

# AValiação DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *EUGENIA UNIFLORA* SOBRE MICRORGANISMOS CAUSADORES DA MASTITE BOVINA

*EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF ESSENTIAL OIL FROM EUGENIA UNIFLORA ON BOVINE MASTITIS CAUSING BY MICROORGANISMS*

Gabriela Vianna<sup>1</sup>, Marcella Raquel Burin<sup>1</sup>, Vanessa Backes Nascimento Diel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bacharéis do curso de Ciências Biológicas da URI, Santo Ângelo, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Bióloga, mestre em Genética Molecular, docente do curso de Ciências Biológicas da URI, Santo Ângelo, RS, Brasil.

## RESUMO

A mastite bovina é um problema comum em ordenhas, caracterizada por uma infecção no úbere e pode ser causada por uma diversidade de microrganismos, como o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus agalactiae*. Atualmente, a adoção de terapias alternativas, por meio de fitoterápicos, tem sido explorada como forma de auxiliar no tratamento, principalmente, associando-se o uso de óleo essencial como inibidor de crescimento bacteriano ou potencializador. A *Eugenia uniflora* (Pitangueira) é uma árvore nativa do Brasil que possui potencial antibacteriano. Este estudo teve por objetivo realizar a extração do óleo volátil e hidrolato da *E. uniflora*, para testar seu potencial antimicrobiano sobre microrganismos isolados de amostras de leite de vacas clinicamente diagnosticadas com mastite. A extração dos metabólitos secundários foi realizada por meio da destilação em Clevenger, para o isolamento dos microrganismos utilizou-se a placa *AccuMast*<sup>®</sup> Plus e, para os testes de antibiograma, utilizou-se discos contendo óleo, hidrolato e associações destes com diferentes antibióticos em placas semeadas com *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Os resultados foram analisados por meio da medida dos halos de inibição e comparações estatísticas. Percebeu-se que tanto o óleo essencial, quanto o hidrolato não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano, porém agiram como potencializadores dos antibióticos.

**Descritores:** Antibiograma; Óleos voláteis; Controle microbiológico.

## ABSTRACT

*Bovine mastitis is a common problem in milking, characterized by an infection in the udder and can be caused by a variety of microorganisms, such as Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae. Currently, the adoption of alternative therapies, through phytotherapeutics, has been explored as a way to aid in the treatment, mainly by associating the use of essential oil as a bacterial growth inhibitor or enhancer. Eugenia uniflora (Pitangueira) is a tree native to Brazil that has antibacterial potential. This study aimed to extract volatile oil and hydrolate from E. uniflora, to test its antimicrobial potential on microorganisms isolated from milk samples from cows clinically diagnosed with mastitis. The extraction of secondary metabolites was performed by means of Clevenger distillation, for the isolation of microorganisms, the AccuMast® Plus plate was used, and for the antibiogram tests, disks containing oil, hydrolate and their associations with different antibiotics were used. plaques seeded with Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae. The results were analyzed by measuring the inhibition zones and statistical comparisons. It was noticed that both the essential oil and the hydrolate were not able to inhibit bacterial growth, but acted as potentiators of antibiotics.*

**Descriptors:** Antibiogram; Volatile oils; Microbiological control.

## Introdução

O leite possui alto valor nutricional, sendo considerado um alimento completo<sup>1</sup>. Além disso, devido ao seu caráter nutritivo, é um possível meio de cultura eficaz para a reprodução de microrganismos<sup>2</sup>. O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, sendo responsável por gerar empregos, renda e tributos<sup>3</sup>. A cadeia produtiva necessita diversos cuidados, principalmente em relação à limpeza do local de ordenha, armazenamento e saúde dos animais, uma vez que esses processos influenciam diretamente na qualidade e quando feitos de forma inadequada propiciam a proliferação de microrganismos<sup>3</sup>.

O risco de contaminação bacteriana por meio do úbere aumenta durante o processo de ordenha e pode ocorrer por meio das mãos do manipulador ou pelos equipamentos de coleta do leite, bem como, pelos tambores e baldes que podem estar mal higienizados, aumentando ainda mais os riscos de contaminação e desenvolvimento de mastite<sup>1</sup>. A mastite bovina consiste na inflamação da glândula mamária do animal, sendo ocasionada por problemas fisiológicos ou metabólicos, traumas, alergias e infecções<sup>4</sup>.

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno frequentemente associado, sendo uma das bactérias mais comuns que causam esta doença<sup>5</sup>. Além disso, observa-se que os microrganismos estão cada vez mais resistentes aos fármacos utilizados para o seu tratamento<sup>6</sup>. Dessa forma, terapias alternativas, como as que utilizam metabólitos secundários de plantas medicinais podem auxiliar no tratamento da mastite, crescendo em importância<sup>7</sup>. A utilização de óleos essenciais em terapias alternativas mostra-se promissora, uma vez que possuem princípios ativos, que a planta produz naturalmente para conferir proteção, atração de polinizadores e efeito alelopático<sup>8</sup>, e que são explorados também por seus efeitos farmacológicos<sup>9</sup>.

A *Eugenia uniflora* pertence à família Myrtaceae, e é conhecida por suas propriedades terapêuticas, como ação antibacteriana e antioxidante<sup>10</sup>. Sendo assim, a presente pesquisa tem por objetivo extrair e testar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *E. uniflora* sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, isoladas de amostras de leite de vacas clinicamente diagnosticadas, com o intuito de avaliar a inibição do crescimento por meio do óleo puro e/ou associado a antibióticos.

## Metodologia

### *Coleta e Identificação da Amostra Vegetal*

Foram feitas duas coletas de folhas de *Eugenia uniflora* no campus da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, (-28.276731854749436, -54.270643145437624), localizada no município de Santo Ângelo, no Rio Grande do Sul, em setembro de 2021. Foi preparada uma exsiccata das folhas para identificação e catalogação no Herbário Padre Balduino Rambo (HPBR), localizado na cidade de Erechim, RS.

### *Método de Extração do Óleo Essencial*

A extração do óleo essencial foi realizada em duas etapas no laboratório de Farmacognosia da URI de Santo Ângelo, por meio do método de hidrodestilação em aparelho graduado de Clevenger<sup>11</sup>. Na primeira extração, feita em duplicata, utilizou-se 70 g das folhas da pitanga, que foram picadas e maceradas, adicionadas a um balão volumétrico com 300 ml de água purificada, mantido sob aquecimento a 75 °C por aproximadamente 4 h. O óleo essencial e o hidrolato resultantes do processo foram separados na torneira do destilador e armazenados em frasco âmbar e conservados em freezer para posterior uso. Devido à pouca quantidade de óleo obtida no primeiro processo, uma nova coleta para extração foi realizada. Desta vez a extração foi feita em triplicata e em cada processo foram utilizadas 100 g de folhas trituradas em liquidificador e que seguiram os mesmos passos já descritos anteriormente.

### *Isolamento e Identificação do Microrganismo*

Para o isolamento dos microrganismos de interesse foram recebidas duas amostras de leite de vacas clinicamente diagnosticadas com mastite pelo proprietário, oriundas de leitarias localizadas na região noroeste do Rio Grande do Sul. As amostras foram misturadas e para a identificação e isolamento das bactérias utilizou-se as placas *AccuMast® Plus*, que são meios cromogênicos úteis na identificação de bactérias presentes na mastite bovina através do meio seletivo. O swab foi imerso no leite e espalhado nas placas, fazendo estrias em três direções, o material foi acondicionado em estufa bacteriológica, com temperatura de 37°C por 24 horas para interpretação no dia seguinte. Nas placas foram identificadas a presença de *Staphylococcus*

*aureus* e a *Streptococcus agalactiae* (figura 1), que são bactérias de interesse clínico para o presente estudo. O material isolado foi armazenado na geladeira até o preparo dos meios de cultura adequados para o repique dos mesmos.

Figura 1 - Resultado do isolamento dos microrganismos da amostra de leite nas placas *AccuMast® Plus*



Todo material utilizado, assim como as placas de Petri, pinças, espátulas e béqueres foram embalados em papel pardo e esterilizados em estufa. Os meios de cultura e a água peptonada foram esterilizados em autoclave e os discos de papéis em luz UV por 15 minutos. No laboratório de Microbiologia da URI de Santo Ângelo foram preparados dois meios de cultura diferentes para a testagem do potencial antimicrobiano. Primeiramente, foi produzido o meio de cultura ágar sangue, no qual foi utilizado ágar-ágar e sangue humano, destaca-se que o sangue foi adicionado após a esterilização, e assim que adicionado o meio foi imediatamente plaqueado e armazenado na geladeira. Para a testagem antimicrobiana foi preparado o Ágar Mueller Hinton (MH), por ser amplamente utilizado em testes de antibiograma.

Para o repique em ágar sangue do *Staphylococcus aureus* e do *Streptococcus agalactiae* foi utilizado swab umedecido em água destilada e as bactérias isoladas na placa *AccuMast® Plus*. O material foi semeado e armazenado em estufa bacteriológica a 37°C por 2 dias para crescimento. Para a padronização das culturas de *S. aureus* e do *S. agalactiae* respectivamente, foi medida a turbidez em escala de Mc Farland em 4 tubos de ensaios, contendo 3ml de água peptonada. No primeiro tubo foi adicionada uma alçada do microrganismo, no segundo tubo duas alçadas e assim sucessivamente até o quarto tubo. A turbidez dos tubos com as bactérias foi comparada a escala, sendo o tubo 3 o que atingiu a turbidez desejada, na qual entende-se que naquela solução encontram-se  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

Para análise confirmatória de que os isolados tratavam-se de bactérias gram positivas, também foi realizada a técnica de coloração-gram. Neste procedimento, com o auxílio de uma alça de platina, retirou-se uma amostra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* para

esfregaço em lâmina, fixação e coloração com violeta cristal, lugol, água, acetona e fucsina. O material preparado para visualização em microscópio óptico e apresentou a coloração azulada, pertinente às bactérias gram-positivas.

### *Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos*

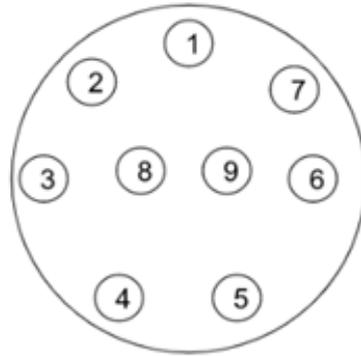
Para a avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi utilizado o teste de disco-difusão em ágar descrito em 1966 por Bauer e Kirby<sup>12</sup>, realizado em triplicata, em placas de 150x25mm, para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* nos meios Ágar Sangue e Ágar Mueller Hinton. Cada placa recebeu 9 tratamentos (tabela 1) (figura 2) e foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C para posterior observação. A observação dos resultados ocorreu em 24h, 48h e 72h, foram medidos os halos de inibição e registrado os resultados em fotografias.

Tabela 1: Discos para o teste de susceptibilidade (TSA)

Discos	Ágar Sangue - <i>S. aureus</i> e <i>S. agalactiae</i>	Ágar Mueller Hinton - <i>S. aureus</i>	Ágar Mueller Hinton - <i>S. agalactiae</i>
1	15µL de água purificada	15µL de água purificada	15µL de água purificada
2	15µL de óleo essencial	15µL de óleo essencial	15µL de óleo essencial
3	15µL de hidrolato	15µL de hidrolato	15µL de hidrolato
4	Gentamicina*	Gentamicina*	Ampicilina*
5	Norfloxacino*	Norfloxacino*	Sulfazotrim*
6	Gentamicina* + 15µL de óleo essencial	Gentamicina* + 15µL de óleo essencial	Ampicilina* + 15µL de óleo essencial
7	Norfloxacino* + 15µL óleo essencial	Norfloxacino* + 15µL óleo essencial	Sulfazotrim* + 15µL óleo essencial
8	Gentamicina* + 15µL de hidrolato	Gentamicina* + 15µL de hidrolato	Ampicilina* + 15µL de hidrolato
9	Norfloxacino* + 15µL de hidrolato	Norfloxacino* + 15µL de hidrolato	Sulfazotrim* + 15µL de hidrolato

\*10 microgramas

Figura 2: Disposição dos discos no teste de susceptibilidade.

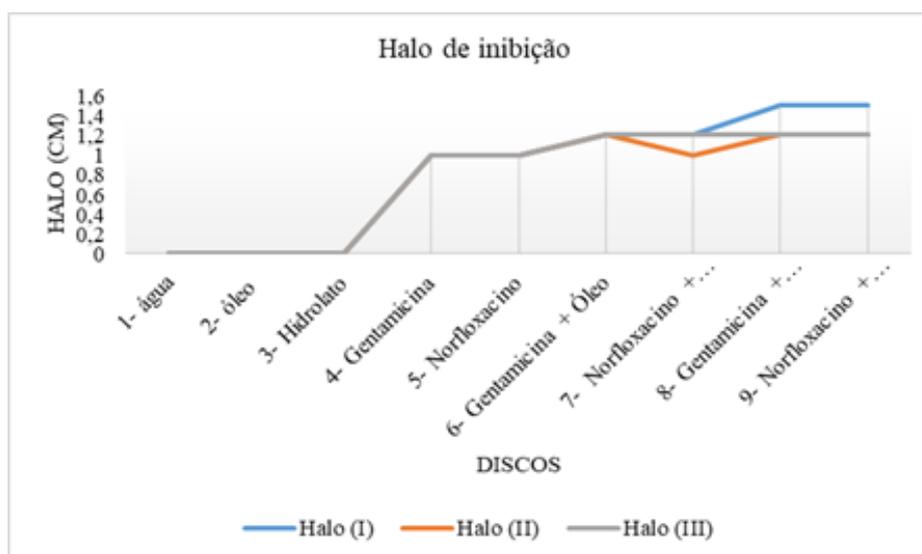


O tratamento estatístico dos dados foi realizado por meio da análise das médias e desvio padrão por meio do Excel, assim como a análise de variância (ANOVA) com o auxílio do *software Palaeontological Statistics (Past)* (desenvolvido por *Oyvind Hammer*).

## Resultados e discussão

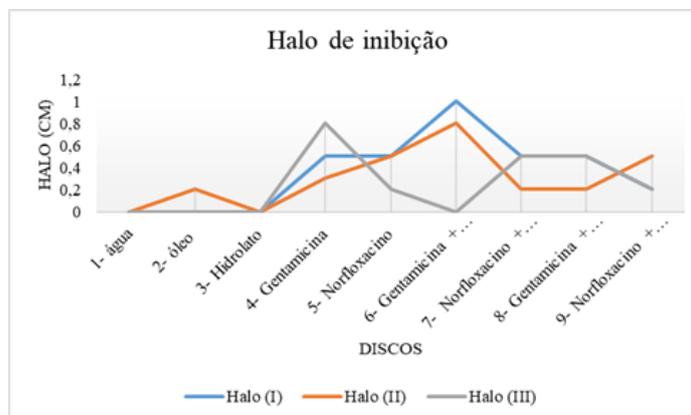
Após o período de 24 horas de incubação observou-se a formação do halo de inibição no entorno dos discos. A primeira testagem foi realizada em meio de cultura ágar-sangue, e nele observou-se que a *Staphylococcus aureus*, tanto para o óleo essencial de *Eugenia uniflora* L., quanto o hidrolato, obtiveram sucesso em potencializar os antimicrobianos utilizados neste estudo (tabela 1). Além disso, os antibióticos Gentamicina e Norfloxacino demonstraram eficácia em inibir o crescimento bacteriano, uma vez que ambos apresentaram halo de inibição (figura 3).

Figura 3: Comparação dos halos de inibição nos testes disco-difusão para *Staphylococcus aureus* em ágar-sangue



Já o microrganismo *Streptococcus agalactiae* não apresentou sensibilidade nem para o óleo ou hidrolato. Além disso, observou-se pouca sensibilidade dos antibióticos testados (figura 4).

Figura 4: Comparação dos halos de inibição nos testes disco-difusão para *Streptococcus agalactiae* em ágar-sangue.

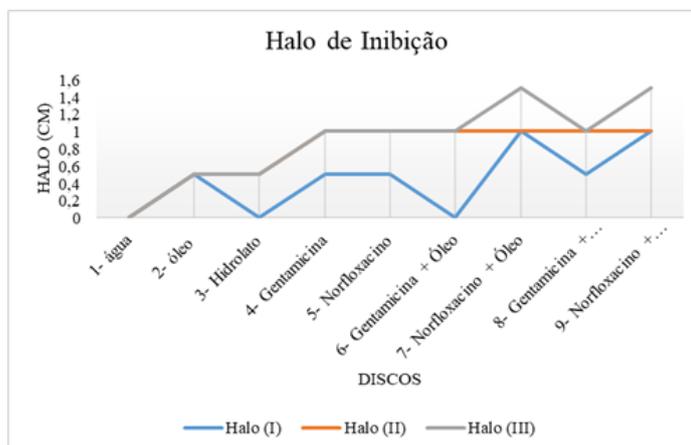


Nas placas com *Streptococcus agalactiae* em meio ágar-sangue observou-se a hemólise do tipo alfa, uma vez que houve perda parcial das hemoglobinas, sendo observado por meio da formação de uma massa cinza-esverdeada ao redor da colônia no ágar. É conhecido que as bactérias do gênero *Streptococcus comensais* em animais são consideradas do tipo alfa hemolítico<sup>13</sup>.

Apesar dos resultados encontrados no meio utilizado, foi preparada uma nova checagem dos tratamentos, só que dessa vez utilizando o meio Mueller Hinton (MH), que é considerado o meio padrão para testagem de antibiograma, principalmente para bactérias do gênero *Staphylococcus*<sup>14</sup>. Além disso, no meio ágar-sangue a observação dos halos não ficou tão evidente, dificultada pelo contraste da cor vermelha e pela hemólise observada no *Streptococcus agalactiae*. O ágar-sangue é considerado rico para o crescimento da maioria dos microrganismos, mas favorece também a percepção de hemólise<sup>15</sup>.

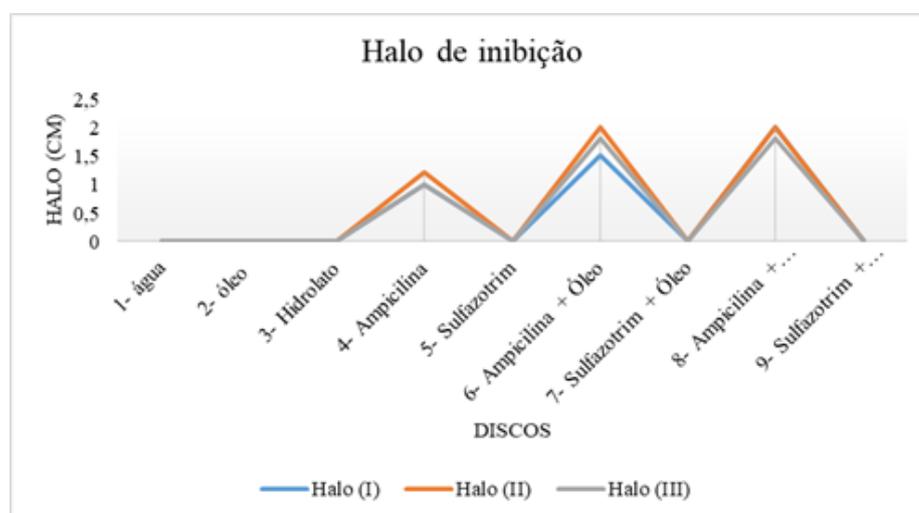
No meio MH observou-se que após 24 horas de incubação não houve formação de halo de inibição em torno *Staphylococcus aureus* tanto para o óleo essencial e quanto para o hidrolato. No entanto, houve um efeito de potencialização do antibiótico associado com o óleo e o hidrolato (figura 5).

Figura 5: Comparação dos halos de inibição nos testes disco-difusão para *Staphylococcus aureus* em meio MH.



Como já havia sido observado halo de inibição nos tratamentos com os antibióticos Gentamicina e Norfloxacino testados em ágar-sangue, em relação à *Streptococcus agalactiae* foi decidido pela mudança dos medicamentos na nova testagem no meio MH, sendo selecionados então a Ampicilina (10 µg), comumente utilizados em antibiogramas, e o Sulfazotrim (25 µg), aconselhado para o tratamento de bactérias do gênero *Streptococcus*. Com essa mudança foi possível perceber um maior halo de inibição para a Ampicilina, com diâmetro médio 1,07 cm, enquanto que para o Sulfazotrim não houve formação de halo (figura 6).

Figura 6: Comparação dos halos de inibição nos testes disco-difusão para *Streptococcus agalactiae* em meio MH.



Nem sempre os antibióticos são eficazes no controle microbiano, por essa razão é importante buscar por alternativas, sendo que no metabolismo secundário das plantas encontramos esse potencial uso<sup>16</sup>. No caso da bactéria *Streptococcus agalactiae*, que teve a maior resistência observada (100%), nem o Sulfazotrim (25µg) inibiu o microrganismo, além disso, não houve efeito de potencialização do medicamento associado com o óleo e hidrolato, isso pode indicar resistência da cepa ao tratamento recomendado por veterinários em casos de mastite. No entanto, o resultado encontrado no presente estudo contrapõe-se a pesquisa realizada por Mesquita<sup>17</sup>, no qual o antibiótico obteve sensibilidade de 85% em relação a esse microrganismo.

Outro aspecto importante percebido nesta pesquisa foi que isoladamente o óleo essencial e o hidrolato de *Eugenia uniflora* L. não inibiram o crescimento bacteriano, porém, quando associados aos antibióticos demonstraram ter capacidade de potencializar o efeito do medicamento antimicrobiano, uma vez que se observou aumento do halo em comparação aos discos tratados apenas com antibiótico (figura 3,4,5 e 6). Este fato pode ser explicado pelos mecanismos de ação dos metabólitos secundários na atividade bacteriana, que podem agir atenuando ou potencializando os medicamentos, e auxiliando no combate de bactérias multirresistentes<sup>18</sup>.

De acordo com os parâmetros disponibilizados pelo *The Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI)<sup>19</sup>, os resultados dos halos podem ser definidos como sensível (S), resistente (R) e intermediário (I). Diante disto, percebe-se que a maioria dos tratamentos realizados neste estudo mostraram-se resistentes ao microrganismo, porém, também ficou evidente que houve aumento da inibição quando o medicamento foi associado ao óleo ou ao hidrolato (tabela 2). Para a comparação estatística dos dados, considerou-se apenas os tratamentos com resultados não nulos, assim comparou-se as médias dos tratamentos T4 a T9. Com a análise de variância, comprovou-se que entre as médias não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ), uma vez que  $p = 0,09$ .

Tabela 2: Comparação entre as médias dos halos de inibição em cada tratamento e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

Discos	<i>Staphylococcus aureus</i> em ágar sangue	<i>Streptococcus agalactiae</i> em ágar sangue	<i>Staphylococcus aureus</i> em Mueller Hinton	<i>Streptococcus agalactiae</i> em Mueller Hinton
4	1 (R)	0,53 (R)	0,83 (R)	1,07 (R)
5	1 (R)	0,4 (R)	0,83 (R)	-
6	1,2 (R)	0,6 (R)	1 (R)	1,77 (S)
7	1,13 (R)	0,4 (R)	1,17 (R)	-
8	1,3 (I)	0,4 (R)	0,83 (R)	1,93 (S)
9	1,3 (I)	0,3 (R)	1,17 (R)	-

A resistência observada nesses microrganismos pode ser de origem genética ou pelo uso indiscriminado de antibióticos no tratamento da mastite. Na prática, dificilmente são realizados testes para identificar a bactéria causadora da infecção, então utiliza-se antibióticos de amplo espectro para o tratamento<sup>20</sup>. Além disso, outro problema que promove a resistência é a utilização de doses elevadas do medicamento sem ser necessário, podendo também causar efeitos colaterais desnecessários no animal e tornar-se inclusive um problema de saúde pública<sup>21</sup>.

## Conclusões

Por meio desta pesquisa foi possível observar o efeito potencializado com o antimicrobiano óleo essencial e hidrolato de *Eugenia uniflora* L. quando associado ao antibiótico, porém, isoladamente, na medida homeopática, não houve efeito inibitório sobre os microrganismos

analisados. Diante disto, é importante testar o óleo e o hidrolato frente a outros microrganismos para avaliar sua propriedade antimicrobiana.

Também é interessante considerar avaliar a constituição do óleo, uma vez que metabólitos secundários são produzidos pela planta em resposta aos estímulos ambientais, então é possível que a planta utilizada neste estudo não tivesse todo o potencial esperado para avaliar esta ação. E por fim, testar a resistência bacteriana dos microrganismos isolados e avaliar os resíduos de antibióticos no leite antes do TSA também podem contribuir para uma melhor avaliação do poder inibitório dos óleos essenciais, e dessa maneira definir o potencial deste produto como um aliado fitoterápico no tratamento de vacas com mastite.

## Referências

1. Jamas LT, Salina A, Rossi R, Menozzi BD, Langoni H. Parâmetros de qualidade do leite bovino em propriedades de agricultura familiar. *Pesq. Vet. Bras.* 2018; 38(4): 573-578.
2. Ferreira AGG, Lyra DG, Silva JCS, Soares FMF, Araújo CA. Perfil dos consumidores de leite bovino in natura no município de Santana do Ipanema – Alagoas. *Revista Eletrônica Nutritime.* 2017; 14(04): 6056-6065.
3. Muller T, Rempel C. Qualidade do leite bovino produzido no Brasil – parâmetros físico-químicos e microbiológicos: uma revisão integrativa. *Vigil. sanit. debate.* 2021; 9(3): 122-129.
4. Massote VP, Zanateli BM, Alves GV, Gonçalves ES, Guedes E. Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. *Revista Agroveterinária do Sul de Minas.* 2019; 1(1):41-54.
5. Lima, ALA et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de leite de vacas com mastite em propriedades de agricultura familiar. *Research, Society and Development.* 2020; 9(11):1-17.
6. Olanda GB, Bevilaqua GAP, Schuch LFD, Prestes LS, Job RB. Estabilidade da atividade antibacteriana do extrato de *Pluchea sagittalis* (LAM.) Cabrera frente a microrganismos causadores da mastite bovina. *Arq. Ciênc. Vet. Zool.* 2019; 22(1):21-25.
7. Krummernaier A, Ponzilacqua B, Zani JL. Atividade antibacteriana de extratos naturais sobre agentes causadores de mastite bovina. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management.* 2019; 14:436-449.
8. Lopes TS. Estudo sobre a ação de óleos essenciais no controle de microrganismos causadores de mastite bovina [Dissertação Mestrado em Biotecnologia]. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul/RS. 2020. Acesso em: 25 mai 2022. Disponível em:

---

< <https://repositorio.ucs.br/xmlui/bitstream/handle/11338/6515/Dissertacao%20Tamiris%20Silva%20Lopes.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.

9. Silva LL, Almeida R, Verícimo MA, Macedo HW, Castro HC. Atividades terapêuticas do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*): uma revisão de literatura. *Brazilian Journal of Health Review*. 2019; 2(6): 6011-6021.
10. Moura GS, Oliveira IJ, Bonome LTS, Franzener G. *Eugenia uniflora* L.: potential uses as a bioactive plant. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2018; 85:1-9.
11. Valentim JA, Soares EC. Extração de Óleos Essenciais por Arraste a Vapor: Um Kit Experimental para o Ensino de Química. *Quím*. 2018; 40(4):297-301.
12. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Técnicas para avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos. 2008. Acesso em: 25 mai 2022. Disponível em: <[https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo5/interpretacao.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/interpretacao.htm)>.
13. Maciel MPAP, Risch ALC, Hoppen LP, Cougo LS, Noble JM, Oliveira KV. Isolamento de streptococcus spp. do tipo alfa hemolítico em uma terneira com artrite séptica. *Anais da 14ª Mostra de Iniciação Científica*. UNICAMP, Bagé/RS. 2017. Acesso em: 25 mai 2022. Disponível em: <<http://revista.uncamp.edu.br/index.php/congregaanaismic/article/view/1507>>.
14. Magalhães TV, Lot RFE, Del Carratore CR. Análise da ação antibacteriana da própolis e padronização de volumes através de antibiograma. *UNIMAR CIÊNCIAS*. 2016; 25(1-2): 38-44.
15. Levy CE. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Salvador. 2004. Acesso em: 25 mai 2022. Disponível em: <[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_microbiologia\\_completo.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf)>.
16. Fabiane KC. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos vegetais de folhas de espécies nativas de Myrtaceae [Dissertação Mestrado em Agronomia]. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco/PR. 2019. Acesso em: 25 mai 2022. Disponível em: <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/4298>>.
17. Mesquita AA. Impacto da mastite bovina por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* [Tese de Doutorado em Produção e Sanidade Animal]. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais/MG. 2017. Acesso em: 25 mai 2022. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/handle/1/28358>>.
18. Bachi AJ. Avaliação antimicrobiana de óleos essenciais e sua capacidade antioxidante em ensaios *in vitro* [Trabalho de Conclusão de Curso Superior em Ciências Biológicas]. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos/PR. 2017. Acesso em: 25 mai 2022. Disponível em: <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/11075>>.

- 
19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada. Edição: 8ª. 2003; 20(1). Acesso em: 25 mai 2022. Disponível em: <[https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf)>.
20. Cades M , Zanini DS , Souza HL , Silva JD , Fink AAB , Muniz IM. Perfil de resistência antimicrobiana de mastite bovina em propriedade leiteira no município de Monte Negro/RO. RBCA. 2017; 6(1): 1-62.
21. Jesus RA, Coutinho CA. Uso de medicamentos homeopáticos para o tratamento da mastite bovina: Revisão. PUBVET. 2018; 12(3):1-10.

Autor Correspondente: Vanessa Backes Nascimento Diel<sup>2</sup>

E-mail: [vanessadiel@san.uri.br](mailto:vanessadiel@san.uri.br)

**Recebido em:** 23.09.2022

**Aprovado:** 13.03.2023