>. Acessado em: 20 nov. 2015.
- DE VliegHER, S.H. *et al.* Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of disease, potencial impact, prevention and control. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.3, p.1025-1040, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365187>>. Acessado em: 12 nov. 2015.
- DUFOOUR,S. *et al.* Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.563-579, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257026>>. Acessado em: 20 out.2015.
- GRAPHPAD PRISM SOFTWARE. Versão 5, 2011. Disponível em: <<http://www.graphpad.com>>.
- INNINGS, A. *et al.* Identification of 43 *Streptococcus* species by pyrosequencing analysis of the *rnpB* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.5983-5991, 2005. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/43/12/5983.full>> . Acessado em: 14 nov. 2015.
- JONES,G.M.. Milking practices recommended to assure milk quality and prevent mastitis. **Dairy Science**, p.404-227, 1998. Disponível em:<<http://www.thedairysite.com/articles/714/milking-practices-recommended-to-assure-milk-quality-and-prevent-mastitis/>> . Acessado em: 20 nov. 2015.
- LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,33(5):620-626, 2013. Disponível em: <

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000500012 >. Acessado em: 16 nov. 2015.

- LORENZI, H. e MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 512 p, 2002.
- MARTINS, E. R. *et al.* **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 220 p, 2002.
- MEDEIROS, E.S.S. *et al.* Avaliação in vitro da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(1):71-75, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000100011>. Acessado em: 12 nov. 2015.
- MEIN, G. A. *et al.* Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors. **National Mastitis Council**, p. 347-351, 2001. Disponível em: < <http://www.nmconline.org/articles/teatcond1.pdf>>. Acessado em: 12 out. 2015.
- MELLO,P.L. *et al.* Prevalência da mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região Sudoeste do Paraná. **Veterinária e Zootecnia**,19(4):513-521, 2012. Disponível em:< <http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/545>>. Acessado em: 12 nov. 2015.
- MIGUEL, P.R.R. *et al.* Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e susceptibilidade a agentes antimicrobianos. **Semina: Ciências Agrárias**, 33(1):403-416, 2012. Disponível em: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/6821>>. Acessado em: 12 nov. 2015.
- MOTA, R. A. *et al.* Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). **Ciência Animal Brasileira**, 13(1): 124-130, 2012. Disponível em:< <http://revistas.bvs-vet.org.br/cab/article/viewFile/6426/6186>>. Acessado em: 20 nov. 2015.
- NICKERSON, S.C. Choosing the best teat dip for mastitis control and milk quality NMC-PDPW. **Milk Quality Conference Proceedings**, p.43, 2001. Disponível em: < <http://www.nmconline.org/articles/teatdip.pdf>>. Acessado em: nov 2015.
- NMC. Summary of peer-reviewed publications on efficacy of premilking and postmilking teat disinfectants published since 1980 (Revised 2014). Pages 52-86; **Journal of Dairy Science** 1984;67:1336-1353). The National Mastitis Council, Madison, WI. 14., 2013.
- NUNES,R.S. *et al.* Padronização da matéria-prima vegetal e determinação da atividade antimicrobiana do extrato bruto da *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) frente ao *Streptococcus mutans*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, 82(2):80-83, 2005. Disponível em:<

http://www.rbfarma.org.br/files/pag_80a83_Padronizacao.pdf>. Acessado em: 20 nov. 2015.

- OLIVEIRA, C.M. *et al.* Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 31(2):104-110, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v31n2/02.pdf>. Acessado em: out. 2015.
- PARADIS, M.E. *et al.* Effect of nonclinical *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative staphylococci intramammary infection during the first month of lactation on somatic cell count and milk yield in heifers. **Journal of Dairy Science**, 93(7):2989-2997, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20630215>>. Acessado em: 12 nov. 2015.
- PATE, M. *et al.* Coagulase-negative staphylococci from non-mastitic bovine mammary gland: characterization of *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus haemolyticus* by antibiotic susceptibility testing and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Dairy Research**, 79(2):129-134, 2012. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=8539989>>. Acessado em: 20 nov. 2015.
- PEDRINI, S.C.B. e MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivo do Instituto Biológico**, 70(4):391-395, 2003. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V70_4/pedrini.pdf>. Acessado em 06 jun. 2015.
- PICOLI, T. *et al.* Taxa de novas infecções intramamárias em vacas leiteiras, ligadas a precipitação pluviométrica. **Science and Animal Health**, 1(1):11-23, 2013. Disponível em: <<https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/veterinaria/article/view/2116>>. Acessado em: 12 nov. 2015.
- PIESSENS, V. *et al.* Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative *Staphylococcus* species causing bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, 155(1):62-71, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889271>>. Acessado em: 16 jun. 2016.
- PITKALA, A. *et al.* Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, 87(8):2433-2441, 2004. Disponível em: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(04\)73366-4/references](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(04)73366-4/references)>. Acessado em; 15 nov. 2015.
- QUEIROZ, M. R. A. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia organoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 16(3):737-743,

2014. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n3s1/14.pdf> >. Acessado em: 20 nov. 2015.

QUINN, P.J. *et al.* **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.**, p.453-460, 2005.

QUIRK, T. *et al.* Intramammary infections and teat canal colonization with coagulase-negative *staphylococcus* after postmilking teat disinfection: Species-specific response. **Journal of Dairy Science**, 95(4):1906-1912, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22459837>>. Acessado em: 20 out. 2015.

RAMALHO, A. C. *et al.* Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(12):1285-1288, 2012. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012001200012>. Acessado em: 20 out. 2015.

RENEAU, J. K. *et al.* Association between hygiene scores and somatic cell scores in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 227(8):1297-1301, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16266020> >. Acessado em: 12 ago. 2015.

REYHER, K. K. e DOHOO, I. R. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, 94(7):3387-3396, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700024>>. Acessado em: 20 abr. 2015.

ROCHA, B.; MENDONÇA, D. e RIBEIRO, J.N. Trends in antibacterial resistance of major bovine mastitis pathogens in Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, (109):591-592, 2014. Disponível em: < http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12_2014/79-88.pdf>. Acessado em: 25 de ab. 2015.

SAMPIMON, O.C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated from bovine milk samples. **Veterinary Microbiology**, 150:173-179, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21333468>>. Acessado em 8 nov. 2015.

SANTOS, L.L. *et al.* Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus* coagulase-negativa. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 70(1):1-7, 2011. Disponível em: < <http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/5882>>. Acessado em: 12 nov. 2015.

SCHONE, S. *et al.* Iodine concentration of milk in a dose-response study with dairy cows and implications for consumer iodine intake. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 23(2):84-92, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19398055> >. Acessado em: 18 nov. 2015.

- SCHUKKEN, Y. H.; RAUCH, B. J. e MORELLI, J. Defining standardized protocols for determining the efficacy of a post milking teat disinfectant following experimental exposure of teats to mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, 96:2694–2704, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23415529>>. Acessado em: 10 abr. 2015.
- SCHUKKEN, Y. H. *et al.* CNS mastitis: Nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, 34(1-2):9-14,2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18842362> >. Acessado em: 12 nov. 2015.
- SILVA, V.A. *et al.* Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**,12(4):452-455, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722010000400008>. Acessado em: 20 jun. 2016.
- SIMÕES, T.V.M.D. *et al.* **Identificação laboratorial de *Staphylococcus aureus* em leite bovino**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 11p., 2013. Disponível em:< http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2013/doc_180.pdf>. Acessado em 12 abr. 2015.
- SIQUEIRA, V. M. *et al.* Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**,(53):89–95, 2011. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13199-011-0113-7> >. Acessado em: 06 jun.2015.
- SOUTO, L.I.M. *et al.* Correlation between mastitis occurrence and the count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media. **The Journal of Dairy Research**,77:63-70, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19939321>>. Acessado em:10 nov. 2015.
- SUPRÉ, K. *et al.* Some coagulase-negative *Staphylococcus* species after udder health more than others. **Journal of Dairy Science**, 94(5):2329-2340, 2011. Disponível em: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(11\)00208-6/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(11)00208-6/abstract). Acessado em: 10 nov. 2015.
- ZANETTE, E.; SCAPIN, D. e ROSSII, E. M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc e Ciência – ACBS**, 1(1):65-70, 2010. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/277114209_Suscetibilidade_antimicrobiana_de_Staphylococcus_aureus_isolados_de_amostras_de_leite_de_bovinos_com_suspeita_de_mastite>. Acessado em: 15 out. 2015.

4.2- ARTIGO 2- Perfil de sensibilidade de isolados bacterianos da pele de tetos e de leite bovino a um produto experimental elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*)

Este artigo foi elaborado conforme as normas da revista Ciencia & Agrotecnologia da UFLA.

Perfil de sensibilidade de isolados bacterianos da pele de tetos e leite bovino a um produto experimental elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*)

Resumo: O uso indiscriminado de antissépticos e desinfetantes comerciais na rotina de ordenha acarreta em resistência bacteriana, assim, estudos com plantas medicinais têm se tornado objeto de pesquisa devido a sua composição bactericida. Objetivou-se nessa pesquisa determinar o perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase negativo dos tetos e leite de bovino frente a um produto experimental (PEX) elaborado com de óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) e a antimicrobianos convencionais. O óleo essencial da planta possui timol e carvacrol como constituintes principais, responsáveis pelas propriedades antisséptica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, larvicida e muito testados quanto ao potencial dos princípios bioativos. Foram analisados 11 isolados de *Staphylococcus aureus*, 33 de *Staphylococcus* coagulase negativo de tetos bovinos e 26 *Staphylococcus* coagulase negativo e 19 de *Streptococcus* spp. isolados de leite bovino. Foi observada alta resistência das bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. à oxacilina, penicilina, tetraciclina e eritromicina, sendo confirmado com a avaliação do índice de multirresistência aos antibióticos (MAR). A alta frequência de multirresistência pode ser explicada pelos *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e *Staphylococcus* coagulase negativo metilina resistentes (MRCoNS) apresentarem resistência a diversos tipos de antimicrobianos, o que dificulta na melhor escolha de antimicrobiano no tratamento de animais. O produto experimental elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta frente aos isolados mostrou sensibilidade, sendo promissor na profilaxia e tratamento de animais de produção.

Index-terms: antibioticoterapia, assepsia de tetos, produto alternativo, tratamento alternativo, vacas leiteiras.

INTRODUÇÃO

Produtos antimicrobianos e antissépticos são amplamente utilizados na produção animal com objetivo de profilaxia, controle e tratamento de enfermidades, visando melhores índices de produtividade nos rebanhos. Destaca-se o uso destes fármacos na pecuária leiteira como antisséptico dos tetos no manejo de ordenha e ou como tratamento de mastite bovina (Martin, 2011).

O uso inadequado de antibióticos e o não cumprimento do período de carência dos antimicrobianos desrespeitando indicações da bula ocasiona menor tempo de retenção na glândula mamária deixando resíduos da droga no leite (Pacheco-Silva; Souza e Caldas, 2014) o que tem causado problemas na saúde pública devido a multirresistência à antimicrobianos (Nascimento; Maestro e Campos, 2011).

Culturas microbiológicas e testes de susceptibilidade aos antibióticos são recomendados na redução do impacto da resistência microbiana, frequência de mutação de genes e seleção microbiana, isso para que ocorra menor influência de fatores na escolha do agente antimicrobiano a ser administrado no animal (Schwarz *et al.*, 2010).

A utilização de agentes desinfetantes na antisepsia dos tetos tem como propósito diminuir a população microbiana e potencial disseminação de microorganismos no rebanho (Pedrini; Marghato, 2003), sendo o iodo e cloro o mais utilizados (Azizoglu *et al.*, 2013), seguido de clorexidine e hipoclorito de sódio (Coutinho *et al.*, 2012).

Produtos convencionais desinfetantes de tetos utilizados de forma indiscriminada ocasionam resistência bacteriana (Zafalon *et al.*, 2008), deixam resíduos

no leite (Erksine *et al.*, 2003) e trazem consequências para saúde animal e humana (Norouzian e Azizi, 2013). Com isso, alternativas terapêuticas com uso de plantas medicinais e seus compostos bactericidas são objeto de pesquisas.

Entre as pesquisas alternativas, o óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*), que é uma planta de ocorrência em regiões semiáridas é objeto de pesquisa com possibilidade de uso em produção animal. O óleo essencial da planta possui timol e carvacrol como os principais constituintes e estes são responsáveis pelas propriedades antisséptica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e larvicida (Almeida *et al.*, 2010), sendo amplamente testados devido ao potencial dos princípios bioativos (Gomes *et al.*, 2011), com atividade antimicrobiana comprovada frente à bactérias Gram negativas e Gram positivas inclusive na presença de matéria orgânica, leite (Almeida *et al.*, 2016)

Objetivou-se com esta pesquisa determinar o perfil de sensibilidade de isolados bacterianos da pele de tetos e de leite bovino frente ao produto experimental elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) e a antimicrobianos convencionais.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo, analisou-se 11 isolados de *Staphylococcus aureus*, 33 de *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (SCN) isolados dos tetos e 26 *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) e 19 dezoito de *Streptococcus* spp. isolados do leite de bovinos.

Estes isolados foram obtidos em etapa experimental anterior em que se avaliou a eficácia de um produto experimental elaborado com óleo essencial de óleo de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) identificado neste estudo como PEX, na antisepsia dos

tetos de bovinos (Morão, 2015) e que faziam parte de histórico de reinfecção intramamária. Os isolados foram incluídos em dois grupos: PEX isolados de tetos e leite em que se utilizava produto experimental para antissepsia de tetos em pré e pós *dipping* e CONV isolados de tetos e leite em que se utilizava produto convencional à base de clorexidine a 1% (*Hexiderm*[®]) e iodo a 2500 p.p.m (*Ultradip 2500*[®]) no pré e pós *dipping*, respectivamente por um período de 42 dias, em duas ordenhas diárias.

Os isolados foram conservados sob congelamento em glicerol, conforme recomendações da ANVISA (2006). Após ativação das cepas em repiques com caldo BHI e avaliação da pureza, estas amostras foram submetidas ao teste de difusão em ágar seguindo metodologia recomendada por CLSI (2015).

Preparou-se discos de papel filtro estéril, com 6 mm de diâmetro e estes foram impregnados com 10 µl de um produto experimental elaborado com óleo essencial de óleo de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) desenvolvido no laboratório de farmacotécnica da Escola de Farmácia da UFMG, seguindo as recomendações de BRASIL (2007) para antimicrobianos de uso animal e foi o mesmo produto utilizado no grupo citado acima como PEX.

Para serem considerados com atividade antibacteriana positiva frente a um isolado, os halos de inibição de crescimento deveriam ser de 10 mm ou mais de diâmetro, medidos no paquímetro (Trajano *et al.*, 2009). Definiu-se sensibilidade intermediária os halos com diâmetro entre 8 e 9 mm e resistente quando a medida do diâmetro dos halos fosse menor que 8 mm.

Paralelamente, utilizou-se os antimicrobianos convencionais oxacilina 1µg, cefoxitina 30µg, penicilina G 10U, vancomicina 30µg, nitrofurantoína 300µg, tetraciclina 30µg, sulfazotrin 25 µg, clindamicina 2µg, ciprofloxacina 5µg, gentamicina 5µg, eritromicina 15µg. A interpretação dos resultados em relação ao perfil de

sensibilidade aos antimicrobianos testados foi baseada na tabela do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) e recomendações dos fabricantes dos discos com antimicrobianos.

Os testes foram feitos em duplicatas e utilizou-se como controle positivo a cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e água destilada impregnada em disco estéril como controle negativo.

A multirresistência aos antimicrobianos foi avaliada utilizando o índice MAR (Múltipla Resistência a Antibióticos), adotando a recomendação de Kruperman (1983) definindo o MAR a/b em que “a” foi o número de antimicrobianos ao qual o isolado foi resistente e “b” o número de antimicrobianos ao qual o isolado foi exposto, sendo considerado multirresistente quando um isolado apresentou resistência simultânea a duas ou mais drogas.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados no programa R versão 3.1.1. (2012), em que foram comparadas as médias da frequência de sensibilidade, resistência e sensibilidade intermediária de cada grupo de micro-organismo ao produto experimental à base de óleo de alecrim-pimenta e antimicrobianos convencionais, comparando-se o perfil fenotípico entre os isolados de leite e ou tetos em que havia recebido tratamento com produto convencional ou tratamento experimental, avaliando o nível de significância (5%) pelo teste de qui-quadrado (χ^2).

Avaliou-se também a frequência de isolados multirresistentes em cada tratamento e também a associação entre a multirresistência (sim ou não) e o perfil de resistência ao PEX (sim ou não) pelo teste qui-quadrado, e compararam-se as médias dos halos de inibição entre os tratamentos testados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, os isolados *S. aureus* dos tetos apresentaram resistência principalmente à penicilina (100%) seguido da oxacilina (81,81 %) e vancomicina (72,72%). Os SCN dos tetos foram resistentes principalmente à penicilina (100%), oxacilina (87,87%) e cefoxitina (72,72%) e SCN isolados do leite apresentaram resistência à penicilina (38,46%) seguido vancomicina (34,61%) e da oxacilina (30,77%). *Streptococcus* spp. do leite foram resistentes principalmente à Oxacilina (52,63%), seguido de penicilina (42,10%) e seguido de cefoxitina e eritromicina (34,61%) (ANEXO 2).

Na tabela 1 estão apresentados os resultados observados de resistência aos antimicrobianos e ao PEX, comparado os dois grupos em estudo.

Os isolados de *S. aureus* dos tetos higienizados com PEX apresentaram resistência aos antimicrobianos penicilina (100%) e eritromicina (100%) ($p < 0,05$), já para os isolados dos tetos higienizados com CONV apresentaram 100% de resistência aos antimicrobianos oxacilina, cefoxitina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, gentamicina, penicilina e discos com produto experimental com óleo essencial de alecrim-pimenta aos isolado. Sendo que desses antibióticos, a cefoxitina ($p = 0,0026$), tetraciclina ($p = 0,0045$), nitrofurantóina ($p = 0,0015$), gentamicina ($p = 0,0067$) e discos com o produto experimental ($p = 0,001$) apresentaram diferenças significativas nos padrões de resistência, apresentando maiores frequências de resistência observadas nos isolados dos tetos tratados com produto convencional.

Ressalta-se que os isolados dos tetos e do leite foram obtidos de amostras coletadas na mesma época e não houve isolamento de *S. aureus* no leite proveniente dos tetos.

TABELA 2 - Perfil (%) de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase* e *Streptococcus* spp. isolados de tetos e ou de leite bovino à antibióticos convencionais e à produto experimental à base de óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*)

Antibióticos	<i>S.aureus</i> dos tetos			SCN dos tetos			SCN do leite			<i>Streptococcus</i> spp. do leite		
	Resistentes		Valor p	Resistentes		Valor p	Resistentes		Valor p	Resistentes		Valor p
	Frequência (%)			Frequência (%)			Frequência (%)			Frequência (%)		
	PEX	CNV	PEX	CNV	PEX	CNV	PEX	CNV	PEX	CNV		
OXA	75	100	0,39	90	84,61	0,66	36,36	36,36	0,90	45,45	71,2	0,70
CIP	-	-	0,34	-	7,69	0,19	-	-	0,41	-	-	0,26
CFO	12,5	100	0,0026*	70	76,92	0,74	27,27	36,36	0,96	18,18	42,85	0,98
TET	25	100	0,0045*	55	61,53	0,12	18,18	36,36	0,79	18,18	14,28	0,28
NIT	-	66,66	0,0015*	45	30,77	0,56	9,09	9,09	0,67	18,18	28,57	0,42
VAN	62,5	-	0,21	5	61,53	0,95	9,09	72,72	0,019*	18,18	28,57	1
ERI	100	100	1	95	100	0,47	18,18	36,36	0,44	18,18	42,85	0,18
CLI	75	100	0,39	80	100	0,28	36,36	36,36	0,35	18,18	28,57	0,62
GEN	12,5	100	0,0067*	65	76,92	0,18	18,18	36,36	0,93	-	14,28	0,90
PEN	100	100	1	100	100	1	36,36	54,54	0,79	36,36	57,14	0,97
SUT	-	-	1	10	7,69	0,48	-	-	0,29	18,18	-	0,098*
PEX	-	100	0,001*	20	15,38	0,27	9,09	23,07	0,21	-	-	0,63

NOTA: PEX (Produto experimental a base de óleo essencial de alecrim-pimenta), CNV (Produto convencional à base de clorexidina e iodo), OXA (oxacilina 1 µg), CIP (ciprofloxacina 5 µg), CFO (cefotaxima 30 µg), TET (tetraciclina 30 µg), NIT (nitrofurantoína 300 µg), VAN (vancomicina 30 µg), ERI (eritromicina 15 µg), CLI (clindamicina 2 µg), GEN (gentamicina 5 µg), PEN (penicilina G 10U), SUT (sulfazotrina 25 µg) e discos com 10 µl de PEX (Produto experimental à base de óleo essencial de alecrim-pimenta -*Lippia origanoides*). R=resistente, I= sensibilidade intermediária e S=sensível.

*p<0,05 pelo teste de qui-quadrado comparando os dois tratamentos utilizados na antisepsia dos tetos.

Fonte: da autora.

Os isolados de *S.aureus* apresentaram 100% (n=11) de resistência à penicilina nos dois tratamentos, corroborando com Guimarães *et al.* (2012) que encontraram valores semelhantes, porém Costa *et al.* (2013) encontraram 34,09% de resistência a esse antibiótico indicando diferença no padrão de resistência entre rebanhos.

A resistência de *Staphylococcus aureus* á penicilina tem aumentado significativamente, sendo uma das causas o mau uso desses antimicrobianos, bem como tratamentos sem eficácia (Olsen *et al.*, 2006), com isso diminui a taxa de cura, produção de beta-lactamases responsáveis pela resistência ao antibiótico até mesmo a cronicidade da doença vindo o animal a se tornar reservatório do micro-organismo (Barkema *et al.*, 2006).

A resistência de *S. aureus* a oxacilina, aqui observada (TAB. 1) associada à alta frequência de resistência a penicilina são indicativos de cepas MRSA circulando neste rebanho, o que é preocupante, pois os animais podem se tornar cronicamente infectados. Portanto, podendo se transformar em reservatórios de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes, diminuindo a taxa de cura desses animais e dificultando o manejo profilático do rebanho. O maior desafio da atualidade no tratamento da mastite é a multiresistência às drogas, e este fato se tornou um problema de saúde pública. *Staphylococcus aureus* meticilina - resistentes (MRSA) são cepas zoonóticas emergentes e responsáveis por mastite bovina em diversos países (Veh *et al.*, 2015).

Luini *et al.* (2015) isolando amostras de leite, demonstraram que a prevalência de MRSA entre vacas leiteiras ainda é baixo, e também observado por Costa *et al.* (2013) que não encontraram resistência em isolados de *S.aureus* com o antibiótico oxacilina ao estudarem isolados de várias regiões do estado de Minas Gerais. No entanto alguns autores (Haran *et al.*, 2012; Tenhagen *et al.*, 2014; Vanderhaeghen *et al.*, 2010; Van Duijkeren *et al.*, 2014), observaram resistência a meticilina em cepas isoladas de leite mastítico em outros países.

Kumar; Yadav; Singh (2011) em seus estudos relatam que muitos dos isolados de MRSA apresentaram resistência a diversos tipos de antimicrobianos tais como penicilina G, gentamicina, estreptomicina, ampicilina, ciprofloxacina e oxatetraciclina, em que são utilizados com frequência em tratamentos de animais com mastite.

A eficácia de alguns beta-lactâmicos frente a isolados de mastite bovina é bastante limitada (Medeiros *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010; Zanette *et al.*, 2010), podendo ser explicado por estudos realizados por Kim *et al.*,(2012) e comprovaram que o gene *mecC* da PBP_{2a} é instável a 37°C e possui afinidade pelo antibiótico oxacilina, sendo esse gene *mecC* o causador de resistência em todos os antimicrobianos betalactamases utilizados na profilaxia de animais (Monecke *et al.*, 2012).

Animais portadores de micro-organismos multirresistentes tem-se maior dificuldade na utilização de medicamentos com amplo espectro, sendo observado por Waller *et al.* (2011) nos isolados de casos de mastite clínica e subclínica em que 12% das cepas foram resistentes a mais de quatro antimicrobianos testados, mesmo com combinações de antibióticos (Nam *et al.*, 2010).

Nesse estudo, as amostras de *Staphylococcus aureus* dos tetos apresentaram resistência ao antibiótico tetraciclina em 25 % (n=2/11) no PEX e 100% (n=11/11) no CNV, corroborando com Ribeiro *et al.* (2014) e Guimarães *et al.* (2013) que encontraram 33,33% de resistência. Costa *et al.* (2013) avaliando amostras de *S. aureus* encontraram perfil de resistência para tetraciclina em todos os isolados testados, podendo ser explicado pelo uso intensivo e indiscriminado desses compostos na rotina de tratamento para mastite desses animais, sendo esse perfil o mesmo resultado encontrado por Fontana *et al.* (2010). Já Saeki *et al.* (2011) encontraram resistência à tetraciclina de 10,82%, sendo menor que o encontrado nesse estudo.

Das amostras de *S.aureus*, 100% (n=11/11) dos isolados dos tetos foram resistentes para eritromicina no tratamento com produto experimental e convencional. A literatura relata frequência variada de resistência a este antimicrobiano. Enquanto Santiago-Neto *et al.* (2014) em seus estudos encontraram 50,9% de resistência ao avaliar isolados de leite bovino.

Em relação ao comportamento de *S. aureus* frente ao PEX, observou-se 100% (n=11/11) de resistência de isolados no grupo CONV e 100% (n=11/11) de sensibilidade no grupo PEX (TAB. 1) de acordo com os parâmetros definidos neste estudo. Estes resultados devem ser analisados criteriosamente visto que a mesma espécie bacteriana apresentou resultados diferentes ($p<0,001$) e estes isolados foram obtidos em etapa anterior (Morão, 2015) em que este mesmo produto PEX foi eficiente para reduzir a contagem *S. aureus* na pele em $1,12 \text{ UFC.mL}^{-1}$, e foi encontrado resultado semelhante ($p<0,01$) com o produto convencional .

Em etapa anterior Almeida *et al.* (2016), ao avaliar eficácia *in vitro* do óleo de alecrim-pimenta utilizado para elaborar PEX, mostrou-se eficiente como antisséptico apresentando maiores índices de inibição de crescimento de *S. aureus* após 5 min de contato na presença de matéria orgânica, bem como Morão (2015) ao avaliar o PEX na presença da matéria orgânica também observou atividade antisséptica.

Os SCN dos tetos demonstraram resistência à penicilina em 100% (n=33) das amostras analisadas dos tetos dos animais do grupo PEX, já os isolados dos tetos com o produto convencional apresentaram maior frequência de resistência a penicilina (100%, n=33), clindamicina (100%, n=33) e eritromicina (100%, n=33), no entanto não foi observada diferença estatística entre a frequência de resistência observada nos dois grupos.

Entre SCN do leite observou-se a mesma frequência de resistência (n=26) entre os isolados nos dois tratamentos, aos antibióticos oxacilina de 36,36% (n=14/11 PEX e n=4/13 CNV), clindamicina de 36,36% (n=4/11 PEX e n=4/13 CNV) e nitrofurantoina de 9,09%

(n=1/11 PEX e n=1/13 CNV). Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) no perfil de resistência a antimicrobianos, apenas à vancomicina ($p = 0,019$) com 72,72% (n=1/11 PEX e n=8/13 CNV) de isolados resistentes provenientes de tetos higienizados com produto convencional.

Em relação à resistência à vancomicina aqui observada, Melo *et al.*, (2009) relatam que MRSA e *Staphylococcus* coagulase negativo metilina resistentes (MRCoNS) são os micro-organismos com mecanismo de resistência encontrados em alta frequência em seres humanos com infecções hospitalares, mas atualmente tem sido descritas que há fenótipo de resistência também para a vancomicina, mas poucos são os relatos de casos descrevendo isolados de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA), mas para a heterorresistência (hVISA) e resistência intermediária (VISA) houve aumento de ocorrências para essa droga. Em animais estes tipos de resistência não foram ainda descritos.

Os isolados de SCN dos tetos apresentam alta resistência à penicilina com 100% no PEX (n=20/20) e CNV (n=13/13), assim como os isolados de leite em que se observa alta resistência tanto no grupo PEX com 36,36% (n=4/11) quanto no grupo CONV de 54,54% (n=6/13). Santos *et al.*(2011) encontraram resistência em 28% das SCN isolados de leite mastítico nas amostras. Santiago-Neto *et al.* (2014) em seus estudos encontraram 48,8% de resistência, corroborando com esse estudo.

Em relação à oxacilina, nas amostras de SCN foram encontrados 90% (n=18/20) no PEX e 84,61% (n=11/18) no CNV de resistência em isolados de tetos e 36,36 % no PEX (n=4/11) e CNV (n=4/13) para isolados do leite, sendo esses valores maiores do que encontrados por Chagas *et al.* (2012) em que 15,2% das amostras foram resistentes à oxacilina. Fessler *et al.* (2010) demonstram em seus estudos alta resistência de SCN a oxacilina e multirresistência para outros antibióticos., também corroborando com dados aqui obtidos.

Resultados preocupantes são observados com relação à alta resistência de *Staphylococcus* coagulase negativo ao antibiótico oxacilina, pois a literatura descreve estudos em humanos (Mayer; Horner, 2009; Rosa *et al.*, 2009; Riggati *et al.*, 2010; Zurita; Mejia; Guzmán-Blanco; 2010), animais e alimentos.

SCN e seu potencial toxicogênico em alimentos foram avaliados em diversos estudos (Ferreira *et al.*, 2015; Guimaraes *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2011; Veras *et al.*, 2008) com alta prevalência desses micro-organismos, sendo prejudicial tanto na conservação do alimento quanto para possíveis intoxicações alimentares em humanos.

Em animais de produção, como o caso de ovelhas, foi possível observar caso de mastite com presença de SCN e que são resistentes a oxacilina, sendo observado por Della – Libera *et al.* (2010), França *et al.* (2012) e Zafalon *et al.* (2012).

Piessens *et al.* (2012) citam que os SCN estão fortemente envolvidos com a mastite bovina e infecções intramamárias, e em seus estudos foi observado que alguns dos marcadores de virulência desses micro-organismos estão associados com a resistência microbiana, sendo que o gene *mecA* encontrado nesses isolados, 23% foram resistentes para eritromicina e 16% para oxacilina.

Infecções intramamárias e mastite por SCN pode ser considerada ambiental de acordo com Piessens *et al.*, 2011, que analisaram amostras de leite e dos locais que os animais permaneciam. Foi utilizado amplificador de polimorfismo dos fragmentos (ALPF) para identificar o gene dos microorganismos, e foi identificadas espécies do gênero *Staphylococcus* spp, sendo que resultados demonstraram que as espécies do ambiente tiveram a mesma distribuição que as encontradas no leite, sugerindo que o ambiente pode ser possível reservatório dessas bactérias.

Mastites causadas por SCN tem sido frequentemente estudadas, assim Tomazi *et al.* (2015) ao analisar amostras de leite e a produção, observou-se que ocorreu somente aumento

de CCS, mas sem acarretar problemas na produção ou sólidos do leite, mostrando que há interferência desses micro-organismos na qualidade do leite.

A oxacilina é muito utilizada para o diagnóstico laboratorial de resistência a meticilina, portanto qualquer bactéria do gênero *Staphylococcus* sp. que sejam resistentes a oxacilina devem ser consideradas resistentes a todos antimicrobianos beta-lactâmicos (Febler *et al.*, 2010), incluindo aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, entre outros, que são comumente utilizados em animais com mastite (Kumar, Yadav e Singh, 2011).

A frequência de resistência de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. são altas, principalmente por antibióticos inseridos no grupo dos beta-lactâmicos, que possuem mecanismos de defesa contra os princípios ativos dos antibióticos, sendo um deles a produção de enzima extracelular a beta-lactamase que inativa o princípio ativo, e o outro que produz proteína ligante de penicilina com baixa afinidade (Mendonça *et al.*, 2012).

A utilização indiscriminada de antibióticos no controle de mastite faz com que se assemelhem ao que ocorre com os beta-lactâmicos, contribuindo para o aumento da taxa de resistência antimicrobiana de diversos patógenos (Amábile-Cuevas, 2010).

Observou-se que os SCN isolados dos tetos testados 55% (n=11/20) no PEX e 61,53% (n=8/13) no CNV das amostras foram resistentes à tetraciclina. Dos isolados de SCN do leite 36,36% (n=2/11) das amostras foram resistentes ao antibiótico tetraciclina no grupo CONV e grupo PEX 14,28% (n=4/13) de resistência. A elevada resistência ao antibiótico tetraciclina pode ser atribuída à utilização excessiva da droga como medida profilática para a mastite ou pelo desenvolvimento de estirpes resistentes (Soares *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2011) verificaram que 14% das amostras foram resistentes ao mesmo antibiótico frente as SCN do leite. Já Machado *et al.* (2008) encontraram resistência para 38,2% das amostras testadas, e Bansal *et al.*(2015) 18,97% de SCN resistentes à droga.

Em estudos realizados por Santos *et al.* (2011), foi avaliado que a tetraciclina é um antibiótico muito utilizado no tratamento de mastite e vem demonstrando baixa efetividade frente aos SCN, com isso é necessária avaliação do rebanho antes da utilização e recomendação dessa droga para melhor eficiência.

Antibióticos aminoglicosídicos, no caso das tetraciclinas apresentam em seus compostos propriedades que favorecem a diminuição da carga microbiana pelo efeito bactericida, amplo espectro de ação e baixo custo (Ribeiro *et al.*, 2014), mas estudos tem demonstrado baixa efetividade frente aos SCN (Santos *et al.*, 2011), e mesmo com os aspectos relevantes, se utilizado de forma indiscriminada acarreta em resistência pelos micro-organismos deixando resíduos no leite, e com isso ocasionando problemas na saúde pública (Durante-Mangoni *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2014; Speer, Shoemaker e Salyer, 1992).

SCN dos tetos demonstraram resistência a eritromicina de 95% (n=19/20) no grupo PEX e 100% (n=13/13) no grupo CONV. A eritromicina é muito utilizada no tratamento de mastites bovinas ocasionadas por *Staphylococcus* sp. e sua resistência frente à essas bactérias pode ser explicada pela mutação do sítio de atuação que é ativada a saída do antibiótico para fora da célula, assim inativando o antimicrobiano (Dingwell *et al.* 2003).

Em relação perfil de inibição de crescimento de SCN isolados de tetos e de leite pelo produto, a frequência de isolados considerada resistente foi baixa, comparada com *S. aureus* (TAB. 2), sendo semelhante entre isolados dos tetos isolados dos grupos PEX e CONV. Estes resultados também corroboram aos relatados por Morão (2015) que observou redução significativa de SCN na pele dos tetos higienizados com estes dois produtos.

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados dos tetos e do leite é diferente, ainda que tenham sido coletadas no mesmo período. Esta observação possibilita a inferência de que as cepas SCN presentes nos tetos podem não estar tendo acesso ao interior da glândula mamária, corroborando com os achados de Morão (2015), que observaram uma

redução significativa na contagem de SCN da pele dos tetos tratados com este mesmo produto PEX e também reafirmando os dados obtidos neste estudo, e apresentados em outro documento, de que a eficácia do produto experimental elaborado com óleo de alecrim-pimenta foi confirmada quando se obteve taxa de novas infecções no valor de 0,41 para SCN, estando estas de acordo com as recomendações de Cebalos-Martinez *et al.*(2013).

O perfil de resistência de *Streptococcus* spp. foi semelhante ($p>0,05$) entre os isolados obtidos nos dois tratamentos, indicando que fenotipicamente apresentam perfil semelhante. Santiago-Neto *et al.* (2014) encontraram valores de resistência a penicilina de 22,2% para isolados de *Streptococcus* sp. de leite bovino, sendo nesse estudo encontrados valores maiores, sendo 36,36% (n=4/11) para produto experimental e 57,14% (n=4/7) para produto convencional. *Streptococcus* spp. foram resistentes a tetraciclina em 18,18% (n=2/11) no PEX e 14,28% (n=1/7) no CNV, sendo menores que os valores encontrados por Chagas *et al.* (2012) de 58,8% e de 55% (Santiago-Neto *et al.*, 2014).

Os resultados do perfil de resistência aos diferentes antimicrobianos apresentados na Tabela 1 indicam alta resistência dos isolados, sendo esta confirmada com a avaliação do índice de multirresistência aos antibióticos (MAR) apresentados na tabela 2.

Nos isolados provenientes de animais do grupo PEX quanto do CONV observou-se MAR para SCN dos tetos em 90% (n=18/20) e 100% (n=13/13), respectivamente, seguido de *S.aureus* dos tetos 87,5% (n=7/8) e 100% (n=3/3), respectivamente.

O índice de multirresistência a antibióticos, o índice MAR, foram observados nos isolados de *S.aureus* dos tetos no tratamento PEX variou de 0 a 0,63, e no CONV valores de 0 a 0,90, estando estes acima dos descritos por Costa *et al.* (2013) que foi de 0 a 0,26 ao estudarem isolados de rebanhos do estado de Minas Gerais.

TABELA 3 – Índice de multirresistência aos antibióticos (MAR) frente aos isolados de *S.aureus* dos tetos, *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) dos tetos e leite e de *Streptococcus* spp. do leite no tratamento com produto convencional e com produto experimental à base de óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*).

AMOSTRAS	PEX*		MÉDIA MAR	TOTAL PEX	CVN**		MÉDIA MAR	TOTAL CVN	TOTAL
	MAR <2	MAR >2			MAR <2	MAR >2			
<i>S.aureus</i> dos tetos	01 (12,50%)	07 (87,50%)	0,43	08	-	03 (100%)	0,84	03	11
SCN dos tetos	02 (10,00%)	18 (90,00%)	0,58	20	-	13 (100%)	0,63	13	33
SCN do leite	07 (63,63%)	04 (36,36%)	0,18	11	08 (61,54%)	05 (38,46%)	0,27	13	26
<i>Streptococcus</i> spp. do leite	09 (81,81%)	02 (18,18%)	0,17	11	05 (62,50%)	03 (37,50%)	0,25	08	19
TOTAL									89

Nota: *PEX (Produto experimental à base de óleo essencial de alecrim-pimenta); **CNV (Produto convencional à base de clorexidine e iodo).

Fonte: da autora.

Nos SCN dos tetos e do leite, o MAR também foram altos, sendo encontrado índices que variaram de 0 a 0,81. Em *Streptococcus* spp. do leite no produto experimental e produto convencional os valores variaram de 0 a 0,72, respectivamente.

A múltipla resistência dos isolados está relacionada ao uso excessivo de antibióticos e é preocupante visto que a terapia antimicrobiana nesses casos é de difícil execução podendo diminuir as taxas de cura (Costa *et al.*, 2013)

A multirresistência a antibióticos dificulta o tratamento de infecções, sendo assim, a análise antimicrobiana *in vitro* deve ser empregada pelos proprietários rurais para auxiliar a reduzir perdas na produção leiteira e melhorar o programa de controle da mastite (Zanette *et al.*, 2010).

Estes dados reforçam ainda mais a necessidade de obtenção de produtos alternativos para utilização em manejo de ordenha, visando baixa pressão de seleção da microbiota circulante nos rebanhos.

A avaliação dos diâmetros dos halos de inibição de cada grupo de isolados pelo PEX foi semelhante ($p>0,05$) entre os isolados de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* SCN e *Streptococcus* sp foi semelhante à media obtida com inibição de *S. aureus* (TABELA 3).

TABELA 4- Médias dos halos de inibição de crescimento microbiano por ação de produto experimental elaborado com óleo essencial de alecrim -pimenta em teste de difusão em ágar.

Isolados microbianos	Médias de halo de inibição (mm)
<i>Streptococcus</i> sp.	8,64 ^{a*}
<i>S. aureus</i>	7,09 ^{ab}
SCN leite	6,08 ^b
SCN dos tetos	5,75 ^b

*Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.
Fonte: da autora.

No entanto, o diâmetro do halo definido para ser considerado como sensível neste trabalho está de acordo com trabalhos descritos na literatura para *S. aureus* isolados de leite bovino que variou de 8,2 mm do óleo na concentração de 320 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Costa *et al.*, 2011), e para *Staphylococcus* sp. isolados de leite que foi de 10 mm na concentração de 60 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Queiroz *et al.*, 2014).

Pesquisas realizadas com óleo essencial obtidas de outra região apresentaram halos médios entre 25 – 18 mm para cepas de MRSA (BMB9393) (Oliveira *et al.* 2007) . Os mesmos autores encontraram halos de inibição para *Streptococcus mutans* de 20 mm (Andrade *et al.*,2014).

Ainda que os diâmetros dos halos sejam variados, porém em nenhuma destas pesquisas que se utilizou a mesma metodologia de extração e obtenção do óleo, bem como a técnica obteve-se resultados demasiadamente discrepantes, ainda que tivesse usado óleo puro em diferentes concentrações.

A atividade antimicrobiana do PEX foi comprovada, mas comparações com a literatura tornam-se difícil, visto que diferenças de sensibilidade de óleos essenciais descritas está associada também a metodologia adotada incluindo na extração dos compostos ativos, bem como a composição química de um mesmo óleo obtido de plantas diferentes. (Othman *et al.*, 2011, Radulovick *et al.*, 2013).

Não é possível comparar o comportamento dos isolados bacterianos entre antimicrobianos convencionais e óleos essenciais, porém, ao se avaliar uma possível associação em isolados MAR e isolados classificados como resistentes ao PEX, esta não foi observada ($p>0,05$) para nenhum dos grupos de micro-organismos estudados.

O mesmo comportamento foi observado ao se avaliar uma possível associação entre isolados resistentes ao PEX à oxacilina ($p>0,05$) (TABELA 4).

TABELA 5 - Associação entre isolados microbianos de leite e tetos bovinos MAR e resistente a um produto experimental e resistente ao produto experimental e à oxacilina.

Bactéria	FREQUÊNCIA (%)		
	MAR	RESISTENTE AO PEX	RESISTENTE A OXA
<i>S. aureus</i> dos tetos	90,9	72,72	81,81
SCN leite	35,61	66,66	87,87
SCN Tetos	93,9	53,84	30,77
<i>Streptococcus</i> leite	15,78	21,05	52,63

Fonte: da autora.

Estes resultados podem ser indicativos de que o mecanismo que leva a uma maior sensibilidade dos isolados ao PEX pode não ser o mesmo que leva à multirresistência aos antimicrobianos convencionais e nem a Oxacilina, reforçando a possibilidade de uso de óleo de alecrim-pimenta como antisséptico ou antimicrobiana na cadeia leiteira. No entanto, pesquisas para maior conhecimento devem ser executadas.

O mecanismo de ação do óleo essencial de alecrim-pimenta , assim como de outros óleos essenciais sobre bactérias ainda é objeto de estudo, mas alguma similaridade com

mecanismo de ação de antibióticos é descrita, ainda que os resultados de diâmetros de halos de inibição sejam controversos. No entanto, uma gama considerável de micro-organismos apresenta sensibilidade aos óleos (Calo *et al.* 2015; Raut *et al.* 2014).

A ação dos óleos essenciais sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas está em estudo por autores conforme descrito na literatura (Burt *et al.*, 2004, Calo *et al.*, 2015; Raut *et al.*, 2014; Saad *et al.*, 2013). Entre os mecanismos descritos está a interação com os componentes hidrofóbicos da parede celular levando a interações específicas com a membrana bacteriana, a alteração no transporte de íons à desnaturação de proteínas citoplasmáticas e inativação de enzimas celulares conduzindo à morte da célula bacteriana.

Estes resultados são também promissores, considerando que pesquisas atuais já avaliaram a ação moduladora do óleo essencial de alecrim-pimenta sobre bactérias resistentes a antimicrobianos. Barreto *et al.*(2014a), Barreto *et al.* (2014b) e Silva *et al.* (2015) avaliaram a ação moduladora do óleo de alecrim-pimenta sobre isolados de MRSA e concluíram que *L. origanoides* H.B.K. pode ser um importante fonte de fitoquímicos capaz de modificar a resistência fenotípica de bactérias. Barreto *et al.*, (2014a) citam que é possível que a redução a CIM dos MRSA em estudo para os aminoglicósidos na presença do óleo de alecrim-pimenta possa ter ocorrido devido a intercalação de seus componentes lipofílicos na membrana plasmática, que conduz a um aumento na permeabilidade celular para as moléculas de antibióticos, e / ou inibição dos sistemas de efluxo, levando ao aumento da concentração intracelular do fármaco.

Assim a possibilidade de associação de óleos essenciais com antimicrobianos convencionais, também é uma área promissora que demanda mais estudos.

CONCLUSÃO

Conclui-se que os isolados de tetos e de leite bovino foram sensíveis ao produto experimental elaborado com óleo essencial de alecrim-pimenta.

Os isolados apresentam alto índice de multirresistência, incluindo resistência a oxacilina.

Não foi observada associação entre isolados com multirresistência, resistentes a oxacilina e com resistência ao produto experimental.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA A.C. *et al.* Atividade antisséptica do óleo essencial de *Lippia origanoides* (alecrim-pimenta) na presença de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2016. *In press*.

ALMEIDA, A. C. *et al.* Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural**, 40(1):200-204, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010000100034>. Acessado em: 5 jun. 2016

AMÁBILE-CUEVAS, C.F. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. **The journal of Infection in Developing Countries**,4(3):126-131, 2010. Disponível em:<<http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/20351451> >. Acessado em: 22 jun. 2016.

ANDRADE, V.A. *et al.* Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34(12):1153-1161, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2014001200002>. Acessado em: 14 jun. 2016.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet - Relatório 2006-2007 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (5º e 6º anos de atividades)**, 2006. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395364/PAMVET.pdf/4777c371-e5b5-42e0-9c3f-43670009a802>>. Acessado em: 16 jun. 2016.

AZIZOGLU, R. O. *et al.* Bovine *Staphylococcus aureus*: Dose response to iodine and chlorhexidine and effect of iodine challenge on antibiotic susceptibility. **Journal of**

- Dairy**, 96(2):993-999, 2013. Disponível em:<
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261384> >. Acessado em: 20 jun. 2016.
- BANSAL, B.K. Comparative antibiogram of coagulase-negative Staphylococci (CNS) associated with subclinical and clinical mastitis in dairy cows. **Veterinary World**, 8(3): 421-426,2015. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27047108> >. Acessado em: 22 jun. 2016.
- BARKEMA, H.W. *et al.* The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, 89(6): 1877-1895, 2006. Disponível em: <
[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(06\)72256-1/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(06)72256-1/abstract)>. Acessado em: 19 jun. 2016.
- BARRETO, H. M. *et al.* Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia origanoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** , 2014: 1-7, 2014 (a). Disponível em:<
<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/305610/> >. Acessado em: 23. Jun. 2016.
- BARRETO, H. M. *et al.* Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal Integrated Medical** , 6:560-564, 2014 (b). Disponível em:<
https://www.researchgate.net/publication/266674233_Effectof_Lippia_organoides_HBK_essentialoilintheresistanceto_aminoglycosides_inmethicillinresistant_Staphylococcus_aureus >. Acessado em: 23 jun. 2016.
- BRASIL - **Resolução a Diretoria Colegiada nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06, que consta em anexo à presente Resolução.** Disponível em
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a450e9004ba03d47b973bbaf8fde4db/RDC+14_2007.pdf?MOD=AJPERES . Acesso em 20 jun 2016.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, 94(3):223– 253, 2004. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246235> >. Acessado em: 23 jun. 2016.
- CALO J.R., *et al.* Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, 54:111-119, 2015. Disponível em:<
https://www.researchgate.net/publication/272523818_Essential_oils_as_antimicrobials_in_food_systems_-_A_review>. Acessado em: 23 jun. 2016.
- CEBALLOS-MARTINEZ, A. *et al.* Noninferiority trial on the efficacy of premilking teat disinfectant against naturally occurring new intramammary infections using a novel 2-step diagnostic process. **Journal of Dairy Science**,96(12),2013. Disponível em: <
[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(13\)00726-1/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(13)00726-1/abstract)>. Acessado em: 10 jun. 2016

- CHAGAS, L.G.S. *et al.* Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Candida* sp. em uma propriedade rural no município de Indianópolis- Minas Gerais, Brasil. **Journal Bioscience**, 28(6):1007-1014, 2012. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/viewFile/15181/11125>>. Acessado em: 24 jun. 2016.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard**. 4ª edição, 2015. Disponível em: <http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/VET01A4_sample.pdf>. Acessado em: 25 mai. 2015.
- COSTA, G.M. *et al.* Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo do Instituto de Biologia**, 80(3):297-302, 2013. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/aib/v80n3/06.pdf> >. Acessado em: 20 jun. 2016.
- COSTA, J. P. R. *et al.* Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e o extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. **Biotemas**, (24):1-6, 2011. Disponível em:<<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2011v24n4p1>>. Acessado em: 20 jun. 2016.
- COUTINHO, L.C.A. *et al.* Eficácia in vitro de desinfetantes utilizados na antissepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(1):61-65, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000100010>. Acessado em: 06 jun. 2015.
- DELLA LIBERA, A.M.M.P. *et al.* . Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from meat-producing ewes with mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 62(6):1499-1502, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352010000600030>>. Acessado em: 21 jun. 2016.
- DINGWELL, R. *et al.* Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for cure of *Staphylococcus aureus* infection in the dry period. **Journal of Dairy Science**, 86:159-168, 2003. Disponível em:<[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(03\)73596-6/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(03)73596-6/abstract) >. Acessado em: 23 jun. 2016.
- DURANTE-MANGONI, E. *et al.* Do we still need aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**, 33(3):201-205, 2009. Disponível em:<[http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579\(08\)00392-0/abstract](http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579(08)00392-0/abstract) >. Acessado em: 23 jun. 2016.
- ERSKINE, R.J. *et al.* Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**,19(1):109-138, 2003. Disponível em:<

[http://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720\(02\)00067-1/abstract](http://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720(02)00067-1/abstract) >. Acessado em: 15 jun. 2016.

FEBLER, A.T. *et al.* Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 65:1576-1582, 2010. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525989> >. Acessado em: 21 jun. 2016.

FERREIRA, A.A. *et al.* Identificação fenotípica e genotípica de cepas de estafilococos oriundas de uma unidade de abate de aves. **Multi-Science Journal**, 1(2):50-58, 2015. Disponível em:<<https://www.ifgoiano.edu.br/periodicos/index.php/multiscience/article/view/85>>. Acessado em: 22 jun. 2016.

FERREIRA, J.L. *et al.* Bactérias causadoras de mastite subclínica em rebanhos leiteiros no município de Teresina, Piauí. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 8(14), 2010. Disponível em:<http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/PAQVOFKXEDHRX_Vy_2013-6-25-12-35-37.pdf>. Acessado em: 24 jun. 2016.

FESSLER A.T. *et al.* Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 65:1576-1583, 2010. Disponível em:<<http://jac.oxfordjournals.org/content/65/8/1576.full> > Acessado em: 22 jun. 2016.

FONTANA, V.L.D.S. *et al.* Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da beta- lactamase em *Staphylococcus aureus*. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, 17(4):552-559, 2010. Disponível em:<<http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/58> >. Acessado em: 25 jun. 2016.

FRANÇA, C.A. *et al.* Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(8):747-753, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000800012 >. Acessado em: 21 jun. 2016.

GOMES, S. V. F. *et al.* Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, 36(1):64-77, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702011000100005>. Acessado em 20 jun. 2016.

GUIMARÃES, F.F. *et al.* Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, 96(5):2866–2872, 2013. Disponível em:<[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(13\)00169-0/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(13)00169-0/abstract) >. Acessado em: 20 jun. 2016.

HARAN, K.P. *et al.* Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota Dairy Farms. **Journal of Clinical Microbiology**, 50(3):688-695, 2011.

Disponível em: < <http://jcm.asm.org/content/50/3/688.full>>. Acessado em: 20 jun. 2016.

KIM, C. *et al.* Properties of a novel PBP2a protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype. **Journal Biology and Chemistry**, 287(44):36854–36863, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22977239> >. Acessado em: 24 jun. 2016.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic indexing of *Escherichia coli* to identify high risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, 46(1): 165–170, 1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239283/> >. Acessado em: 12 abr. 2015.

KUMAR, R.; YADAV, B.R. e SINGH, R.S. Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle. **Journal of Bioscience**, 36(1):175-188, 2011. Disponível em: < <http://www.ias.ac.in/jbiosci/mar2011/175.pdf>>. Acessado em: 29 abr. 2015.

LUINI, M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: Genotyping of isolates. **Veterinary Microbiology**, 5(178):3-4, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26009302>>. Acessado em: 18 jun. 2015.

MACHADO, T.R.O. *et al.* Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 60(1):278-282, 2008. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352008000100041> . Acessado em: 24 ju. 2016.

MARTIN, J.G.P. Resíduos de antimicrobianos em leite - Uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, 18(2):80-87, 2011. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/publicacoes/san/2011/XVIII_2/docs/residuos-de-antimicrobianos-em-leite-uma-revisao.pdf>. Acessado em: 16 ago. 2016.

MAYER, L.E. e HORNER, R. Evaluation of the prevalence and sensitivity profile of methicillin/oxacillin resistant coagulase negative Staphylococci in the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) and comparison of tests for detection of resistance. **Revista Saúde**, 35(2):62-69, 2009. Disponível em: <<http://periodicos.ufsm.br/revistasauade/article/view/4475/2649>>. Acessado em: 23 jun. 2016.

MEDEIROS, E.S. *et al.* Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(7):569-574, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000700012>. Acessado em: 23 jun. 2016.

MELO, G.B. *et al.* *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos resistentes à vancomicina em um Hospital Universitário Brasileiro. **Revista Ciência e Farmácia**

- Básica Aplicada**, 30(1):55-61, 2009. Disponível em: < http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/905/761>. Acessado em: 24 jun. 2016.
- MENDONÇA, E.C.L. *et al.* Caracterização fenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(9): 859- 864 2012. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000900008>. Acessado em: 21 jun. 2016.
- MONECKE, S., G. *et al.* A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**,6(4):1-24, 2011. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21494333> >. Acessado em: 21 jun. 2016.
- MORÃO, R.P. **Eficácia de novo produto antisséptico com óleo essencial de alecrim-pimenta para uso em tetos bovinos**. Montes Claros: UFMG, 92 f.: il. Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Produção Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, 2015.
- NAN, H.M. *et al.* Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 20(10):1446-1449, 2010. Disponível em: < <http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?year=2010&vol=20&num=10&page=1446>>. Acessado em: 29 mai. 2016.
- NASCIMENTO,G.G.; MAESTRO,V. e CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba – SP. **Revista de Nutrição**, 14(2):119-124, 2001. Disponível em:< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732001000200005 >. Acessado em: 12 jun. 2016.
- NOROUZIAN, M. A. e AZIZI, F. Factors affecting iodine content in dairy cow's milk – a Review. **European Journal of Food Research in Review**,3(2):1-11, 2013. Disponível em:< <http://sciencedomain.org/abstract/8083> >. Acessado em: 16 jun. 2016.
- OLIVEIRA, D.R. *et al.* Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, 101: 236-240, 2007. Disponível em:< ftp://ftp.ufv.br/dbg/Filogenia_molecular/usuarios/karla/Lyderson/2010/artigos/quimica/Oliveira2007.pdf >. Acessado em:20 jun. 2016.
- OLSEN, J.E., CHRISTENSEN, H. e AARESTRUP, F.M. Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 57(3):450-460, 2006. Disponível em:< <http://jac.oxfordjournals.org/content/57/3/450.short>>. Acessado em: 20 jun. 2016.
- OTHMAN , M. *et al.* Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal Microbiology and Methodology**, 84(2):161-166, 2011. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094190> >. Acessado em: 23 jun. 2016.

- PACHECO-SILVA, E.; SOUZA, J.R. e CALDAS, E.D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Revista Química Nova**, 37(1):111-122, 2014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422014000100020>. Acessado em: 20 jun. 2016.
- PARK, J.Y. *et al.* Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, 147:149-154, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20667668>>. Acessado em: 22 jun. 2016.
- PEDRINI, S.C.B. e MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivo Instituto Biológico**, 70(4):391-395, 2003. Disponível em: < http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V70_4/pedrini.pdf>. Acessado em 06 jun. 2015.
- PIESSENS, V. *et al.* Characterization of coagulase-negative *Staphylococcus* species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. **Journal of Dairy Science**, 95(12):7027–7038, 2012. Disponível em: < [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(12\)00691-1/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(12)00691-1/abstract)>. Acessado em: 25 jun. 2016.
- PIESSENS, V. *et al.* Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. **Journal of Dairy Science**, 94(6):2933–2944, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21605763>>. Acessado em: 25 jun. 2016.
- QUEIROZ, M.R.A. *et al.* Assessment of the antibacterial activity of the essential oil of *Lippia origanoides* in relation to *Staphylococcus* sp. isolated from food of animal origin. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 16(3):737-743, 2014. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n3s1/14.pdf> >. Acessado em: 20 jun. 2016.
- R CORE TEAM. A language and environment for estatistical computing. **R Foundation For Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2012. Disponível em: < <https://www.r-project.org/>>.
- RADULOVIĆ, N.S. *et al.* Toxic essential oils. III. Identification and biological activity of new allylmethoxyphenyl esters from a chamomile species (*Anthemis segetalisten*). **Food Chemical Toxicity**, 62:554-565, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055768>>. Acessado em: 23 jun. 2016.
- RAUT J.S. e KARUPPAYIL S.M.. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Production**. 62:250-264, 2014. Disponível em: < <http://www.ufrgs.br/ppgcf/escoladeverao/wp-content/uploads/2016/02/Michele-Rambo.pdf>>. Acessado em: 23 jun. 2016.

- RIGATTI, F. *et al.* Bacteremias por *Staphylococcus* coagulase negativos oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43(6): 686-690, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v43n6/17.pdf>>. Acessado em: 20 jun. 2016.
- RIBEIRO, W.O. *et al.* Counts of microorganisms causing bovine mastitis and study of antimicrobial action. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 69(1):45-52, 2014. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/riict/article/view/305>>. Acessado em: 24 jun. 2016.
- ROSA, J.O. *et al.* Detection of *mecA* gene in oxacillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from the saliva of nursing professional. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 42(4):398-403, 2009. Disponível em: <http://www.producao.usp.br/bitstream/handle/BDPI/3565/art_MOURA_Deteccao_do_gene_mecA_em_estafilococos_coagulase_2009.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acessado em: 22 jun. 2016.
- SAAD N.Y. *et al.* Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour Fragment Journal**, 28(5): 269-279, 2013. Disponível em: <<http://onlineibrary.wiley.com/doi/10.1002/ffj.3165/abstract>>. Acessado em: 23 jun. 2016.
- SAEKI, E.K. *et al.* Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: Sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinária Brasileira**, 5(3):284-290, 2011. Disponível em: <<http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/acta/article/view/2172>>. Acessado em: 24 jun. 2016.
- SANTIAGO-NETO, W. *et al.* Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34(7):613-620, 2014. Disponível em: <<http://www.pvb.com.br/?link=verart&tipo=ID&campo1=1453>>. Acessado em: 24 jun. 2016.
- SANTOS, L.L. *et al.* Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus* coagulase-negativa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 70 (1) :1-7, 2011. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552011000100001&lng=pt>. Acessado em: 22 jun. 2016.
- SCHWARZ, S. *et al.* Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Veterinary Microbiology**, 141(1-2):1-4, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350900604X>>. Acessado em: 20 jun. 2016.
- SILVA, M. C. P. *et al.* Potentiation of antibiotic activity by *Lippia origanoides* H.B.K. in *Staphylococcus aureus*. In: **II Encontro Estratégico de Ciências Farmacêuticas. II Seminário Ibero Americano de P&D de Medicamentos.**, 2015, TERESINA. II ENCONTRO ESTRATÉGICO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS II

SEMINÁRIO IBERO AMERICANO DE P & D DE MEDICAMENTOS. TERESINA: Universidade Federal do Piauí,2:626-627,2015. Disponível em:<>. Acessado em: 23 jun. 2016.

SOARES L.C.*et al.* Antimicrobial resistance and detection of mec and blaZ genes in coagulase- -negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 32(8):692-696, 2012. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000900008>. Acessado em: 23 jun. 2016.

SPEER, B.S.; SHOEMAKER, N.B. e SALYERS, A.A. Bacterial resistance to Tetracycline mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, 5(4):387-399, 1992. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358256/>>. Acessado em: 23 jun. 2016.

TENHAGEN, B.A. *et al.* Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**,89(7):2542-2551, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16772573>>. Acessado em: 23 jun. 2016.

TOMAZI, T.J.L. *et al.* Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. **Journal of Dairy Science**, 98(5):3071-3078, 2015. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25726098>>. Acessado em: 25 jun. 2015.

TRAJANO, V.N. *et al.* Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 29(3):542-545, 2009. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n3/a14v29n3.pdf>>. Acessado em: 18 jun.2016.

VAN DUIJKEREN, E. *et al.* Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying mecA or mecC in dairy cattle. **Veterinary Microbiology**,171(3-4):364–367, 2014. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24495740> >. Acessado em: 23 jun.2016.

VANDERHAEGHEN, W. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. **Veterinary Microbiology**,144(1-2):166–171, 2010. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20092969>>. Acessado em: 23 jun. 2016.

VEH, A.K. *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary-quarter infections during lactation and at dry-off. **Journal of Dairy Science**, 98(1):155-168, 2015. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25468698>>. Acessado em: 18 jun. 2016.

VERAS, J.F. *et al.* A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, 12: 410-415, 2008.

Disponível em: < [http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(07\)00230-5/pdf](http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(07)00230-5/pdf)>. Acessado em: 21 jun. 2016.

WALLER, K.P. *et al.* CNS species and antimicrobial resistance in clinical e subclinical bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**,152: 112-116, 2011. Disponível em: < <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00719073/document>>. Acessado em: 29 mai. 2016.

ZAFALON, L.F. *et al.* Estafilococos resistentes à oxacilina isolados em casos de mastite subclínica em ovinos. **Arquivo do Instituto de Biologia**, 79(1): 1-7,2012. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/aib/v79n1/a01v79n1.pdf> > . Acessado em: 21 jun. 2016.

ZAFALON, L.F. *et al.* Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 67(2):118-125, 2008. Disponível em:< <http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/viewFile/7173/7398> >. Acessado em: 12 jun. 2016.

ZANETTE, E. *et al.* Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc e Ciência – ACBS**,1(1): 65- 70, 2010. Disponível em:< https://www.researchgate.net/publication/277114209_Suscetibilidade_antimicrobiana_de_Staphylococcus_aureus_isolados_de_amostras_de_leite_de_bovinos_com_suspeita_de_mastite >. Acessado em:24 jun. 2016.

ZURITA, J.; MEJIA, C. e GUZMAN-BLANCO, M. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à metilina na América Latina. **Brazilian Journal of Infectology Disease**, 14(2):97-106,2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702010000800005&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 20 Jun. 2016.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 230 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Avaliação da eficácia de um produto antisséptico para tetos de vacas elaborado com óleo essencial de plantas da região do cerrado mineiro", que tem como responsável ANNA CHRISTINA DE ALMEIDA, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 03/03/2015. Este certificado expira-se em 03/03/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 230 / 2014, related to the Project entitled "Evaluating the effectiveness of a teat disinfectant prepared with essential oil plants from the savannahs regions of Minas Gerais", under the supervision of ANNA CHRISTINA DE ALMEIDA, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 03/03/2015. This certificate expires in 03/03/2020.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 03/03/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 2

TABELA 1 – Frequência (%) de amostras que apresentaram resistência, sensibilidade e sensibilidade intermediária de isolados de *S.aureus* e SCN dos tetos, *Streptococcus* spp. e SCN do leite de vacas

Antimicrobianos	<i>S.aureus</i> do teto			SCN tetos			SCN leite			<i>Streptococcus</i> spp. leite		
	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I
OXA	81,81	18,18	0	87,87	12,12	0	30,77	61,53	0	52,63	42,10	0
CIP	0	90,90	9,09	3,03	87,87	9,09	0	73,07	19,23	0	84,21	10,52
CFO	36,36	63,63	0	72,72	24,24	3,03	26,92	65,38	0	26,31	68,42	0
TET	45,45	54,54	0	57,57	33,33	9,09	23,07	61,53	7,69	15,78	73,68	5,26
NIT	18,18	72,72	0	39,39	45,45	15,15	7,69	76,92	7,69	21,05	63,15	10,52
VAN	72,72	27,27	0	57,57	42,42	0	34,61	53,84	3,84	21,05	73,68	0
ERI	100	0	0	96,96	0	3,03	23,07	42,30	26,92	26,31	63,15	5,26
CLI	81,81	18,18	0	87,87	6,06	6,06	30,77	46,15	15,38	21,05	73,68	0
GEN	36,36	54,54	9,09	69,69	27,27	3,03	23,07	65,38	3,84	5,26	21,05	15,78
PEN	100	0	0	100	0	0	38,46	53,84	0	42,10	52,63	0
SUT	0	100	0	9,09	84,84	6,06	0	88,46	3,84	10,52	78,94	5,26
PEX	72,72	0	27,27	66,66	3,03	10	53,84	0	38,46	21,05	31,57	42,10
		n=11			n=33			n=26			n=19	