



SILVIA PERINI

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS FRENTE A *Staphylococcus aureus* E
Streptococcus agalactiae ISOLADOS DE MASTITE
BOVINA**

**LAVRAS-MG
2013**

SILVIA PERINI

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE A
Staphylococcus aureus E *Streptococcus agalactiae* ISOLADOS DE
MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Geraldo Márcio da Costa

Coorientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS – MG
2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Perini, Silvia.

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a
Staphylococcus aureus e *Streptococcus agalactiae* isolados de
mastite bovina / Silvia Perini. – Lavras: UFLA, 2013.
70 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.
Orientador: Geraldo Márcio da Costa.
Bibliografia.

1. Mamite bovina – Antibacteriano. 2. Compostos naturais. 3.
CIM. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.0895321

SILVIA PERINI

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE A
Staphylococcus aureus E *Streptococcus agalactiae* ISOLADOS DE
MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de setembro de 2013.

Dra. Carolina Valeriano UFLA

Dr. Marcos Rodrigues de Mattos UFLA

Dra. Gláucia Frasnelli Mian UFLA

Dr. Geraldo Márcio da Costa
Orientador

**LAVRAS – MG
2013**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força para alcançar mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Ivan e Léia e à minha filha, Laura, por sempre me incentivar a ser uma pessoa melhor.

Ao professor Geraldo Márcio da Costa, pela orientação, paciência e confiança durante todo este trabalho.

À professora Roberta Hilsdorf Piccoli, pela coorientação e auxílio durante este trabalho.

À minha irmã e amiga Renata, por sempre me ajudar nas horas difíceis e a vencer os desafios.

Ao meu namorado, Marco Túlio, que sempre esteve ao meu lado, me amparando e incentivando a superar as dificuldades.

A Kelly que, em todas as fases da minha vida, esteve presente com uma palavra de conforto.

Ao meu querido amigo Bruno, pela amizade e ajuda durante todo este período e pelos momentos maravilhosos de descontração.

A minha grande amiga Milene, pela amizade sincera, ajuda e ensinamentos durante essa jornada.

A Karol, pela simpatia desde o primeiro momento que entrei no laboratório e pela grande ajuda durante o experimento.

A Dircéia, técnica do laboratório, pelo carinho e disponibilidade durante todo esse processo.

A Maíra e Danilo, pelo auxílio no início deste trabalho.

Ao Fábio e ao professor Cleiton, pela ajuda e disponibilidade nas análises estatísticas.

A todos os colegas do laboratório de bacteriologia, no Departamento de Medicina Veterinária, pela cumplicidade, alegria e auxílio durante essa caminhada.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade de realizar este curso. E a todos que acreditaram e torceram pela realização deste sonho.

***Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos que
as grandes proezas da história foram conquistas daquilo que parecia
impossível.***

Charles Chaplin

RESUMO

Os tratamentos para mastites baseados na antibioticoterapia nem sempre são efetivos, podendo levar à seleção de bactérias resistentes e à presença de resíduos no leite. Nesse contexto, o uso de compostos derivados de plantas configura-se como alternativa para o controle da mastite em vacas leiteiras. Este estudo foi realizado com o objetivo de determinar, por meio do método de microdiluição em caldo, a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de *Salvia sclarea*, *Eugenia caryophyllata*, *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon winterianus*, *Elettaria cardamomun*, *Cymbopogon flexuosos*, *Rosmarinus officinalis* e *Cinnamomum cassia* para isolados de *S. aureus* e *S. agalactiae* associados a casos clínicos e subclínicos de mastite. Para isolados de *S. aureus*, observou-se que o óleo essencial de *C. cassia* foi o de maior eficiência, apresentando CIM de 0,03906%, seguido dos óleos de *T. vulgaris* e *C. flexuosos* (0,15625%) e *E. caryophyllata* e *C. winterianus* (0,3125%). Os óleos essenciais de *R. officinalis*, *E. cardamomun* e *S. sclarea* não revelaram atividade antimicrobiana significativa, apresentando CIMs iguais ou superiores a 2,5%. Para isolados de *S. agalactiae*, o óleo essencial mais efetivo também foi o óleo de *C. cassia*, cujo CIM foi de 0,01953%, seguido dos óleos de *E. caryophyllata* (0,078125%), *C. flexuosos* e *T. vulgaris* (0,15625%), e *C. winterianus* e *E. cardamomun* (0,625%). Já os óleos de *S. sclarea* (1,25%) e de *R. officinalis* (CIM $\geq$ 2,5%) não apresentaram atividade antibacteriana significativa. Foram realizadas combinações entre os óleos essenciais de *C. cassia*, *C. flexuosos* e *E. caryophyllata*, observando-se sinergismo em todas as combinações ensaiadas, principalmente aquelas envolvendo o óleo essencial de *C. cassia*. Os resultados obtidos apontaram a perspectiva de utilização de óleos essenciais no controle das infecções intramamárias ocasionadas por *S. aureus* e *S. agalactiae*, em bovinos.

Palavras-chave: Mastite. CIM. Antibacteriano. Compostos naturais.

ABSTRACT

Treatments for mastitis based on antibiotic therapy are not always effective which may lead to selection of resistant bacteria and the presence of residues in milk. In this context the use of compounds derived from plants configures as an alternative to control mastitis in dairy cows. The objective of this study was to determine, by the method of broth micro dilution, the minimum inhibitory concentration (MIC) of essential oils of *Salvia sclarea*, *Eugenia caryophyllata*, *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon winterianus*, *Elettaria cardamomun*, *Cymbopogon flexuosos*, *Rosmarinus officinalis* and *Cinnamomum cassia* for isolates of *S. aureus* and *S. agalactiae* associated with clinical and subclinical mastitis. For the isolates of *S. aureus*, was observed that the essential oil of *C. cassia* presented the highest efficiency with a MIC of 0,03906%, followed by the oils of *T. vulgaris* and *C. flexuosos* (0,15625%) and *E. caryophyllata* e *C. winterianus* (0,3125%). The essential oils of *R. officinalis*, *E. cardamomun* and *S. sclarea* showed no antimicrobial activity presenting MIC's equal or higher to 2,5%. For isolates of *S. agalactiae*, the oil of *C. salvia* was also the most effective, presenting a MIC of 0,01953%, followed by the oils of *E. caryophyllata* (0,078125%), *C. flexuosos* and *T. vulgaris* (0,15625%), and *C. winterianus* and *E. cardamomun* (0,625%). The oils of *S. sclarea* (1,25%) and *R. officinalis* didn't show significant antibacterial activity (CIM $\geq$ 2,5%). Combinations were made among the essential oils of *C. cassia*, *C. flexuosos* and *E. caryophyllata*, observing synergism in all combinations tested, especially those involving the essential oil of *C. cassia*. The results indicated the prospect of using essential oils to control bovine intramammary infections caused by *S. aureus* and *S. agalactiae*.

Key words: Mastitis. MIC. Antibacterial. Natural compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários.....	18
Figura 2	Locais ou mecanismos de ação esquemático de óleos essenciais na célula bacteriana.....	20
Figura 3	Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada óleo (box-plot) sobre <i>S. aureus</i> isolados de mastite clínica e subclínica.....	39
Figura 4	Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada óleo (box-plot) sobre <i>S.aureus</i> isolados de mastite clínica.....	40
Figura 5	Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada óleo (box-plot) sobre <i>S. aureus</i> isolados de mastite subclínica.....	41
Figura 6	Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada óleo (box-plot) sobre <i>S. agalactiae</i> isolados de mastite clínica e subclínica.....	42
Figura 7	Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada óleo (box-plot) sobre <i>S. agalactiae</i> isolados de mastite clínica.....	44
Figura 8	Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada óleo (box-plot) sobre <i>S. agalactiae</i> isolados de mastite subclínica.....	45
Figura 9	Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada combinação de óleos essenciais (box-plot) sobre <i>S. aureus</i> isolados de mastite clínica e subclínica.....	52
Figura 10	Concentração inibitória mínima (MIC) observada para cada combinação de óleos essenciais (box-plot) sobre <i>S. agalactiae</i> isolados de mastite clínica e subclínica.....	53
Figura 11	Análises de componentes principais (PCA) das combinações dos óleos essenciais de Canela-cássia (CC), Cravo botão (CB) e Capim-limão (CL) sobre <i>S. aureus</i> isolados de mastite clínica e subclínica.....	54
Figura 12	Análises de componentes principais (PCA) das combinações dos óleos essenciais de Canela-cássia (CC), Cravo botão (CB) e Capim-limão (CL) sobre <i>S.agalactiae</i> isolados de mastite clínica e subclínica.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação dos componentes principais presentes nos óleos essenciais em estudo.....	33
Tabela 2	Concentrações de óleos essenciais utilizadas por diluição na microplaca de poliestireno.....	35
Tabela 3	Volumes de cada óleo essencial e DMSO utilizados nos ensaios de diluições seriadas para avaliação de sinergismo/antagonismo.....	36
Tabela 4	Valores das distribuições das CIMs para <i>S. aureus</i> e <i>S. agalactiae</i> isolados de mastite clínica e subclínica obtidos a partir da combinação dos óleos essenciais de Cravo botão, Canela cássia e Capim-limão.....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Mastite Bovina.....	13
2.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	14
2.2	Óleos Essenciais.....	16
2.2.1	Atividade antibacteriana dos óleos essenciais.....	19
2.2.2	<i>Sálvia sclarea</i>	21
2.2.3	<i>Eugenia Caryophyllata</i>	22
2.2.4	<i>Thymus vulgaris</i> L.....	23
2.2.5	<i>Cymbopogon winterianus</i>	24
2.2.6	<i>Elettaria cardamomum</i>	25
2.2.7	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	26
2.2.8	<i>Rosmarinus officinalis</i> Linn.....	27
2.2.9	<i>Cinnamomum cassia</i>	28
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivos gerais.....	30
3.2	Objetivos específicos.....	30
4	JUSTIFICATIVA.....	31
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1	Local de execução do experimento.....	32
5.2	Óleos essenciais.....	32
5.3	Bactérias utilizadas.....	33
5.4	Preparo dos inóculos.....	34
5.5	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	34
5.6	Observação dos resultados.....	36
5.7	Controle de qualidade e validação dos testes.....	36
5.8	Análises estatísticas.....	37
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
6.1	Concentração inibitória mínima dos óleos essenciais isolados.....	38
6.2	Concentração inibitória mínima para combinação entre óleos essenciais.....	50
7	CONCLUSÕES.....	58
8	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a principal causa de perdas econômicas na produção leiteira no mundo, sendo estas estimadas em, aproximadamente, 35 bilhões de dólares (BENEDETTE et al., 2008). Entende-se por mastite bovina os processos inflamatórios de cunho infeccioso, causados, principalmente, por *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., sendo o primeiro o maior agente causador, prevalecendo em casos de manifestações clínicas e subclínicas.

Os tratamentos mais comuns são baseados na infusão intramamária de agentes antimicrobianos, mas as taxas de cura com estas drogas não são sempre efetivas, verificando-se grandes variações na eficiência do tratamento para os diferentes agentes causadores de mastite. Além disso, a utilização de antibióticos pode levar à seleção de bactérias resistentes e à presença de resíduos no leite (ZAFALON et al., 2007). Devido a estes problemas, o uso de compostos derivados de plantas configura-se como alternativa para o controle da mastite em vacas leiteiras.

Entre esses compostos, destacam-se os óleos essenciais, metabólitos secundários voláteis, que se caracterizam por serem misturas complexas de compostos orgânicos de baixo peso molecular. Estes são cada vez mais estudados como antioxidantes e para o controle de microrganismos (ANDRADE et al., 2012).

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

O presente estudo foi realizado com o objetivo de pesquisar a ação antimicrobiana de óleos essenciais contra patógenos isolados de casos de mastite clínica e subclínica em bovinos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mastite bovina

A mastite constitui-se de um processo inflamatório da glândula mamária, que pode se apresentar nas formas clínica ou subclínica, conforme se evidenciem ou não sinais de inflamação (CENTORBI, 1992). A forma subclínica tem maior importância epidemiológica, pois pode disseminar-se silenciosamente pelo rebanho sem que sejam percebidas alterações macroscópicas à inspeção do úbere ou de sua secreção (BLOOD; RADOSTITIS, 1991). Na forma clínica, podem ser observados sinais inflamatórios na glândula mamária e alterações no leite, como a presença de grumos e alteração aquosa (RADOSTITS et al., 2006). A resposta inflamatória persistente resulta em bloqueio de ductos, atrofia de alvéolos associados e, posteriormente, em fibrose, o que dificulta ainda mais a eliminação do agente e a penetração de antibióticos durante o tratamento (PHILPOT; NICKERSON, 2000).

Os agentes causadores da mastite mais frequentemente isolados são *S. aureus* e *S. agalactiae* (SILVA; ARAÚJO, 2008), responsáveis por, aproximadamente, 90% das infecções intramamárias dos rebanhos leiteiros (CREMONESI et al., 2005).

A mastite clínica pode ser detectada por meio de sinais inflamatórios do úbere, tais como secreção láctea com grumos, sangue e pus, entre outras secreções patológicas. Entretanto, para diagnosticar a mastite subclínica, é necessária a realização de exames complementares baseados no conteúdo celular do leite. Além disso, são necessários cultura e isolamento dos agentes etiológicos envolvidos para a implantação de métodos de tratamento, estratégias de controle e profilaxia adequados (BOUCHOT et al., 1985).

O tratamento das mastites clínica, subclínica, recorrente ou crônica é baseado em antibioticoterapia, visando reduzir os sinais inflamatórios

decorrentes da infecção intramamária e a transmissão dos agentes no rebanho (MENEZIES; RAMANOON, 2001). Entretanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos para o tratamento de mastite ou qualquer outra infecção pode levar ao aumento nos níveis de resistência dos agentes em relação a essas drogas (MACHADO; CORREA; MARIN, 2008).

No Brasil, as perdas na produção leiteira variam entre 12% e 15%, devido à alta prevalência de mastite nos rebanhos (SILVA et al., 2010). Os problemas decorrentes da desclassificação do leite por causa da qualidade e dos resíduos de antibióticos, descartes e morte de vacas, gastos com tratamentos, entre outros, aumentam ainda mais estes prejuízos (COSTA, 1998; PERES NETO; ZAPPA, 2011).

Devido ao impacto negativo provocado pela mastite na produção leiteira e à grande capacidade dos microrganismos causadores em apresentar resistência aos antibióticos convencionais, compostos de origem vegetal podem constituir alternativa no controle desta enfermidade.

Entre esses compostos, destacam-se os óleos essenciais.

2.1.1 *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*

A maioria dos casos de mastite apresenta etiologia bacteriana, sendo as bactérias gram-positivas *S. aureus* e *S. agalactiae* as principais responsáveis pelos quadros contagiosos (FONTANA et al., 2010).

S. aureus são cocos gram-positivos dispostos em cachos, podendo ou não possuir cápsula. Crescem na maioria dos meios bacteriológicos, em condições aeróbicas ou anaeróbicas. As colônias variam de acinzentadas a amarelo-ouro e têm formas circulares, lisas, elevadas e brilhantes (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005). *S. aureus* se mostra oxidase negativo e catalase positivo, o que o diferencia dos *Streptococcus* spp. (MURRAY; ROSENTHAL, 2006).

S. aureus isolados de casos de mastite bovina podem ser resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos e algumas cepas são resistentes a todos os β -lactâmicos, incluindo a meticilina (MRSA). (MIMICA; MENDES, 2007). Geralmente, estão associados a infecções subclínicas, o que leva ao aumento da contagem de células somáticas no sangue (FONSECA; SANTOS, 2000).

Os diversos fatores de virulência de *S. aureus* agravam sua patogenicidade e contribuem para a capacidade de causar danos ao hospedeiro. Além disso, produzem várias enzimas, tais como proteases, lipases e hialuronidase, que destroem os tecidos do hospedeiro. A β -lactamase é uma enzima que inativa as penicilinas, tornando a bactéria resistente às penicilinas e às cefalosporinas. A coagulase, um ativador de protrombina, converte o fibrinogênio em fibrina. Além da ampla relação com mastite bovina, os fatores de virulência de *S. aureus* também estão associados à intoxicação alimentar em seres humanos (LOWY et al., 2000).

As bactérias do gênero *Streptococcus* spp. são cocos gram-positivos, geralmente distribuídos aos pares ou em cadeias, anaeróbios facultativos ou estritos, catalase negativos (BIER et al., 1990). São microrganismos nutricionalmente exigentes, que crescem bem em meio de cultura enriquecidos pela adição de sangue. *Streptococcus* podem ser caracterizados de acordo com sua capacidade de lisar hemácias. Dependendo do tipo de hemólise apresentada em ágar sangue, são classificados em β -hemolíticos (hemólise total), α -hemolítico (hemólise parcial) e γ ou não hemolíticos. As colônias são pequenas, de cor acinzentada, podendo apresentar halo de hemólise (CAETANO et al., 2008).

Streptococcus que causam mastite bovina são classificados no grupo dos microrganismos contagiosos (*S. agalactiae*), e ambientais (os demais). Estes apresentam maior capacidade de sobreviver e multiplicar em sítios extramamários. A identificação de fatores de virulência, como, por exemplo, o

CAMP, é decisiva na identificação das espécies do gênero (SANTOS et al., 2007).

S. agalactiae, *S. dysgalactiae* e *S. uberis* são as espécies mais frequentemente identificadas em casos de mastite, sendo *S. agalactiae* o mais prevalente (FERNANDES et al., 1992).

S. agalactiae tem características morfológicas e nutricionais comuns ao gênero *Streptococcus* e, embora possa apresentar variabilidade nas características hemolíticas, a maioria das amostras revela-se β -hemolítica (CAETANO et al., 2008). As cepas respondem bem ao tratamento com antimicrobianos, mostrando-se susceptíveis, na maioria das vezes, à ampicilina, à enroflaxina, à gentamicina, à neomicina e à tetraciclina (COUTINHO et al., 2006).

S. agalactiae é um patógeno importante, responsável tanto por infecções no homem quanto no gado leiteiro. Em bovinos, o reservatório é o úbere infectado, mas não existem dados definitivos que comprovem a transmissão de isolados entre o homem e os animais. Embora não invada o tecido glandular, pode causar fibrose e abscessos, tal como *S. aureus*. *S. agalactiae* coloniza as superfícies epiteliais, ocasionando mastite subclínica ou sinais clínicos intermitentes da doença (SILVA et al., 2010).

2.2 Óleos essenciais

Óleos essenciais são antimicrobianos naturais derivados de plantas, muito utilizados, pela indústria alimentícia, tanto para a conservação como para melhorar o sabor de alimentos; também é bastante utilizado na manipulação de cosméticos e pela indústria farmacêutica. São substâncias incolores ou ligeiramente amareladas, quando extraídos recentemente e poucos são os que apresentam cor, como, por exemplo, o óleo essencial de camomila, que é azul devido ao alto teor de azulenos (SIMÕES et al., 2007). São compostos

complexos, voláteis, caracterizados por apresentar odor forte e são produzidos pelas plantas como metabólitos secundários, geralmente obtidos por meio de arraste a vapor ou hidrodestilação (BAKKALI et al., 2008).

Os metabólitos secundários, produzidos por algumas espécies de plantas, são alvos de maior interesse, pois agem como substâncias de defesa contra microrganismos patogênicos, insetos e animais herbívoros. Têm composição química variada, com presença de terpenoides, alcaloides e cumarinas, que apresentam, com frequência, atividade antimicrobiana (RESCHKE; MARQUES; MAYWORM, 2007).

Os óleos essenciais podem ser sintetizados por todos os órgãos da plantas, tais como brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou cascas, e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008).

A proporção dos componentes dos óleos essenciais depende de vários fatores, como, por exemplo, os climáticos, ação de predadores e idade da planta (GOBBO NETO; LOPES, 2007). Os principais componentes podem constituir até 85% dos óleos essenciais, enquanto o restante pode estar presente em quantidades vestigiais (MIGUEL, 2010).

De acordo com Bakkali et al. (2008), óleos essenciais são misturas complexas e singulares que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações. Apesar dessa complexidade, eles são divididos em apenas dois grupos, os quais se originam do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato, conforme demonstrado na Figura 1.

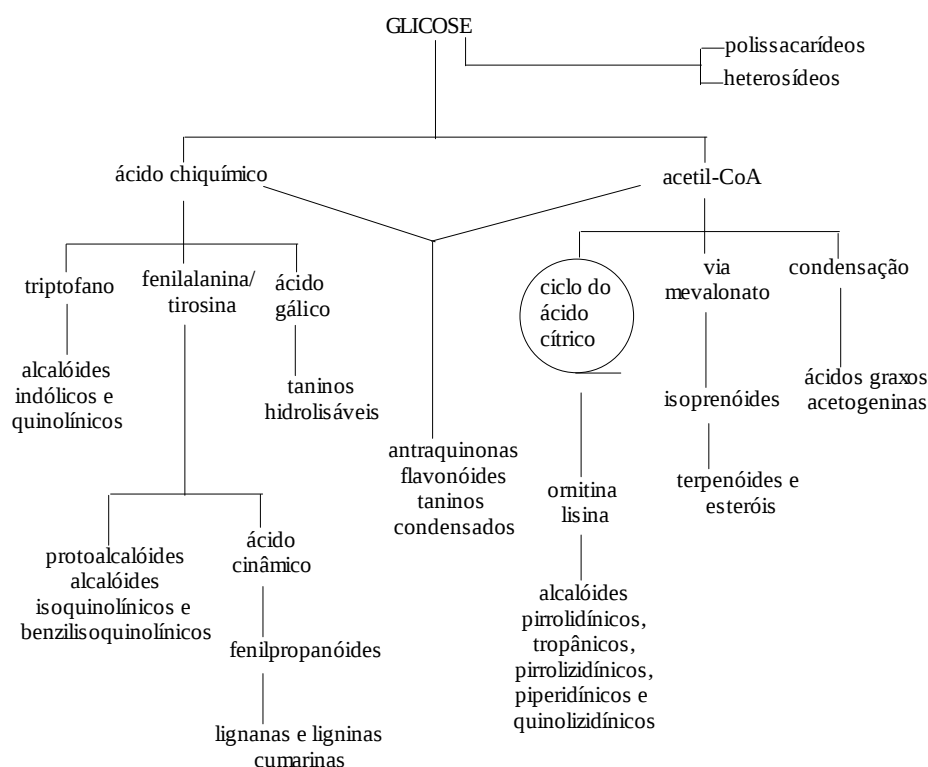


Figura 1 Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários
Fonte: Simões et al. (2007)

O grupo composto por terpenos e terpenóides, os fenilpropanóides, é considerado o principal e o outro grupo é composto por componentes aromáticos. Ambos os grupos são caracterizados pelo baixo peso molecular. Os terpenos são formados a partir de várias combinações de cinco unidades de carbono de base (C5) chamadas de isoprenos. Um terpeno que contém oxigênio é chamado de terpenoide. Os monoterpêneos são formados a partir do acoplamento de duas unidades de isopreno (C10). Eles são as moléculas mais

representativas, constituindo 90% dos óleos essenciais e permitem grande variedade de estruturas. Citronela, capim-limão, alecrim, sálvia e tomilho são exemplos de plantas contendo esses compostos.

Os compostos aromáticos são derivados de fenilpropano e ocorrem em menor frequência que os terpenos. Nesse grupo estão incluídos os aldeídos, os alcoóis, os fenóis e os metoxicompostos, dentre outros. Canela e cravo são exemplos de fontes vegetais para estes (BAKKALI et al., 2008).

2.2.1 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

As propriedades antimicrobianas e a identificação de componentes ativos de vários óleos essenciais têm sido demonstradas. Devido às suas diversas propriedades antissépticas, os óleos essenciais eram utilizados antigamente como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios e anestésicos. Tais características não mudaram muito nos últimos tempos, exceto pelo fato de que, nos dias atuais, os efeitos antimicrobianos destes óleos se tornaram mais conhecidos, devido aos estudos de seus mecanismos de ação (COSTA et al., 2005; LIMA et al., 2006).

As características citotóxicas dos óleos essenciais têm sido objeto de estudo para a compreensão dos efeitos frente às bactérias. A citotoxicidade dos óleos essenciais parece estar relacionada com a sua capacidade de provocar danos à parede celular, pois, como compostos lipofílicos típicos, passam através da parede e membrana citoplasmática, podendo afetar a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, permeabilizando-as. Em bactérias, a permeabilização está associada à perda de íons e à redução do potencial da membrana, ao colapso da bomba de prótons e ao esgotamento de ATP (DI PASQUA et al., 2006). De acordo com Gustafson (1998), os óleos essenciais têm capacidade de coagular o citoplasma e danificar lipídeos e proteínas de membrana. Os danos causados à parede e à membrana celular

ocasionam escape de macromoléculas, evoluindo para a lise celular. Os locais ou mecanismos de ação na célula bacteriana considerados sítios de ação dos componentes dos óleos essenciais são indicados na Figura 2.

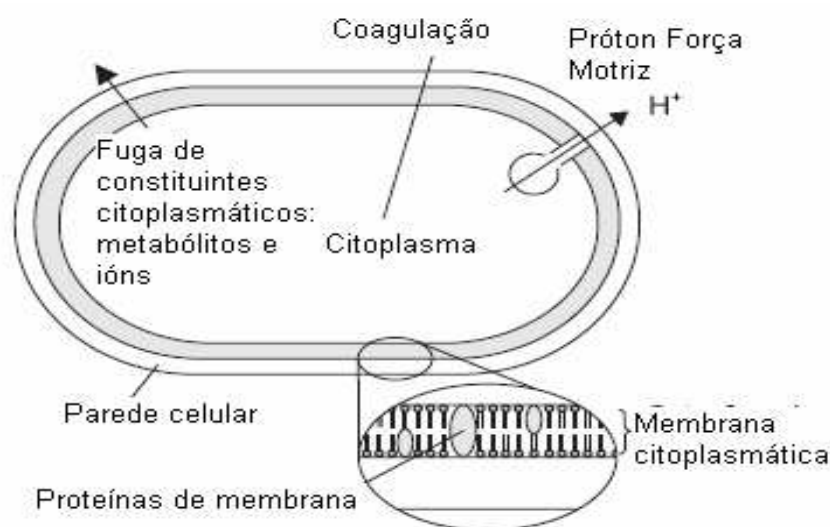


Figura 2 Locais e mecanismos de ação esquemáticos de óleos essenciais na célula bacteriana

Fonte: Adaptado de Burt (2004)

Por serem formados por misturas complexas de várias moléculas, os óleos essenciais apresentam propriedades biológicas cujos efeitos podem ser o resultado de sinergismo de todas essas moléculas presentes em concentrações mais elevadas. Os componentes principais, geralmente, refletem as características biofísicas e biológicas dos óleos essenciais (IPEK et al., 2005) e a amplitude de seus efeitos é dependente de sua concentração, quando testados sozinhos ou associados a óleos essenciais. No entanto, é possível que ocorra

sinergismo entre os componentes dos óleos essenciais, e as atividades dos principais componentes do óleo podem ser moduladas por moléculas pequenas do mesmo. Além disso, é provável que vários componentes dos óleos essenciais desempenhem função na definição da fragrância, da densidade, da textura, da cor e, principalmente, na capacidade de penetração na célula (CAL, 2006).

2.2.2 *Sálvia sclarea*

O gênero *Salvia* abrange cerca de 900 espécies e pertence à família Lamiaceae. O nome sálvia vem da palavra de origem latina “salvare”, que significa “para curar ou para ser seguro e ileso”, referindo-se às propriedades medicinais, sendo conhecida, por séculos, como uma erva sagrada (KAMATOU et al., 2008).

Espécies de *Salvia* são facilmente reconhecidas por suas folhas que, geralmente, são aveludadas ou peludas e, na maioria das vezes, apresentam formas rugosas e dentadas. As flores são agrupadas em cachos, geralmente grandes e coloridos, dependendo das espécies. Essas características são importantes na identificação do gênero (HEDGE, 1974; CODD, 1985).

Numerosas espécies do gênero *Salvia* já foram utilizadas, na medicina natural, para tratamento de diarreias e dores de estômago, de garganta e de cabeça. Uma das espécies é a *S. sclarea*, planta aromática cultivada em muitos países europeus para fins medicinais e cosméticos (DWECK, 2000).

O óleo essencial de *S. sclarea* é acumulado, principalmente, nas raízes e seus principais componentes, linalol, acetato de linalilo e α -terpineol, apresentam atividades biológicas variadas (KÚZMA et al., 2007). A composição do óleo essencial de espécies de sálvia, como normalmente acontece com outras plantas medicinais e aromáticas, é altamente influenciada por fatores genéticos e ambientais. Esta composição pode variar de acordo com a área de cultivo, a espécie, a idade da planta, a forma de propagação, os métodos de secagem e de

extração do óleo essencial, bem como os fatores ecológicos e genéticos da planta (CHANG; CHEN; CHANG, 2001; BAGAMBOULA et al., 2004; DELAMARE et al., 2007).

Estudos realizados com óleos essenciais de *S. sclarea* mostraram eficácia contra biofilmes estafilocócicos, diminuindo significativamente o número de células vivas do biofilme, o que não ocorreu em testes com altas concentrações de antibióticos (KÚZMA et al., 2007). De acordo com Lewis (2001), uma pequena massa molecular desse agente apresenta alta atividade antimicrobiana, capaz de desestabilizar a matriz do biofilme e permitir sua separação. Outra possível explicação pode estar relacionada com as propriedades surfactantes que afetam o potencial hidrofóbico da célula bacteriana ou a sua interferência no sistema de comunicação entre as bactérias que formam o biofilme.

2.2.3 *Eugenia caryophyllata*

O cravo-da-índia é uma árvore de até 15 metros de altura, da família Myrtaceae, usada, desde a Antiguidade, na culinária e também como planta medicinal, há mais de 2.000 anos, pelos chineses. A parte mais utilizada do cravo, na verdade, é o botão floral seco (CARDOSO et al., 2007).

O eugenol é o principal composto do óleo essencial de cravo (BAUER; GARBE; SURBURG, 2001; KONG et al., 2004), bastante utilizado como antisséptico e anestésico bucal em procedimentos odontológicos, além de apresentar potencial bactericida, fungicida e nematicida. Outros componentes desse óleo são o acetato de eugenila e o β -cariofileno, presentes em menor quantidade em relação ao eugenol (CARDOSO et al., 2007).

De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), o extrato e o óleo essencial de uma variedade de plantas possuem ação antibacteriana, antiviral, analgésica, antisséptica e antifúngica frente a patógenos, considerando que tais propriedades se devem, principalmente, ao seu composto majoritário, o eugenol, revelando, na

maioria das vezes, maior eficácia que antibióticos de largo espectro.

2.2.4 *Thymus vulgaris* L.

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é um arbusto aromático de pequeno porte, medindo entre 10 e 30 cm (CORREIA, 1984). É uma planta da família Lamiaceae que compreende 150 gêneros, com cerca de 2.800 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo a região do Mediterrâneo o maior centro de dispersão. Muitas das espécies introduzidas no Brasil são plantas medicinais e produtoras de óleos essenciais, sendo utilizadas como condimentos ou como flores ornamentais (JAKIEMIU et al., 2010).

Além de muito utilizado na culinária como condimento básico, o tomilho produz óleo essencial com atividades antimicrobianas, antissépticas e antioxidante, sendo também utilizado como adstringente, expectorante e estimulante da digestão (LORENZINI; MATOS, 2002). Possui como compostos majoritários timol e carvacrol, que são os principais responsáveis pelas atividades biológicas, encontrados em teores normalmente elevados (CASTRO et al., 2007).

O timol é, estruturalmente, muito semelhante ao carvacrol. É isômero de posição, tendo o grupo hidroxila em um local diferente no anel fenólico (LAMBERT et al., 2001). Assim como outros fenólicos, o mecanismo de ação desses compostos é caracterizado pela perturbação da membrana citoplasmática, interrompendo a força motriz de prótons (PMF), o fluxo de elétrons, o transporte ativo e a coagulação do conteúdo das células bacterianas (SIKKEMA; DEBONT; POOLMAN, 1995). Em outras pesquisas foi demonstrado que o carvacrol interage com a membrana da célula, onde se dissolve na bicamada fosfolipídica, provocando distorção da estrutura física, causando sua expansão e desestabilização (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2000). Ocasiona também

aumento da fluidez da membrana que, por sua vez, aumenta a permeabilidade passiva (ULTEE et al., 2002).

O efeito antimicrobiano do timol e do carvacrol sobre a formação de biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis* foi estudado por Nostro et al. (2007), revelando resultados positivos na inibição de biofilmes formados por estes agentes. Na ausência do carvacrol, era evidente a formação de biofilmes pelas células bacterianas. Já na presença deste, células bacterianas cresceram como colônias mais soltas e a quantidade de biofilme foi reduzida, sendo quase ausente em grandes concentrações do óleo. Este fato pode ser devido à natureza hidrofóbica do carvacrol e do timol, que interagem com a bicamada lipídica das membranas citoplasmáticas, causando perda da integridade e vazamento de material celular, tais como íons, ATP e ácidos nucleicos (LAMBERT et al., 2001; TROMBETTA et al., 2005).

2.2.5 *Cymbopogon winterianus*

Conhecida como capim-citronela, *Cymbopogon winterianus* é uma planta pertencente à família Poaceae, amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, principalmente em áreas montanhosas, planícies e zonas áridas (CASTRO et al., 2007).

Seus componentes principais são citronelal, geraniol e citrônolol. O citrônolol é considerado um excelente repelente de insetos, além de apresentar ação antimicrobiana e antifúngica (TAWATSIN et al., 2001)

Lertsatitthanakorn et al. (2010) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de citronela contra *Propionibacterium acnes*, uma das principais bactérias causadoras de acne. Nesse estudo, foi avaliada a capacidade de induzir lesão da membrana, bem como sua capacidade em induzir alterações morfológicas após o tratamento com várias concentrações de óleo essencial de citronela. Os resultados revelaram perda e rompimento da estrutura rígida da

parede celular e, conseqüentemente, danos na membrana citoplasmática, levando à fuga progressiva de materiais intracelulares e lise celular.

2.2.6 *Elettaria cardomomun*

Elettaria cardomomun (cardomomo) é um arbusto com raízes grossas e suas sementes são utilizadas, comumente, em culinária. Como especiaria, é utilizado na culinária em cafés, bolos, pães e como aromatizante para doces e bebidas (RAVIDRAN, 2006). As sementes e os óleos essenciais são utilizados como componentes aromatizantes em uma variedade de alimentos, incluindo bebidas alcoólicas e não alcoólicas, sobremesas, doces congelados e temperos em cozimentos de carnes (MALTI; MOUNTASSIF; AMAROUCH, 2007).

O cardomomo também é empregado como auxiliar para a digestão e no tratamento de gases intestinais (JAMAL et al., 2006). Os óleos essenciais de suas sementes têm propriedades calmantes em seres humanos e antibacterianas em bactérias gram-negativas (SINGH et al., 2008).

No entanto, altas concentrações de cardomomo podem induzir toxicidade. Em um estudo realizado em ratos foi demonstrado que o extrato de cardomomo pode provocar inflamação no cérebro, estresse oxidativo e necrose de células do coração (MALTI; MOUNTASSIF; AMAROUCH, 2007).

O potencial antimicrobiano do óleo essencial de cardamomo está diretamente associado aos seus principais constituintes, que são metabólitos derivados, principalmente, de terpenoides pertencentes à classe de monoterpenos (DHULAP; ANITA; HIRWANI, 2008). Nestes metabólitos estão incluídos α -terpinoleno, cineol, limoneno, linalol, terpinoleno e mirceno.

2.2.7 *Cymbopogon flexuosus*

O gênero *Cymbopogon* pertence à família Poaceae (Gramineae), sendo originário do sul da Ásia, do sudeste Asiático e da Austrália. Este gênero foi

perfeitamente adaptado no Brasil, podendo ser encontrado em diversas regiões. O capim-limão apresenta duas espécies, *Cymbopogon flexuosus* e *Cymbopogon citratus*, com características diferentes (MAY et al., 2008).

O óleo essencial extraído das espécies de capim-limão apresenta atividades sedativas, digestivas, antirreumáticas, calmantes, antifebris, analgésicas, antiespasmódicas e antimicrobianas, além de ter propriedade de repelente de insetos (CORRÊA JÚNIOR; MING; SCHEFFER, 1994), além de, recentemente, ter sido reportada a atividade antineoplásica (PARDUMAN et al., 2009).

O óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* é constituído, principalmente, por α -citral (geranial) e β -citral (neral), que são aldeídos monoterpênicos acíclicos denominados unicamente de citral. Outro componente, o mirceno, também é destacado por possuir atividade analgésica (FONTELES; FERREIRA, 1989).

O citral é o principal responsável pela atividade antimicrobiana, agindo na parede celular e inibindo enzimas da membrana plasmática. Os demais componentes, geraniol e mirceno, também revelam atividade antimicrobiana, provocando alterações na membrana, uma vez que células tratadas com geraniol podem perder a organização estrutural das suas membranas citoplasmáticas em um período curto, antes mesmo de ocorrer desnaturação das proteínas do citoplasma (DENYER, 1995). No entanto, no caso do mirceno, a atividade antimicrobiana só foi relatada em um efeito sinérgico com os componentes principais (NAKAHARA et al., 2003).

O óleo essencial de capim-limão é caracterizado por apresentar forte odor, sendo frequentemente utilizado para conferir fragância a sabões e a detergentes.

Vasudevan et al. (2003) avaliaram por testes *in vitro* o efeito do óleo de capim-limão, citral e geraniol sobre a capacidade de *S. aureus*, na formação

de biofilmes. Os resultados revelaram que o óleo essencial de capim-limão e os seus principais componentes podem inibir a formação de biofilmes por *S. aureus*. Os agentes testados mostraram afetar a superfície da célula bacteriana, comprometendo a fixação inicial entre as células e reduzindo a formação de biofilme.

Com o objetivo de avaliar o mecanismo de ação de óleos essenciais de capim-limão e seus componentes, Aiemsaard et al. (2011) confirmaram que o potencial lipofílico dos componentes do óleo essencial desempenha papel importante sobre a camada lipídica da membrana celular bacteriana, causando perda de sua organização estrutural e integridade. O estudo indicou que os principais componentes do óleo essencial de capim-limão afetaram mais a organização estrutural do citoplasma que a parede celular de *S. aureus*. Neste contexto, surge a hipótese de que os óleos essenciais de capim-limão, provavelmente, se ligam à superfície da célula bacteriana e penetram na parede da mesma, fazendo-a inchar e danificando, em seguida, a membrana citoplasmática.

2.2.8 *Rosmarinus officinalis* Linn

A espécie *Rosmarinus officinalis* Linn., conhecida popularmente por alecrim, é um arbusto aromático de pequeno porte pertencente à família Labiatae, cujas folhas abrigam pequenas glândulas que contêm óleo aromático (AL-SEREITI; ABRU-AMER; SEM, 1999). Historicamente, o alecrim tem sido utilizado como um agente medicinal para o tratamento de cólica renal e de dismenorreia, para aliviar os sintomas causados por doenças respiratórias e estimular o crescimento de cabelo. Os extratos de alecrim são utilizados, em aromaterapia, para tratar doenças relacionadas com a ansiedade e aumentar a vigilância (OLUWATUYI; KAATZ; GIBBONS, 2004).

As ações farmacológicas e antimicrobianas de *R. officinalis* têm sido retratadas por meio da atividade hipoglicemiante e da inibição de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Os óleos essenciais de alecrim são compostos anti-inflamatórios que têm, ainda, ação anticancerígena e antioxidante natural, o que tem gerado grande interesse pela sua utilização para a conservação de alimentos (ERKAN; AYRANCI, G.; AYRANCI, 2008). Estas atividades são atribuídas, principalmente, aos seus compostos majoritários, sendo o principal 1,8-cineol, seguido de cânfora, α -pineno, limoneno, canfeno e linalol, os quais são os mais encontrados (JIANG et al., 2011).

Jiang et al. (2011), utilizando citometria de fluxo (FCM) e microscopia de força atômica (AFM), avaliaram as alterações morfológicas de *S. aureus* após o tratamento com diferentes concentrações de óleo essencial de alecrim. Os resultados indicaram que o óleo essencial ligado à superfície de bactérias, em concentrações mais baixas, provocou irregularidades e redução substancial da altura nas superfícies, tornando-se côncava. Com o aumento da concentração, as paredes das células foram danificadas gradualmente e, em seguida, o conteúdo celular vazou. Segundo os autores, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim é o efeito sinérgico de seus compostos.

2.2.9 *Cinnamomum cassia*

O óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (canela-cássia) é, comumente, utilizado em alimentos e bebidas, devido ao seu aroma especial (HU; LIN; HO, 1985). O óleo essencial extraído da casca tem fortes propriedades antibacterianas e seu maior integrante, o cinamaldeído, apresenta maior atividade antimicrobiana, em comparação com os outros componentes (CHANG; CHEN; CHANG, 2001).

Di Pasqua et al. (2006) investigaram a ocorrência de danos em superfícies celulares de bactérias por meio da observação por microscopia de

varredura, em culturas tratadas com concentrações elevadas de constituintes do óleo essencial de canela-cássia em *S. aureus*. O estudo revelou que o cinamaldeído foi capaz de alterar a estrutura externa de todos isolados testados, ocasionando a degradação da parede celular e alto grau de lise das células. Uma possível explicação para este evento é que a presença do cinamaldeído age sobre a membrana celular, alterando o seu perfil lipídico, o que aumenta a área de superfície da membrana e danifica a sua estrutura, podendo, assim, penetrar na parte mais profunda da célula, provocando sua morte.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Pesquisar a ação antibacteriana de óleos essenciais frente a *S. aureus* e *S. agalactiae*, isolados de casos de mastite clínica e subclínica em bovinos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Salvia sclarea*, *Eugenia caryophyllata*, *Thymus vulgaris* L., *Cymbopogon winterianus*, *Elettaria cardamomum*, *Cymbopogon flexuosus*, *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Cinnamomum cassia* frente a *S. aureus* e *S. agalactiae*, isolados de casos de mastite bovina clínica e subclínica.
- b) Comparar o efeito antibacteriano dos óleos essenciais testados para isolados de *S. aureus* e de *S. agalactiae*, obtidos de casos clínicos e subclínicos de mastite.
- c) Pesquisar a interação (sinergismo/antagonismo) das associações dos óleos essenciais que apresentaram maior eficiência *in vitro* frente a isolados de *S. aureus* e isolados de *S. agalactiae*.

4 JUSTIFICATIVA

A mastite bovina tem sido apontada como a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no mundo inteiro, causando sérios prejuízos econômicos tanto ao produtor de leite quanto à indústria de laticínios (COSTA; MELVILLE; RIBEIRO, 1999). Os prejuízos causados à produção de leite podem chegar a mais de 20% da produção diária e a desclassificação do leite por causa da perda da qualidade e dos resíduos de antibióticos aumenta ainda mais estes prejuízos. Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos compromete a qualidade do leite e proporciona o aparecimento de cepas resistentes (DIAS; DUARTE; FAVARO, 2011).

O problema da resistência microbiana está aumentando e a perspectiva para o uso de drogas antimicrobianas no futuro ainda é incerta. Portanto, ações devem ser tomadas para reduzir esse problema, controlando, assim, o uso de antibióticos e desenvolvendo pesquisas para a melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência, possibilitando o aparecimento de novas drogas, sintéticas ou naturais (PRASHAR et al., 2003). Por apresentarem atividade antimicrobiana contra grande número de bactérias, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos e serem de origem natural, os óleos essenciais apresentam grande potencial de utilização no controle dos agentes causadores de mastite bovina.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local de execução do experimento

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Lavras, onde foi avaliada a concentração inibitória mínima dos óleos essenciais de sálvia, cravo-botão, tomilho-branco, citronela, cardamomo, capim-limão, alecrim e canela-cássia em isolados de *S. aureus* e *S. agalactiae* provenientes de quartos mamários acometidos por mastite clínica e subclínica.

5.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Salvia sclarea* (sálvia), *Eugenia caryophyllata* (cravo-botão), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Elettaria cardamomun* (cardamomo), *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Cinnamomum Cássia* (canela-cássia) foram adquiridos da empresa FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda., e os componentes principais, informados pelo fabricante, estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 Relação dos componentes principais presentes nos óleos essenciais em estudo.

Óleo essencial	Componentes principais
<i>Salvia sclarea</i>	Acetato de linalila, linalol
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Eugenol
<i>Thymus vulgaris</i>	Timol
<i>Cymbopogon winterianus</i>	Citronelal
<i>Elettaria cardomomun</i>	Alfa-terpineol, eucaliptol
<i>Cymopogon flexuosus</i>	Geranial, neral
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,8 cineol, alfa-pineno, cânfora
<i>Cinnamomum cassia</i>	Cinamaldeído

5.3 Bactérias utilizadas

Foram utilizados, no estudo, 100 isolados de *S. aureus* e 100 isolados de *S. agalactiae*, associados com mastite bovina clínica e subclínica em rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais.

Para os ensaios de combinações entre os óleos essenciais foram selecionadas ao acaso 30 isolados de *S. aureus*, dos quais 15 associados à mastite clínica e 15 à mastite subclínica, e 30 isolados de *S. agalactiae*, sendo também 15 amostras associadas à mastite clínica e 15 à mastite subclínica.

As amostras utilizadas pertencem ao banco de bactérias do Laboratório de Bacteriologia de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, onde se encontram estocadas em meio de congelamento a -70 °C.

5.4 Preparo dos inóculos

Os isolados selecionados de *S.aureus* e *S.agalactiae*, que se encontravam estocados em freezer a -70 °C, foram descongelados em temperatura ambiente. Alíquotas de 30 µL de cada isolado foram inoculadas assepticamente em tubos de rosca (15 x 100 mm) contendo 3 mL de caldo *brain heart infusion* (BHI) e incubadas, a 37 °C, por 24 horas.

Após incubação, as culturas foram avaliadas quanto à pureza por meio de esfregaços corados pela técnica de Gram; as suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina (0,85% m/v) e a turbidez ajustada pela escala 0,5 de MacFarland, o que corresponde a, aproximadamente, 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (mL), de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (2008).

5.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima foi empregado o método de diluição em caldo, segundo a metodologia preconizada pelo CLSI (2008).

O caldo Mueller Hinton foi utilizado como meio de cultura para as bactérias em teste. Para o crescimento de *S. agalactiae*, o meio foi suplementado com 0,5 % de soro equino e o pH do meio ajustado em torno de 7,2 a 7,4.

Microplacas de 96 poços estéreis e descartáveis foram utilizadas em capela de fluxo laminar. Foram adicionados 100 µL do meio de cultura em cada poço, exceto na primeira fileira, em que foram adicionados 190 µL do meio e 10 µL do óleo essencial diluído v/v em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir dos poços da fileira inicial, diluições seriadas de base 2 foram realizadas nos demais poços, com auxílio de pipeta automática multicanal, obtendo-se concentrações decrescentes, variando de 25 µL/mL (2,5%) a 0,048 µL/mL (0,0048%), conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 Concentrações de óleos essenciais utilizadas por diluição na microplaca de poliestireno.

Concentração	Diluições
2,5%	1
1,25%	2
0,625%	3
0,3125%	4
0,15625%	5
0,0781%	6
0,03906%	7
0,0195%	8
0,0097%	9
0,0048%	10

A seguir, alíquotas de 10 µL de cada isolado foram colocadas nos poços contendo as diluições seriadas dos óleos essenciais.

Para avaliação de sinergismo/antagonismo, foram realizadas associações entre os óleos de canela-cássia, capim-limão e cravo-botão, que apresentaram melhores efeitos inibitórios sobre *S.aureus* e *S. agalactiae*. Quatro ensaios de combinações foram realizados, visando pesquisar a ocorrência de sinergismo, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 Volumes de cada óleo essencial e de DMSO utilizados nos ensaios de diluições seriadas para avaliação de sinergismo/antagonismo.

Ensaio	Canela-cássia	Capim-limão	Cravo-botão	DMSO
1	5 µL	5 µL	—	10 µL
2	5 µL	—	5 µL	10 µL
3	—	5 µL	5 µL	10 µL
4	5 µL	5 µL	5 µL	15 µL

Para todos os ensaios, as microplacas foram tampadas, agitadas em um agitador orbital, com 400 rpm, por 5 minutos e, em seguida, incubadas em estufa, a 37 °C, por 24 horas, após o que se realizou a leitura dos testes.

5.6 Observação dos resultados

Após 24 horas de incubação, os resultados foram avaliados. O valor da CIM foi determinado como a menor diluição do óleo essencial capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano visível a olho nu.

5.7 Controle de qualidade e validação dos testes

Para cada isolado, prepararam-se poços controle de crescimento bacteriano, sem a presença do óleo essencial em teste. Em todas as microplacas utilizadas foram preparados poços sem óleo essencial e sem isolados bacterianos, visando o controle da esterilidade do meio de cultura. Também foram utilizados poços contendo com meio de cultura e óleo essencial diluído em DMSO, para testar a esterilidade do óleo e do emulsificante. Os testes foram feitos em duplicata, para todos os isolados bacterianos utilizados.

5.8 Análises estatísticas

Para a verificação de possíveis diferenças nas concentrações inibitórias mínimas (medida em escala ordinal) dos óleos essenciais sobre o crescimento bacteriano de isolados associados à mastite clínica e subclínica, foi aplicado o teste de Mann-Whitney. As avaliações comparativas da ação inibitória dos óleos essenciais foram realizadas por meio do teste de Friedman, seguido do teste de comparação múltipla das médias ranqueadas de LSD (MARÔCO, 2010). Foi considerado um nível de significância mínimo de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do pacote estatístico SPSS 20.0.

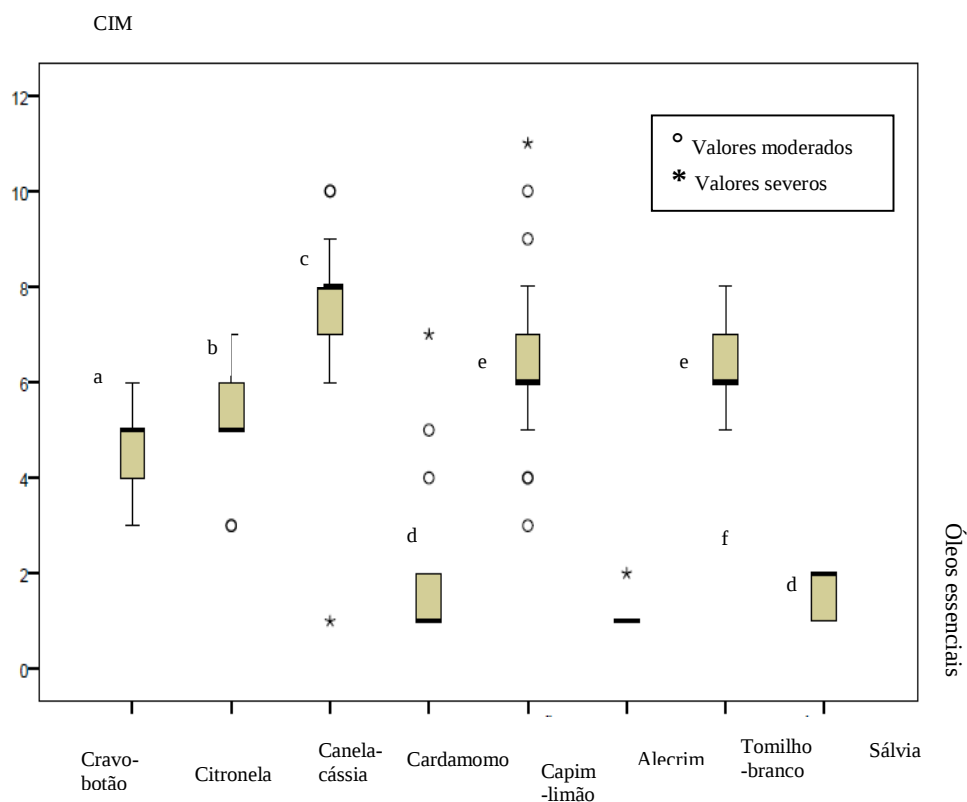
Adicionalmente, para analisar o efeito sinérgico dos óleos essenciais que demonstraram maior efetividade contra os isolados testados, os resultados das CIMs foram submetidos a análises multivariadas dos componentes principais (*principal component analysis*, PCA), utilizando-se o software Chemoface versão 1.4 (NUNES, 2012).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Concentração inibitória mínima dos óleos essenciais isolados

Os diagramas representados nas Figuras 3 a 8 fornecem a comparação das distribuições das CIMs de cada óleo essencial isolado. O enredo de caixa contém linhas, denominadas bigodes, que se estendem a partir das bordas da caixa para os valores extremos de CIM, representando o menor e o maior valor não discrepante de CIM. Os valores discrepantes, “outliers”, são valores muito acima ou muito abaixo da distribuição dos valores de CIM para cada óleo essencial, representados no gráfico como valores moderados e valores severos, dependendo da discrepância em relação à mediana. A mediana é representada no gráfico pela posição central da caixa, indicando os valores de CIM predominantes para cada óleo essencial.

De acordo com o gráfico apresentado na Figura 3 é possível observar que os *S. aureus* foram mais sensíveis ao óleo essencial de canela-cássia cuja concentração inibitória mínima encontrada foi baixa (0,03906%). Em relação aos óleos essenciais de tomilho, capim-limão, citronela e cravo, estes apresentaram atividade, com pequenos valores de CIMs, sendo de 0,15625% para o tomilho-branco e o capim-limão e de 0,3125% para cravo-botão e a citronela. Os óleos de alecrim, cardamomo e sálvia apresentaram baixo efeito antibacteriano em relação aos demais óleos testados, com valores de CIM iguais ou superiores a 2,5%. Dos óleos essenciais observados, o de alecrim não exibiu variedade na distribuição dos CIMs, apresentando valores iguais para a maioria dos isolados (>2,5%), com exceção de um, que apresentou valor severo.

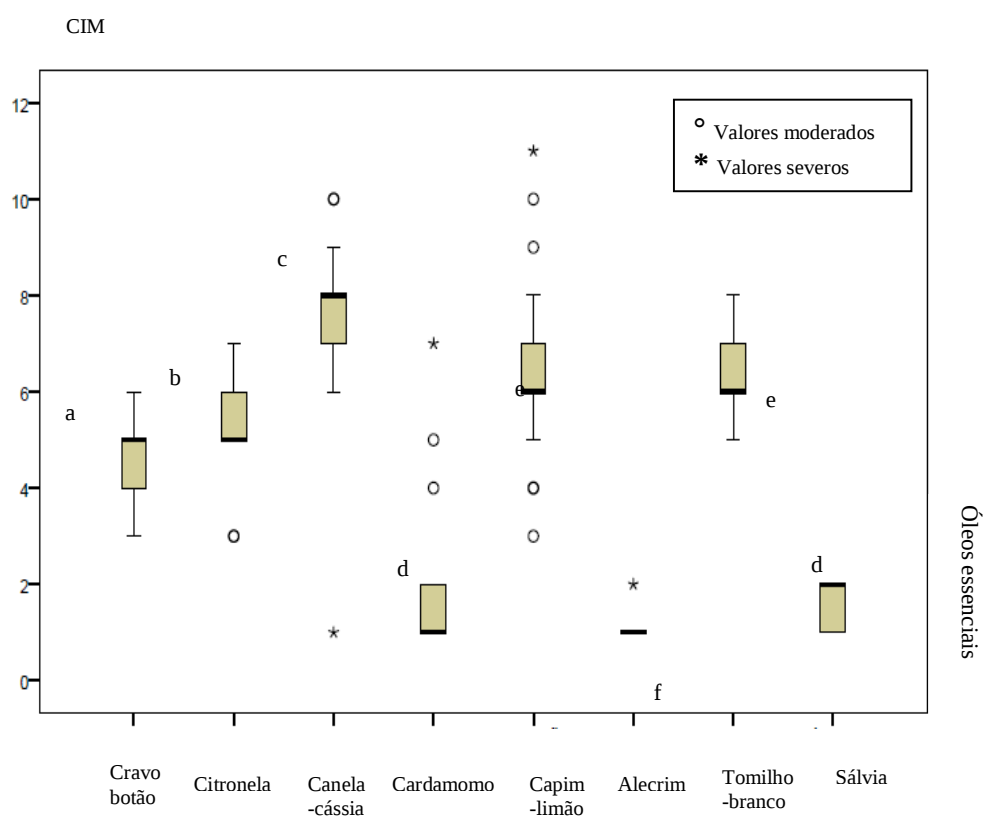


Legenda: Valores de CIM: 1: > 2,5%; 2: 2,5%; 3: 1,25%; 4: 0,625%; 5: 0,3125%; 6: 0,15625%; 7: 0,0781%; 8: 0,03906%; 9: 0,0195%; 10: 0,0097%; 11: 0,0048%; 12: < 0,0048%.

Figura 3 Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada óleo essencial (box-plot) sobre *S. aureus* isolado de mastite clínica e subclínica. Distribuições seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$).

As Figuras 4 e 5 mostram que, para *S. aureus*, não houve diferenças na ação dos óleos essenciais para os isolados de mastite clínica e subclínica, apresentando diferenças apenas na distribuição das CIMs. As distribuições dos valores de CIM foram semelhantes para a maioria dos óleos essenciais, com

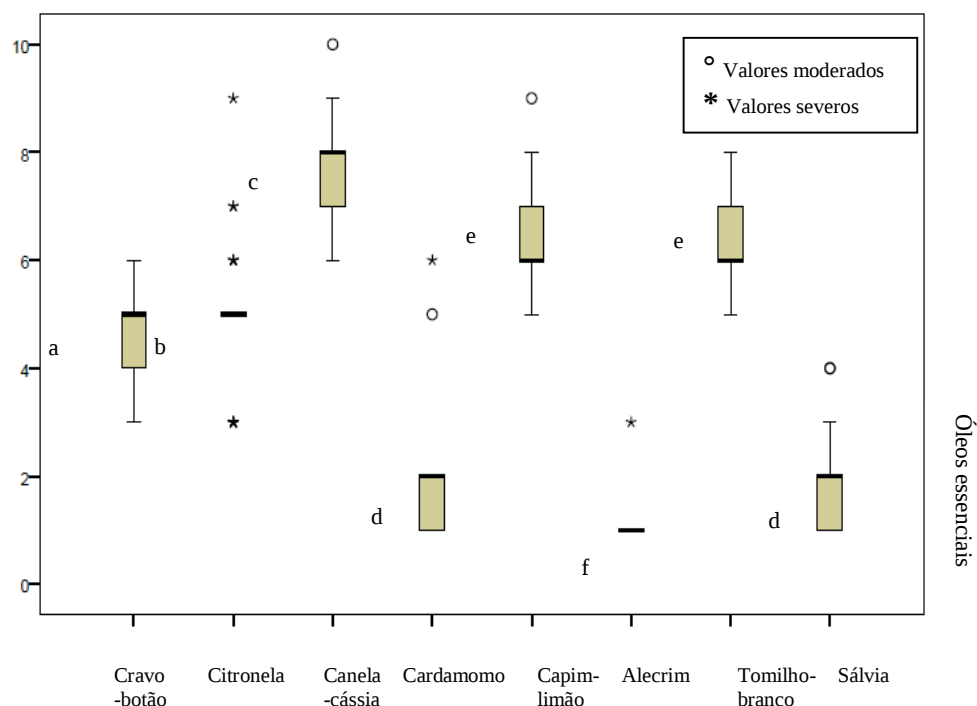
exceção do óleo essencial de citronela, que apresentou valores de CIM constantes para mastite subclínica e valores severos para alguns isolados.



Legenda: Valores de CIM: 1: > 0,025; 2: 0,025; 3: 0,0125; 4: 0,00625; 5: 0,003125; 6: 0,0015625; 7: 0,00078125; 8: 0,0003906; 9: 0,0001953; 10: 0,000097; 11: 0,000048; 12: < 0,000048.

Figura 4 Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada óleo essencial (box-plot) sobre *S. aureus* isolado de mastite clínica. Distribuições seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$).

CIM

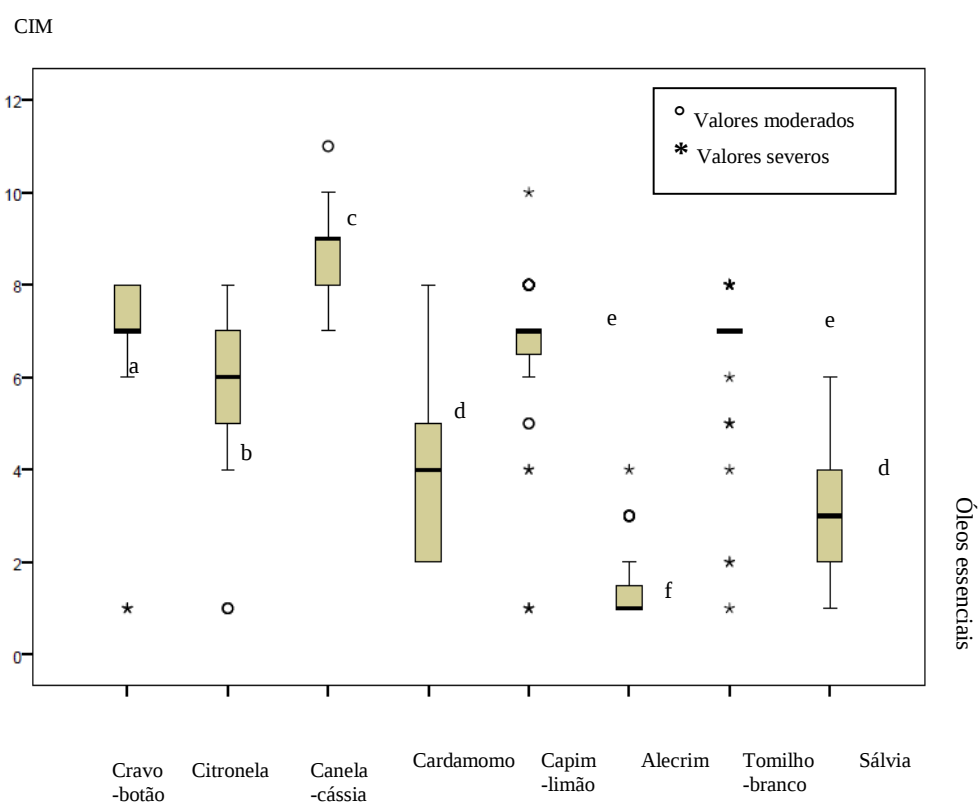


Legenda: Valores de CIM: 1: > 2,5%; 2: 2,5%; 3: 1,25%; 4: 0,625%; 5: 0,3125%; 6: 0,15625%; 7: 0,0781%; 8: 0,03906%; 9: 0,0195%; 10: 0,0097%; 11: 0,0048%; 12: < 0,0048%.

Figura 5 Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada óleo essencial (box-plot) sobre *S. aureus* isolado de mastite subclínica. Distribuições seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$).

A distribuição das CIMs de cada óleo essencial sobre os isolados de *S. agalactiae* está representada na Figura 6. Por meio da representação gráfica foi possível observar que o óleo essencial de canela-cássia apresentou o melhor efeito inibitório (mediana de CIM = 0,01953%) em relação aos demais óleos testados, que apresentaram medianas de CIM de 0,078125%, para cravo-botão, capim-limão e tomilho; 0,15625% para citronela e 0,625% para cardamomo. Os óleos essenciais de sálvia e alecrim revelaram baixa efetividade antibacteriana, apresentando CIMs de 1,25% e superiores a 2,5%, respectivamente. Observou-

se, na distribuição das CIMs, uma dispersão maior para os óleos de cardamomo, citronela e sálvia e menor para os óleos de alecrim, capim-limão e tomilho, tendo o último apresentado maior frequência de valores severos em relação aos demais óleos essenciais.

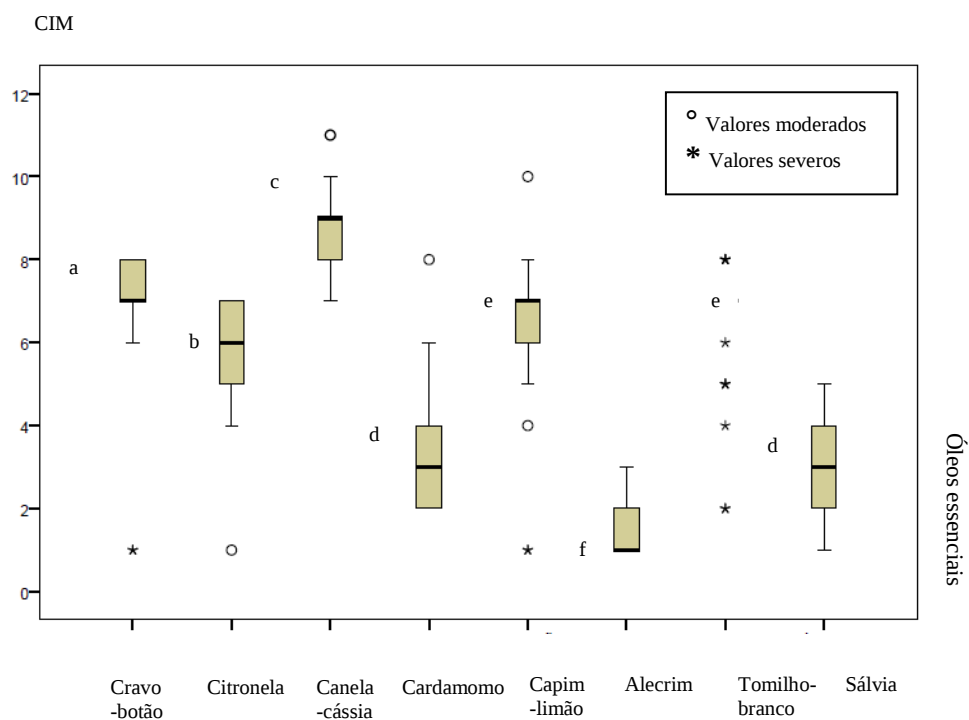


Legenda: Valores de CIM: **1:** > 2,5%; **2:** 2,5%; **3:** 1,25%; **4:** 0,625%; **5:** 0,3125%; **6:** 0,15625%; **7:** 0,0781%; **8:** 0,03906%; **9:** 0,0195%; **10:** 0,0097%; **11:** 0,0048%; **12:** < 0,0048%.

Figura 6 Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada óleo essencial (box-plot) sobre *S. agalactiae* isolado de mastite clínica e subclínica. Distribuições seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p>0,05$).

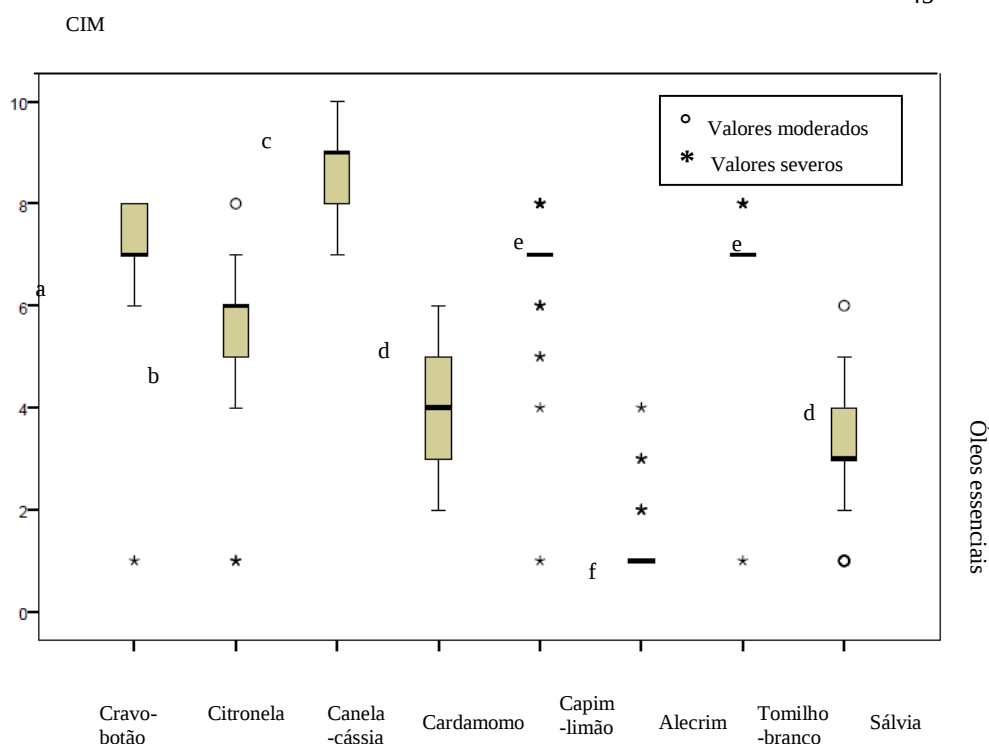
Nas Figuras 7 e 8 estão representadas as distribuições de CIMs dos óleos essenciais sobre *S. agalactiae* isolado de mastite clínica e subclínica. Não se observaram diferenças nas CIMs para *S. aureus* e *S. agalactiae* isolados de mastite clínica e subclínica, para os diferentes óleos essenciais testados, exceção para os isolados de mastite subclínica, em que as CIMs foram 0,625% para cardamomo e 2,5% para sálvia.

As diferenças de CIMs entre isolados associados a diferentes formas de apresentação da mastite podem refletir diversidade populacional entre os isolados obtidos testados. Além dessas diferenças, houve notável variação nas distribuições das CIMs em ambos os tipos de mastite, principalmente para o óleo essencial de capim-limão. Não houve diferenças na mediana de CIMs para os óleos essenciais de citronela e sálvia que, no entanto, apresentaram distribuições desiguais nas CIMs em isolados obtidos de mastite clínica e subclínica.



Legenda: Valores de CIM: 1: > 2,5%; 2: 2,5%; 3: 1,25%; 4: 0,625%; 5: 0,3125%; 6: 0,15625%; 7: 0,0781%; 8: 0,03906%; 9: 0,0195%; 10: 0,0097%; 11: 0,0048%; 12: < 0,0048%.

Figura 7 Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada óleo essencial (box-plot) sobre *S. agalactiae* isolado de mastite clínica. Distribuições seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$).



Legenda: Valores de CIM: 1: > 2,5%; 2: 2,5%; 3: 1,25%; 4: 0,625%; 5: 0,3125%; 6: 0,15625%; 7: 0,0781%; 8: 0,03906%; 9: 0,0195%; 10: 0,0097%; 11: 0,0048%; 12: < 0,0048%.

Figura 8 Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada óleo essencial (box-plot) sobre *S. agalactiae* isolado de mastite subclínica. Distribuições seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$).

Diferentemente dos resultados encontrados neste estudo, Nimje et al. (2013), utilizando técnica de difusão em ágar para avaliar a ação do óleo essencial de canela-cássia sobre *S. aureus*, encontraram CIM de 0,625%, valor superior ao encontrado neste estudo. A atividade antimicrobiana do óleo essencial de canela-cássia é atribuída à presença do cinamaldeído, o qual interage com a membrana celular alterando a força motriz de prótons e evoluindo para lise celular (CHANG; CHEN; CHANG, 2001; GILL; HOLLEY, 2004). A importância do cinamaldeído foi destacada por Baskaran et al. (2009)

que relataram sua eficácia contra patógenos causadores de mastite bovina e sustentada por Pozzo et al. (2012), que realizaram a avaliação comparativa da atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de canela-cássia e do componente cinamaldeído contra *Staphylococcus* spp. isolado de casos de mastites, concluindo pela maior atividade do cinamaldeído nas amostras testadas.

Em relação ao óleo essencial de capim-limão, estudos revelam que seu o principal local de ação parece ser no citoplasma da célula, em ação atribuída ao geranial e ao neral que, em baixas concentrações, atravessam a parede celular e inibem enzimas da membrana citoplasmática. Já em concentrações intermediárias, podem causar coagulação do citoplasma e, à medida que se eleva a concentração, há aumento da permeabilidade da célula (DENYER, 1995; RUSSELL; CHOPRA, 1996). Aiemsaard et al. (2011) relataram atividade antimicrobiana do óleo essencial de capim-limão em patógenos causadores de mastite bovina e demonstraram que seu mecanismo de ação pode ser devido ao sinergismo entre os seus principais componentes. Os resultados mostraram que os componentes principais têm atividade antibacteriana contra patógenos isolados de mastite bovina, mas apenas o óleo parecia ter ação bactericida contra todas as bactérias testadas. De acordo com os resultados obtidos, os componentes isolados foram menos eficazes contra *S. aureus* e *S. agalactiae*, quando comparados ao óleo, enquanto mirceno, componente presente em quantidade vestigial, mostrou não apresentar, isoladamente, atividade antimicrobiana.

O óleo essencial de tomilho apresentou CIM (mediana) alternando de 0,15625%, para *S. aureus* a 0,0781%, para *S. agalactiae*. Al-Bayati (2008), também utilizando técnica de microdiluição em caldo para o óleo essencial de tomilho frente a isolados de *S. aureus*, verificou CIM de 0,312%, valor superior ao encontrado neste estudo. Utilizando esta mesma técnica, Imelouane et al.

(2009) obtiveram CIM de 0,0133%, para o óleo essencial de tomilho, frente a *S. aureus*. Schwiertz (2006) obteve CIM de 0,01%, para este mesmo óleo essencial frente a *S. agalactiae*, valor semelhante ao encontrado neste estudo. Fabio et al. (2007) encontraram CIM de 1,25%, para *S. aureus* e de 0,625%, para *S. agalactiae*, valores superiores aos encontrados neste estudo. Em um estudo realizado por Lambert et al. (2001) foi demonstrado que o efeito inibitório encontrado no óleo essencial de tomilho se dá, principalmente, pela mistura de seus componentes majoritários, timol e carvacrol. Segundo Suzuki, Flemming e Traad (2008), a ação antimicrobiana destes componentes deve à ação lipolítica na membrana celular, dispersando as cadeias de polipeptídios que constituem a matriz da membrana, provocando mudanças na permeabilidade e na atividade da membrana celular das bactérias.

Fu et al. (2007), ao avaliarem a ação antimicrobiana do óleo essencial de cravo-botão contra *S. aureus*, utilizando a técnica de microdiluição em caldo, obtiveram CIM de 0,125%, valor inferior ao obtido neste experimento, que foi de 0,3125%. Silvestri et al. (2010), por meio do método indireto de crescimento bacteriano, verificaram, para o óleo essencial de cravo-botão, CIM de 0,03%, resultado semelhante ao encontrado neste estudo. O eugenol, sendo o constituinte majoritário, pode ser o responsável pelo efeito inibitório do óleo essencial de cravo-botão sobre bactérias. Esse composto é capaz de desnaturar as proteínas e reagir com os fosfolipídeos da membrana da célula, alterando sua permeabilidade (BRIOZZO, 1989).

Brugnera, Liveira e Piccoli (2011), utilizando a técnica de difusão em ágar para determinar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de citronela frente patógenos de origem alimentar, obtiveram resultados inferiores aos alcançados neste estudo para *S. aureus*. Oussalah et al. (2006), estudando o efeito antimicrobiano de vários óleos essenciais sobre o crescimento de quatro bactérias patogênicas, *E. coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus* e

Listeria monocytogenes, observaram que o óleo essencial de citronela apresentou valor de CIM de 0,4%, para *S. aureus*, semelhante ao encontrado neste estudo. Citronelol e geraniol, componentes principais do óleo essencial de citronela, parecem ser as substâncias causadoras do dano da membrana citoplasmática e da lise celular, resultando na inibição do crescimento bacteriano (HORNE et al., 2001).

Da mesma forma que o presente estudo, Kubo, Himejima e Muroi (1991), utilizando a técnica de diluição em caldo, testaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de cardamomo e seus componentes frente a várias bactérias gram-positivas e negativas. Dentre as gram-positivas testadas, *S. aureus* foi a menos sensível ao óleo essencial, apresentando inibição apenas em altas concentrações. O potencial antibacteriano do óleo essencial de cardamomo está associado aos seus componentes majoritários (alfa-terpineol, eucaliptol) (DHULAP; ANITA; HIRWANI, 2008).

Em relação ao óleo de alecrim, Lopez et al. (2005), por meio do método de volatilização em disco, obtiveram resultados semelhantes ao deste trabalho, revelando nenhuma inibição frente às bactérias testadas (*S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*). Diferindo deste estudo, Djeddi et al. (2007) relataram forte atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim cultivado na Argélia contra *S. aureus*, *S. epidermis*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* e *E. coli*.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de sálvia e alecrim foi estudada por Fabio et al. (2007), contra bactérias causadoras de doenças do trato respiratório humano ou animal. À semelhança dos resultados obtidos neste estudo, o óleo essencial de sálvia não revelou nenhuma atividade frente a *S. aureus* e pequena atividade para *S. agalactiae*. O óleo essencial de alecrim

mostrou pequena inibição frente às bactérias citadas. Schwiertz et al. (2006) estudaram a atividade *in vitro* destes mesmos óleos essenciais frente a microrganismos isolados de infecções vaginais. As CIM obtidas para alecrim e sálvia frente a *S. agalactiae* foram de 0,01% e de 0,05%, valores inferiores aos encontrados no presente estudo, que foram superiores a 2,5%, para alecrim e 1,25%, para sálvia.

As variações verificadas nas concentrações inibitórias dos óleos essenciais apontadas nos diferentes estudos podem ser explicadas por diferenças nas composições químicas dos óleos essenciais, causadas, entre outros fatores, por mudanças de localização, variações sazonais e época de colheita. Celiktas et al. (2007), ao compararem valores de CIM do óleo essencial de alecrim proveniente de plantas coletadas em diferentes países e épocas do ano, encontraram valores distintos para *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Assim, a variação nas composições químicas do óleo essencial de alecrim de todos os países pode ser devido a diferentes condições ecológicas que podem influenciar no perfil químico da planta, pois alguns compostos podem ser acumulados em um determinado período, em resposta às condições ambientais, resultando em diferentes atividades biológicas (KAMATOU et al., 2008).

Outras variáveis que podem explicar diferenças de CIM encontradas são as variações entre os métodos de avaliação da sensibilidade bacteriana (metodologia empregada, crescimento antimicrobiano, exposição dos microrganismos ao óleo, a solubilidade do óleo ou de seus componentes e o uso e quantidade de emulsificador) (OPALCHENOVA; OBRESHKOVA, 2003; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999), assim como o local onde o microrganismo foi isolado. Além disso, o agente emulsificador está sujeito a possíveis interações com os óleos essenciais em teste, interferindo na atividade

antibacteriana, bem como possuir atividade antibacteriana. Esses efeitos podem ser acentuados ou minimizados, dependendo do modo de preparo da solução óleo-agente emulsificador (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999). É possível que o agente emulsificador (DMSO, Tween 80%, Tween 20%, entre outros) influencie o crescimento bacteriano ou a permeabilidade da membrana celular, agindo antagônica ou sinergicamente aos componentes ativos (NASCIMENTO et al., 2007). No presente estudo, não foi observada ação inibitória do DMSO, isoladamente, sobre os microrganismos estudados. Outro fator importante se refere à produção de metabólitos secundários pelas plantas, que dependem das condições climáticas, do solo, da época do ano e do horário da coleta. Castro et al. (2007) verificaram que amostras do mesmo tipo de planta, porém provenientes de locais diferentes, apresentam diferentes composições químicas.

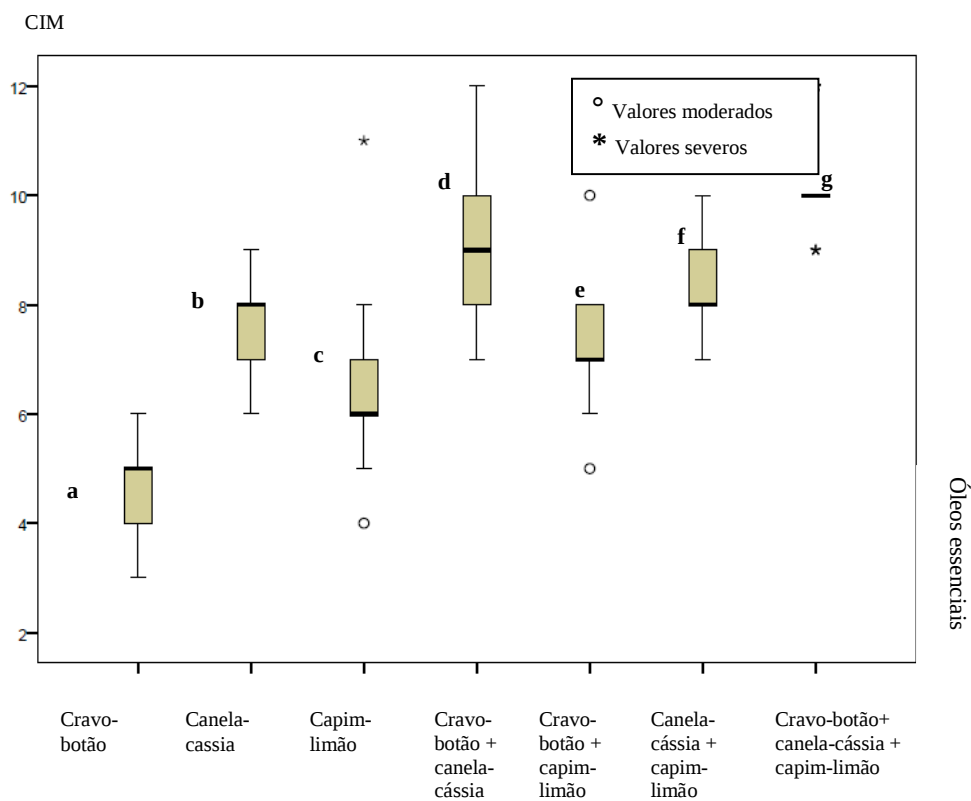
6.2 Concentração inibitória mínima para combinação entre óleos essenciais

Os resultados obtidos para as CIMs nas diferentes combinações dos óleos essenciais estão relacionados na Tabela 4. Nas Figuras 9 e 10 foram representadas as distribuições de CIMs para os óleos essenciais, isoladamente, e das associações entre os mesmos. Todas as associações testadas resultaram em sinergismo na ação inibitória contra *S.aureus* e *S. agalactiae*.

Tabela 4 Valores das medianas dos CIMs, expressos para *S. aureus* e *S. agalactiae* isolados de mastite clínica e subclínica, obtidos a partir da combinação dos óleos essenciais de cravo-botão, canela-cássia e capim-limão.

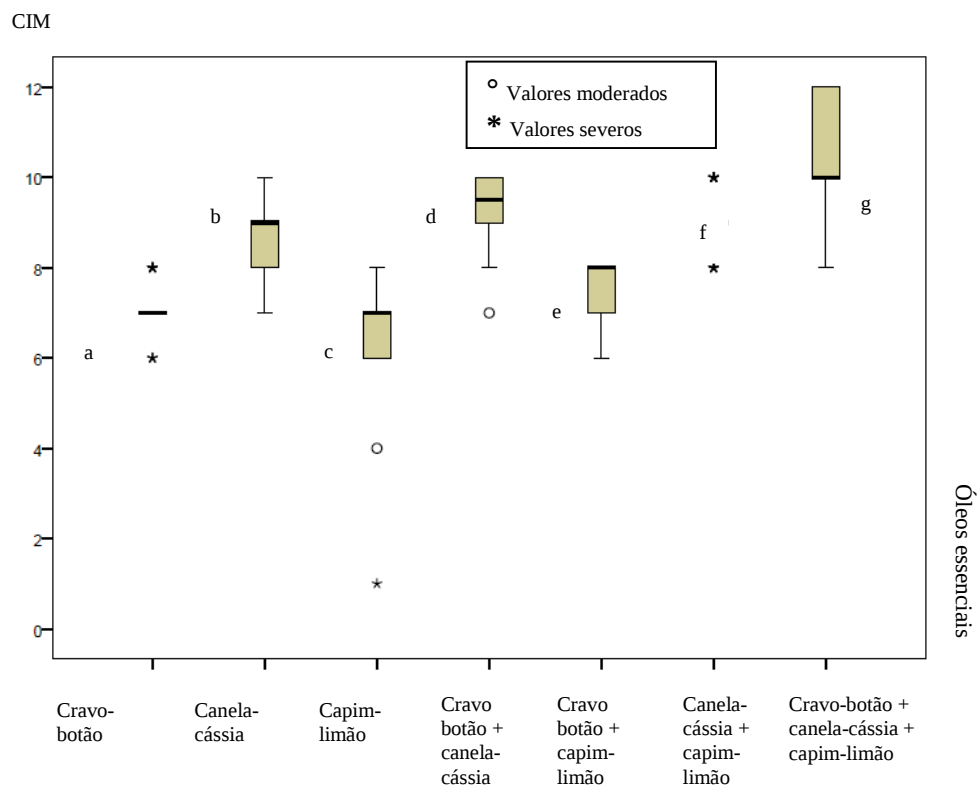
Associação dos óleo essencial	CIM	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>
Cravo-botão	0,3125%	0,078125%
Canela-cássia	0,03906%	0,01953%
Capim-limão	0,15625%	0,078125%
Cravo-botão e canela-cássia	0,01953%	0,01953%
Cravo-botão e capim-limão	0,078125%	0,03906%
Canela-cássia e capim-limão	0,03906%	0,03906%
Cravo-botão, canela-cássia e capim-limão	0,0097%	0,0097%

Para os isolados de *S. aureus*, a variabilidade na distribuição das CIMs foi relativamente pequena. Para *S. agalactiae*, também foi observado sinergismo nas combinações entre canela-cássia, capim-limão e cravo-botão, porém, com grande variabilidade na distribuição das CIMs; nas combinações de canela-cássia e cravo-botão, embora apresentassem menor efeito sinérgico, a variabilidade na distribuição dos valores de CIM foi praticamente nula. As demais associações também apresentaram efeito sinérgico, variando nas distribuições das CIMs, como demonstrado nas Figuras 9 e 10.



Legenda: valores de CIM: 1: > 2,5%; 2: 2,5%; 3: 1,25%; 4: 0,625%; 5: 0,3125%; 6: 0,15625%; 7: 0,0781%; 8: 0,03906%; 9: 0,0195%; 10: 0,0097%; 11: 0,0048%; 12: < 0,0048%.

Figura 9 Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada combinação de óleos essenciais (box-plot) sobre *S. aureus* isolado de mastite clínica e subclínica. Distribuições seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$).



Legenda: Valores de CIM: 1: > 2,5%; 2: 2,5%; 3: 1,25%; 4: 0,625%; 5: 0,3125%; 6: 0,15625%; 7: 0,0781%; 8: 0,03906%; 9: 0,0195%; 10: 0,0097%; 11: 0,0048%; 12:< 0,0048%.

Figura 10 Concentração inibitória mínima (CIM) observada para cada combinação de óleos essenciais (box-plot) sobre *S. agalactiae* isolado de mastite clínica e subclínica. Distribuições seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p>0,05$).

A análise multivariada de componentes principais (PCA), confirmando os resultados observados neste estudo, mostra graficamente a ocorrência de sinergismo nas associações ensaiadas. As combinações envolvendo o óleo essencial de canela-cássia resultaram na potencialização dos efeitos dos óleos essenciais de capim-limão e cravo-botão na inibição dos isolados de *S. aureus* (Figura 11) e *S. agalactiae* (Figura 12), uma vez que a potência das combinações é inversamente proporcional ao valor de CIM. Vetores apontando para a mesma direção de 1/CIM indicam sinergismo entre as combinações, revelando maior potencialidade do óleo essencial de canela-cássia.

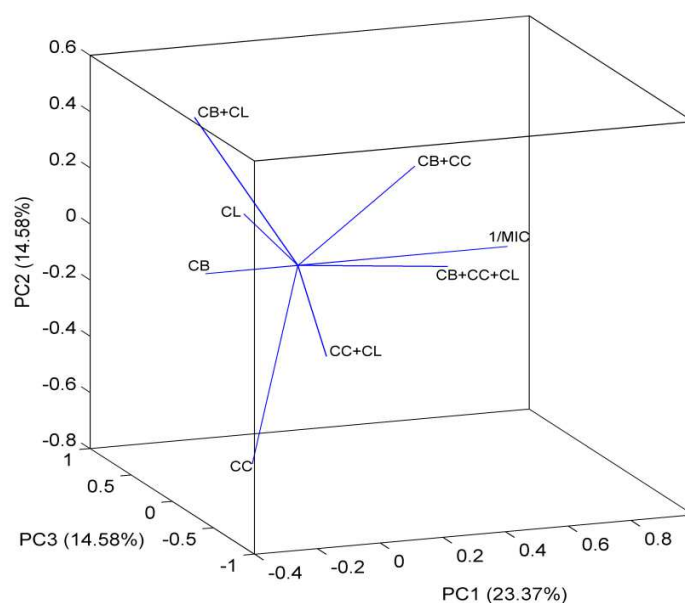


Figura 11 Análises de componentes principais (PCA) das combinações dos óleos essenciais de canela-cássia (CC), cravo-botão (CB) e capim-limão (CL) sobre *S.aureus* isolado de mastite clínica e subclínica.

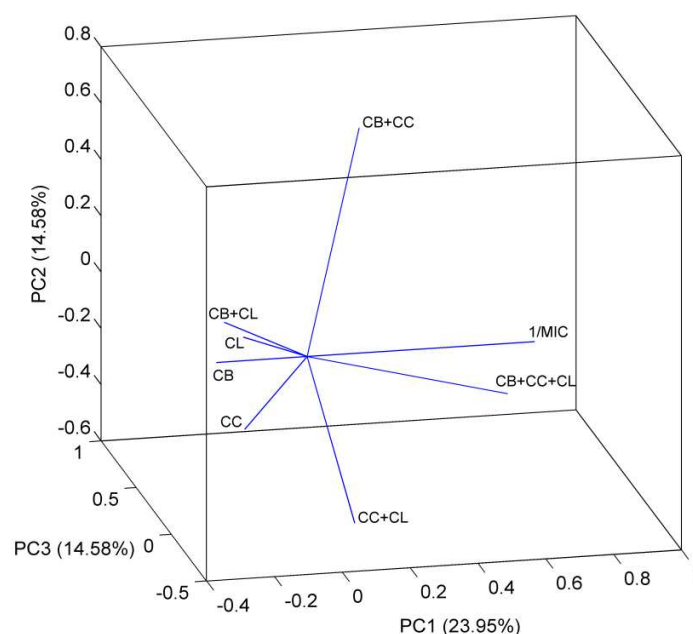


Figura 12 Análises de componentes principais (PCA) das combinações dos óleos essenciais de canela-cássia (CC), cravo-botão (CB) e capim-limão (CL) sobre *S.agalactiae* isolado de mastite clínica e subclínica

Pereira et al. (2008), utilizando método de diluição em ágar, estudaram o efeito sinérgico entre os óleos de capim-limão, orégano e cravo-da-índia e observaram que não houve variação significativa entre a combinação e o comportamento individual dos óleos, constatando que não ocorreu sinergismo entre os mesmos.

Novacosk e Torres (2006) pesquisaram o sinergismo entre os óleos essenciais isolados e na mistura de lavanda (*Lavandula officinales*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus virginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*), pelo método de microdiluição em

caldo e observaram uma elevação importante na atividade antibacteriana na mistura dos óleos essenciais, comparativamente aos óleos isolados.

As propriedades biológicas dos óleos essenciais podem ser o resultado de uma sinergia de todas as moléculas ou apenas das principais moléculas presentes em concentrações mais elevadas. Geralmente, os componentes principais refletem em suas características biofísicas e biológicas e a amplitude dos seus efeitos depende da sua concentração, quando testados isolados ou incluídos em óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

Embora a maior atividade dos óleos essenciais tenha sido relatada nas misturas de seus componentes principais (GILL et al., 2002; MOUREY; CANILLAC, 2002), a combinação desses componentes majoritários com outros constituintes com atividade mais fraca pode resultar em efeito sinérgico, aditivo ou antagonista, dependendo do microrganismo em teste (ULTEE et al., 2000).

Um efeito aditivo é observado quando o efeito combinado é igual à soma dos efeitos individuais. O sinergismo é observado quando o efeito das substâncias combinadas é maior do que a soma dos efeitos individuais. O antagonismo é observado quando o efeito da combinação (associação) dos compostos é menor que quando eles são testados individualmente (DAVIDSON; PARISH, 1989).

Existem alguns mecanismos geralmente aceitos de interação antimicrobiana que produzem sinergismo como a inibição de uma via bioquímica comum de inibição de enzimas protetoras, assim como as combinações de agentes ativos na parede celular, que facilitam a absorção de outros agentes antimicrobianos (SANTIESTEBAN-LOPEZ; PALOU; LÓPEZ-MALO, 2007). Mecanismos de interação antimicrobiana que produzem antagonismo são menos conhecidos, porém, tem sido sugerido que a solubilidade aquosa é um fator que limita a atuação de compostos hidrofóbicos

que podem se acumular em níveis letais nas membranas celulares (COX; MANN; MARKHAM, 2001).

A concepção de sinergismo tem sido o tema central de muitas discussões em fitoquímica. A interação entre óleos essenciais pode representar uma alternativa para a potencialização da ação dos mesmos, porém, muito ainda precisa ser esclarecido (PEREIRA et al., 2008).

A ocorrência de sinergismo entre os óleos testados, embora careça de estudos mais detalhados, pode possibilitar espectro mais amplo da ação dos mesmos contra diferentes microrganismos e a redução da concentração dos óleos essenciais nos produtos comerciais que venham a ser desenvolvidos para estes fins, minimizando possíveis efeitos adversos que estes possam apresentar, quando utilizados em concentrações mais elevadas.

7 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de canela, cravo-botão, capim-limão, tomilho-branco e citronela têm grande potencial inibidor frente a *S. aureus* e *S. agalactiae*, apresentando-se como alternativa a ser avaliada *in vivo* para o tratamento das infecções intramamárias ocasionadas por estes agentes em bovinos.

Observou-se a potencialização do efeito antimicrobiano das combinações dos óleos de canela-cássia, capim-limão e cravo-botão, para ambos os agentes testados.

Houve diferenças no efeito antibacteriano entre os óleos essenciais de cardamomo e sálvia para os isolados de *S. agalactiae* obtidos de casos clínicos em relação aos obtidos de casos subclínicos.

REFÊRENCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual clinical and Laboratory Standards Institute**. Brasília, 2008. (CLSI - antigo NCCLS).

AIEMSAARD, J. et al. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Research in Veterinary Science**, London, v. 91, n. 3, p. 31–37, Dec. 2011.

AL-BAYATI, F. A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 116, n. 3, p. 403–406, Mar. 2008.

AL-SEREITI, M. R.; ABRU-AMER, K. M.; SEM, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus offi cinalis* Linn) and its therapeutic potentials. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhy, v. 37, n. 2, p. 124-130, Feb. 1999.

ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidantes e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 3999-3408, 2012.

BAGAMBOULA, C. F. et al. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *S. cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *S. multicaulis* (Vahl.). **Food Chemistry**, London, v. 84, n. 4, p. 519-525, 2004.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

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

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common fragrance and flavor materials**: preparation, properties and uses. Einheim: Wiley-VCH, 2001. 293 p.

BENEDETTE, M. F. et al. Mastite bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 6, n. 11, p. 1-5, jul. 2008. Disponível em:

<http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/s8Qkxdp3ibXOROS_2013-6-13-15-52-55.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2012.

BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1990. 1324 p.

BLOOD, D. C.; RADOSTITIS, O. M. **Clínica veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 15, p. 424-463.

BOUCHOT, M. C. et al. Diagnostic bacteriologique des infections mammaires des bovins. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, Paris, v. 19, p. 567-577, 1985.

BRIOZZO, J. et al. Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 66, n. 1, p. 69-75, Jan. 1989.

BRUGNERA, D. F.; LIVEIRA, M. M. M.; PICCOLI, R. H. Essential oils of *cymbopogon* spp. in the control of foodborne pathogenic bacteria. **Alimentos e Nutrição: brazilian journal of food nutrition**, Marília, v. 22, n. 3, p. 339-343, jul./ set. 2011.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CAETANO, M. S. S. G. et al. **Colonização pelo Streptococcus agalactiae (EGB) em gestantes atendidas na rede pública de Uberaba-MG**. 2008. 78 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Clínica) -Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2008.

CAL, K. Skin penetration of terpenes from oils and tropical vehicles. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 72, n. 4, p. 311-316, Mar. 2006.

CARDOSO, M. da G. et al. Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry (cravo-da-índia). **Tecnológica**, Santa Cruz do Sul, v. 11, n. 1, p. 11-14, jan./dez. 2007.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. Staphylococcus aureus bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 9, n. 1, p. 70-76, Feb. 2005.

CASTRO, H. G. et al. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**: brazilian journal of medicinal plants, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 55-61, 2007.

CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 2, p. 553-559, 2007.

CENTORBI, O. N. P. Prevalência de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis subclínica bovina em tambos de la cuenca lechera de la ciudad de San Luis. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 24, n. 2, p. 73-80, abr./jun. 1992.

CHANG, S. T.; CHEN, P. F.; CHANG, S. C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 77, n. 1, p. 123-127, Sept. 2001.

CODD, L. E. W. **Lamiaceae**: flora of southern Africa. Pretoria: Botanical Research Institute, 1985. v. 28.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, C. L.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.162 p.

CORREIA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. 747 p.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada do CRMV- SP**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 3-9, 1998.

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R. Infecções intramamárias em novilhas primíparas no período pré ao pós-parto e sua importância no controle de mastite. **Napgama**, São Paulo, n. 1, p. 16-20, 1999.

COSTA, J. G. M. et al. Estudo químico- biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 304-309, out./dez. 2005.

COUTINHO, D. A. et al. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 7, n. 2, p. 139-151, 2006.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 492–497, 2001.

CREMONESI, P. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, London, v.19, n. 5, p. 299-305, Oct. 2005.

DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technology**, Chicago, v. 43, n. 1, p. 48–155, Jan. 1989.

DELAMARE, A. P. L. et al. Antibacterial activity of essential oils of *Sálvia officinalis* L. and *Sálvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 2, p. 603-608, 2007.

DENYER, S. P. Mechanisms of action of antibacterial biocides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 36, n. 3-4, p. 227–245, Oct./Dec.1995.

DHULAP, S.; ANITA, M.; HIRWANI, R. R. Phyto-pharmacology of *Elettaria cardamomum*. **Pharmacognosy Reviews Supplement**, v. 2, n. 4, p. 27-35, 2008.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced **Journal Agricultural Food Chemistry**, London, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, Apr. 2006.

DIAS, R. S.; DUARTE, V. S.; FAVARO, V. L. R. Conscientização dos produtores de leite da zona da mata mineira sobre métodos de prevenção da mastite bovina e isolamento dos seus agentes etiológicos. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, Viçosa, MG, v. 1, n. 2, p. 96-100, 2011.

DJEDDI, S. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 43, n. 4, p. 487-490, 2007.

DWECK, A. C. The folklore and cosmetic use various *sálvia* species. In: KINTZIOS, S. E. (Ed.). **Sage: the genus sálvia**. [S. l.]: Harwood Academic, 2000. p. 1-25.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, London, v. 10, n. 1 p. 76-82, Sept. 2008.

FABIO, A. et al. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. **Phytotherapy Research**, London, v. 21, n. 4, p. 374-377, 2007.

FERNANDES, J. C. T. et al. Agentes etiológicos de mastite bovina no RS no período 1952-1989. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, Porto Alegre, n. 20, p. 151-163, 1992.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. 1. ed. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.

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*. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 17, n. 4, p. 552-559, 2010.

FONTELES, M. C.; FERREIRA, M. S. C. Aspectos etnobotânicos e farmacológicos do *Cymbopogon citratus* Stapf (capim-limão). **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 4, p. 94-97, 1989.

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

GILL, A. O. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 83-92, Feb. 2002.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 10, p. 5750-5755, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2007.

GUSTAFSON, J. E. Effects of tea tree oil essential on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 194-198, 1998.

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

HEDGE, I. C. **Revision of *Sálvia* in Africa including Madagascar and the Canary Islands**. Royal Edinburgh: Botanic Garden Edinburgh, 1974. v. 33 (Notes, 1).

HORNE, D. et al. Antimicrobial effects of essential oils on *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 13, n. 5, p. 387-392, 2001.

HU, T. W.; LIN, Y. T.; HO, C. K. Natural variation of chemical components of the leaf oil of *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. **Bulletin of Taiwan Forestry Research Intustry New Series**, Taiwan, v. 78, p. 1-18, 1985.

IMELOUANE, B. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. **International Journal Agricultural Biology**, v. 11, n. 2, p. 205-208, 2009.

IPEK, E. et al. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. **Food Chemistry**, London, v. 93, n. 3, p. 551-556, Dec. 2005.

JAKIEMIŲ, E. A. R. et al. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 683-688, 2010.

JAMAL, A. et al. Gastroprotective effect of *Elettaria cardamomum* Maton, fruits and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 103, p.149-153, 2006.

JIANG, Y. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 63-68, July 2011.

KAMATOU, G. P. P. et al. Seasonal variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three South African

Sálvia species. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 74, n. 2, p. 230-237, Apr. 2008.

KAMATOU, G. P. P. et al. South African Sálvia species: a review of biological activities and phytochemistry. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 119, n. 3, p. 664-672, Oct. 28 2008.

KONG, Q. L. et al. Natural antifungal compounds from *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry. **Acta Agriculturae Shanghai**, Shanghai, v. 20, p. 68–72, 2004.

KUBO, I.; HIMEJIMA, M.; MUROI, H. Antimicrobial activity of flavor components of cardamom *elattaria-cardamomum* (zingiberaceae) seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 1984-1986, 1991.

KUZ'MA, L. et al. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Sálvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agente antibiotic resistant *Staphylococci*. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, Jena, v. 14, n. 1, p. 31-34, Jan. 2007.

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

LERTSATITTHANAKORN, P. et al. Effect of citronella oil on time kill profile, leakage and morphological changes of *propionibacterium acnes*. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 22, n. 3, p. 270-274, May/June 2010.

LEWIS, K. Riddle of biofilme resistance antimicrob. **Agents Chemother**, v. 45, p. 999-1007, 2001.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, p. 197-201, 2006.

LOPEZ, P. et al. Solid and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6939–6946, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odesa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LOWY, F. D. et al. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, n. 8 p. 341-344, Aug. 2000.

MALTI, E. J.; MOUNTASSIF, D.; AMAROUCH, H. Antimicrobial activity of *Elettaria cardamomum*: Toxicity, biochemical and histological studies. **Food Chemistry**, London, v. 104, p. 1560-1568, 2007.

MARÔCO, J. **Análise estatística com o PASW Statistics**. 2010. 953 p. (Report Number.).

MAY, A. et al. Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 379-382, 2008.

MACHADO, T. R. O.; CORREA, M. G.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitis cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 1, p. 278-282, 2008.

MENEZIES, P. I.; RAMANOON, S. Z. Mastitis of sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 17, n. 2, p. 333-358, 2001.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, p. 9252-9287, Dec. 2010.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 399-406, 2007.

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 4-5, p. 289-292, June/July 2002.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S. **Microbiologia médica**. Amsterdam: Elsevier, 2006. 1072 p.

NAKAHARA, K. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (citronella grass). **JARQ: japan Agricultural Research Quarterly**, Tokyo, v. 37, p. 249-252, 2003.

NASCIMENTO, F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 108-113, jan./mar. 2007.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 56, n. 4, p. 519-523, Apr. 2007.

NOVACOSK, R.; TORRES, R. S. L. A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus virginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Revista Analytica**, São Paulo, v. 21, p. 36-38, fev./mar. 2006.

NIMJE, P. D. et al. Comparison of antimicrobial activity of *Cinnamomum zeylanicum* and *Cinnamomum cassia* on food spoilage bacteria and water borne bacteria. **Der Pharmacia Lettre**, v. 5, p. 53-59, 2013.

NUNES, C. A. **Chemoface software**: versão 1.4. Lavras: UFLA, 2012. Software.

OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**: chemistry, biochemistry, molecular biology, New York, v. 65, n. 24, p. 3249-3254, Dec. 2004.

OPALCHENOVA, G.; OBRESHKOVA, D. Comparative studies on the activity of basil - an essential oil from *Ocimum basilicum* L. - against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 54, n. 1, p. 105-110, July 2003.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, Barking, v. 73, n. 2, p. 236-244, June 2006.

PARDUMAN, R. S. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus* **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 179, n. 2-3, p. 160-168, May 2009.

PEREIRA, A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Graça, v. 9, n. 16, p. 1-28, jan. 2011. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/5birfPwQOBxdHFp_2013-6-26-11-19-44.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2013.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Winning the fight against mastitis**. Naperville: Westfalia-Surge, 2000. 188 p.

POZZO, M. D. et al. Activity os essential oil from spices agains *Staphylococcus* spp isolated from bovine mastites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 5, p. 1229-1232, 2011.

POZZO, M. D. et al. Antibacterial activity of essential oil of cinnamon and trans-cinnamaldehyde against *Staphylococcus* spp. isolated from clinical mastitis of cattle and goats. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 40, n. 4, pub. 1080, p. 1-5, Aug. 2012.

PRASHAR, A. et al. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**: chemistry, biochemistry, molecular biology, New York, v. 63, n. 5, p. 569–575, July 2003.

RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary medicine**: a textbook of the diseases of catle, sheep, pigs, goats and horses. 10. ed. Oxford: Saunders, 2006. 206 p.

RAVINDRAN, M. K. **Cardamom**: the genus Elettaria. New York: Taylor and Francis, 2006. 276 p.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**: brazilian journal of medicinal plants, Botucatu, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RUSSELL, A. D.; CHOPRA, I. **Understanding antibacterial action and resistance**. [S. l]: Ellis Horwood, 1996. 292 p.

SANTIESTEBAN-LOPEZ, A.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Susceptibility of foodborne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w)

and pH. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, n. 2, p. 486–497, Feb. 2007.

SANTOS, E. M. P. et al. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 1, p. 17-27, 2007.

SCHWIERTZ, A. et al. In vitro activity of essential oils on microorganisms isolated from vaginal infections. **The International Journal of Aromatherapy**, New York, v. 16, n. 3-4, p. 169–174, 2006.

SIKKEMA, J.; DEBONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, June 1995.

SILVA, M. V. M.; ARAÚJO, K. P. C. Mastite e qualidade do leite. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**, Belo Horizonte, p. 20–23, out./dez. 2008.

SILVA, M.V. M. et al. A mastite interferindo no padrão de qualidade do leite: uma preocupação necessária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 3, n. 14, p. 1- 10, jan. 2010. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/ExJ4wrjaJDV2xTJ_2013-6-25-15-12-5.pdf>. Acesso em: 10 maio 2013.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 5, p. 589-594, set./out. 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

SINGH, G. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and various oleoresins of *Elettaria cardamomum* (seeds and pods). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, n. 2, p. 280-289, Jan. 2008.

SUZUKI, H.; FLEMMING, J. S.; TRAAD, M. E. Uso de óleos essenciais na alimentação de leitões. **Revista Acadêmica**: ciências agrárias ambientais, Curitiba, v. 6, n. 4, p. 519-526, out./dez. 2008.

TAWATSIN, A. et al. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 26, n. 1, p. 76-82, June 2001.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, June 2005.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, Apr. 2002.

ULTEE, A. et al. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 174, n. 4, p. 233-238, Oct. 2000.

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

ZAFALON, L. F. et al. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 577-585, jun. 2007.