

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS.
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



DISSERTAÇÃO

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE
BOVINA SUBCLÍNICA A ANTIMICROBIANOS E AOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE CASTANHA-DO-BRASIL E SEMENTE DE GIRASSOL

CRISTINA HALLAL DE FREITAS

PELOTAS, 2014.

CRISTINA HALLAL DE FREITAS

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE
BOVINA SUBCLÍNICA A ANTIMICROBIANOS E AOS ÓLEOS ESSENCIAIS
DE CASTANHA-DO-BRASIL E SEMENTE DE GIRASSOL**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Bioprospecção da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciências (área
do conhecimento: Bioquímica e
Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Helenice de Lima Gonzalez

Pelotas, 2014.

Banca examinadora:

.....

Prof^a. Dr^a Daniela Isabel Brayer Pereira

.....

Prof^a. Dr^a Marlete Brum Cleff

.....

Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente
(Orientadora)

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a minha mãe, pois se não fosse a sua integral dedicação a mim, em todos os momentos e em todos os sentidos, eu não teria alcançado esse objetivo.

Agradeço a minha irmã, Carolina, pelo amor e cumplicidade.

Ao meu namorado, Igor, por estar presente em todos os momentos, me apoiando, criticando, ajudando e, principalmente, não me deixando desaminar.

Agradeço à minha orientadora Patrícia da Silva Nascente, pela liberdade, confiança, ensinamentos e dedicação que a mim foram conferidos durante esse período, além da indiscutível tranquilidade a que a mim, muitas vezes, confortou.

À Josy, que compartilhou comigo todos os momentos, práticos e teóricos, tristes e alegres, tranquilos e tensos... E, conseqüentemente, tornou esses dois anos de mestrado mais agradáveis.

À colega Patricia Jacob, que me “monitorou” durante as minhas primeiras práticas no laboratório, o que foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço aos estagiários e colegas de laboratório, Anna, Bel, Jaque e Pedro, pela boa vontade em que sempre realizaram as inúmeras tarefas que lhes solicitei, lembrando que, se assim foi, deve-se a certeza da competência de cada um de vocês.

Ao “pessoal da Dani”, e a ela, pela compartilhação não só do espaço físico, mas, em muitas vezes, material, ensinamentos e risadas.

Ao PPGBBIO, pela oportunidade de realização do mestrado, e a CAPES, pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos os que participaram de alguma forma desse momento, gostaria de deixar, de coração, o meu muito obrigada!

RESUMO

FREITAS, C. H.. **Perfil de suscetibilidade de agentes causadores de mastite bovina subclínica a antimicrobianos e aos óleos essenciais de Castanha-do-Brasil e Semente de Girassol.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção)- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

A mastite se constitui no processo inflamatório da glândula mamária causadora de grandes perdas econômicas na bovinocultura leiteira. A principal causa dessa doença é a infecção causada por *Staphylococcus aureus*. O desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos por parte dos agentes causadores de mastite, associado à preocupação com os resíduos de antibióticos no leite, têm incentivado a busca por alternativas para o tratamento da mastite. Tendo em vista a importância da realização do antibiograma para a seleção da terapia antimicrobiana mais adequada, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil de suscetibilidade dos agentes isolados de casos de mastite bovina, assim como a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Castanha-do-Brasil e de Semente de Girassol frente a esses micro-organismos. Os micro-organismos foram isolados do leite de vacas com mastite subclínica, previamente identificados através de provas bioquímicas e confirmadas pelo sistema Vitek 2. O antibiograma foi realizado através do método de difusão em ágar. As CIM's dos óleos essenciais foram determinadas pela técnica de microdiluição em caldo. Dos *Staphylococcus* spp, 86,7% foram coagulase positivas e foi identificado que 73,3% dessas cepas eram *S. aureus*. Os isolados selecionados de *Staphylococcus* coagulase negativa foram identificados como: *S. lentus* e *S. sciuri*. No antibiograma, 100,0% dos isolados bacterianos foram resistentes a trimetoprima, 96,7% a tetraciclina, 90,0% a neomicina, norfloxacin e cefalexina, 86,7% a gentamicina, 73,3% a penicilina, 63,3% a enrofloxacin, 53,3% a amoxicilina e bacitracina, 56,7% a ceftiofur e 43,3% a ampicilina. A CIM do óleo de Castanha-do-Brasil foi: 36,30; 21,35; 15,62 e 10,41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Candida* spp. e *Cryptococcus laurentii*, respectivamente. Em relação ao óleo de Semente de Girassol, a CIM média foi igual a: 23,5; 19,21; 7,81 e 1,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Candida* spp. e *Cryptococcus laurentii*, respectivamente. Esses resultados demonstram que os óleos apresentaram atividade antimicrobiana em baixas concentrações. Demonstrada a elevada resistência das bactérias frente aos antibióticos disponíveis para o tratamento da mastite, os óleos essenciais constituem um potencial recurso terapêutico no controle dessa enfermidade, sendo necessário a continuação de estudos para a melhor avaliação do efeito causado pelos óleos.

Palavras-chave: mastite subclínica; resistência bacteriana; antibiograma; atividade antimicrobiana; óleos essenciais.

ABSTRACT

FREITAS, C. H. **Susceptibility profile of agents which cause bovine subclinical mastitis against antimicrobials and essential oils found in Brazil nuts and sunflower seeds.** Master's thesis in Biochemistry and Bioprospecting – Post-graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting – *Universidade Federal de Pelotas*, Pelotas, RS, Brazil, 2014.

Mastitis, an inflammatory process in the mammary glands, causes major economic losses to dairy farms. Its main cause is an infection caused by *Staphylococcus aureus*. Resistance to antimicrobials developed by agents which cause mastitis, along with the concern with traces of antibiotics in milk, has led to the search for alternatives for treating mastitis. Taking into account the importance of carrying out an antibiogram to select the most adequate antimicrobial therapy, this study aimed at evaluating not only the susceptibility profile of agents isolated from bovine mastitis, but also the antimicrobial activity of essential oils of Brazil nuts and sunflower seeds against these microorganisms. Microorganisms were isolated from cow milk with subclinical mastitis; they had previously been identified by biochemical tests and confirmed by the Vitek 2 system. The antibiogram was carried out by the agar diffusion method. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the essential oils were determined by the broth microdilution technique. Results showed that 86.7% of the *Staphylococcus* spp. was coagulase-positive; 73.3% of them was identified as *S. aureus*. The microorganisms isolated from coagulase-negative *Staphylococcus* were identified as *S. lentus* and *S. sciuri*. The antibiogram showed that 100.0% of the isolated microorganisms was resistant to trimethoprim; 96.7%, to tetracycline; 90.0%, to neomycin, norfloxacin and cefalexin; 86.7%, to gentamicin; 73.3%, to penicillin; 63.3%, to enrofloxacin; 53.3%, to amoxicillin and bacitracin; 56.7%, to ceftiofur; and 43.3%, to ampicillin. The MIC's of Brazil nut oil were 36.30; 21.35; 15.62 and 10.41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, for *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Candida* spp. and *Cryptococcus laurentii*, respectively. The MIC's of sunflower seed oil were 23.5; 19.21; 7.81 and 1.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, for *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Candida* spp. and *Cryptococcus laurentii*, respectively. These results show that both oils in low concentrations display antimicrobial activity. Since bacteria have developed resistance against antibiotics which have been available for the treatment of mastitis, essential oils have become a potential therapeutic resource to control this disorder. However, further studies should be carried out to evaluate their effects.

Key words: subclinical mastitis; bacterial resistance; antibiogram; antimicrobial activity; essential oils

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos escores de mastite subclínica de acordo como resultado do Card Mastitis Test (CMT) em relação a Contagem de Células Somáticas (CCS/mL/leite) e sua respectiva interpretação.	15
Figura 2. Agentes etiológicos contagiosos e ambientais causadores de mastite bovina.....	18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 MASTITE BOVINA.....	13
3.2 MICRO-ORGANISMOS RELACIONADOS COM A MASTITE.....	17
3.3 ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA MICROBIANA.....	21
3.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro.....	24
3.4 AÇÃO ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS.....	25
3.4.1 Óleos essenciais.....	27
3.4.2 Castanha-do-Brasil (BERTHOLLETIA EXCELSA).....	29
3.4.3 Girassol (<i>HELIANTHUS ANNUUS L.</i>)	30
4. ARTIGOS.....	31
5. CONCLUSÃO.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

A mastite se constitui num processo inflamatório da glândula mamária, causadora de grandes perdas econômicas na bovinocultura leiteira, devido à redução na produção de leite e de sua qualidade, aumento do uso de medicamentos e risco de morte dos animais (MELCHIOR et al., 2006). Esses prejuízos são representados por: 70% devido à redução na produção dos quartos mamários com mastite subclínica; 14% por desvalorização dos animais pela redução funcional dos quartos acometidos, descarte precoce do animal ou morte; 8% pela perda do leite descartado por alterações e/ou pela presença de resíduos de antibiótico após tratamento; 8% pelos gastos com tratamentos, honorários de veterinários, mais despesas com medicamentos (PERES; NETO E ZAPPA, 2011).

A etiologia dessa doença pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa, sendo as causas infecciosas as principais (COSTA, 1998). Embora muitos outros micro-organismos possam acometer a região intramamária causando infecção, o *Staphylococcus aureus* é o principal agente patológico, responsável principalmente pela mastite bovina crônica (ROBERSON et al., 1994). Apesar de as bactérias serem os agentes isolados com maior frequência, há registros na literatura de casos esporádicos de micro-organismos de origem ambiental, entre os quais se destacam as leveduras, destacando-se os gêneros *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. (SPANAMBERG et al. 2008).

Devido a essa possível diversidade de agentes causadores de mastite, é importante o conhecimento dos agentes causadores dessa doença, bem como a determinação de sua sensibilidade aos agentes antimicrobianos indicados para o tratamento, a fim de permitir o estabelecimento de uma terapia planejada com elevadas chances de sucesso (PEIXOTO, et al., 2010).

Algumas características de virulência, que contribuem para a persistência de agentes patogênicos no tecido mamário, e o uso inadequado de antibióticos, que propicia o aparecimento de cepas multirresistentes, são fatores que comprometem a eficiência do tratamento da doença (BARBERIO; GIETL E DALVIT et al., 2002). De acordo com Brito et al. (2001), diversos estudos sobre a sensibilidade antimicrobiana realizados no Brasil com patógenos envolvidos na mastite bovina demonstram um aumento crescente no padrão de resistência microbiana, principalmente para *S. aureus*.

A antibioticoterapia é o procedimento mais utilizado no tratamento da mastite bovina, porém a crescente preocupação com a presença de resíduos de antibióticos no leite e o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes tem estimulado a busca por meios alternativos que reduzam ou eliminem tais problemas. Essas situações vêm despertando o interesse dos cientistas na busca de novas drogas, incentivando a procura por produtos originários de fontes naturais, como as plantas medicinais (PINTO et al., 2006).

Vários grupos de pesquisadores têm estudado a atividade biológica das plantas originárias de diversas regiões do mundo, orientados pelo uso popular das espécies nativas. As investigações de produtos naturais ativos contra micro-organismos aumentaram significativamente nos últimos anos em diversas partes do mundo. No Brasil, a pesquisa sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana também aumentou significativamente nos últimos anos (DUARTE, 2006). Estudos têm identificado algumas plantas que apresentam ação sobre micro-organismos causadores de mastite bovina: *Achyrocline satureioides*, conhecida como “Macela” (SPEROTTO, 2010); *Eucalyptus* sp. (SHUCH, 2007); *Origanum vulgare*, o Orégano (OYARZABAL, 2011); entre outros.

A Castanha-do-Brasil tem sido amplamente utilizada, tanto com casca, para extração do óleo, quanto descascada, ou em pedaços, como ingrediente na indústria de alimentos ou matéria-prima para a indústria de cosméticos. Os extratos da Castanha-do-Brasil também são utilizados devido a ação na redução do *Trypanossoma cruzi*, causador da doença de Chagas (CAMPOS et

al., 2005). O uso comercial do Óleo de Semente de Girassol vai desde alimentação humana, em margarinas e óleos de cozinha, como também pode ser usado em tintas e vernizes e ainda, como combustível para tratores e outros veículos. Diante dessa importância, o cultivo dessa planta tem-se expandido no Brasil, proporcionando a possibilidade de estudos relacionados aos benefícios apresentados pelo Girassol, como por exemplo, a atividade antimicrobiana.

Tendo em vista a importância da realização do antibiograma para a seleção da terapia antimicrobiana mais adequada, o presente trabalho teve como objetivo estudar o perfil de suscetibilidade dos agentes etiológicos mais frequentemente isolados de casos de mastite bovina subclínica, assim como a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Castanha-do-Brasil e de Semente de Girassol.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar micro-organismos isolados de vacas com mastite subclínica, caracterizando seu perfil de suscetibilidade a diferentes antimicrobianos, e avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Castanha-do-Brasil e de Semente de Girassol frente a estes micro-organismos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar micro-organismos relacionados com mastite bovina subclínica;
- Comparar os resultados obtidos através de um método bioquímico clássico de identificação bacteriana com os obtidos no Sistema automatizado Vitek 2;
- Analisar o perfil de suscetibilidade das bactérias em relação aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite;
- Identificar os ácidos graxos presentes nos óleos essenciais de Castanha-do-Brasil e de Semente de Girassol;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais frente a micro-organismos oriundos de mastite bovina;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MASTITE BOVINA

A mastite é uma inflamação da glândula mamária e sua intensidade depende da interação entre fatores relacionados com o animal, o homem, o ambiente e a presença de agentes patogênicos que desencadeiam o processo inflamatório. Os agentes causadores da mastite, na sua maioria, são as bactérias, podendo coexistir ainda fungos, leveduras, vírus e algas (RADOSTITS, 2002).

De acordo com a forma de manifestação da infecção, as mastites podem ser caracterizadas como clínica ou subclínica. O primeiro tipo se caracteriza pela fácil visualização dos sinais do processo inflamatório, como edema, aumento de temperatura e sensibilidade da glândula mamária ou qualquer outra alteração nas características do leite. A mastite subclínica caracteriza-se por alterações na composição do leite, como o aumento no número de células somáticas e dos teores de cloro e sódio, além da diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura, sendo essa a forma de maior importância epidemiológica, pois pode ocorrer sem que seja percebida no rebanho, por não apresentar alterações macroscópicas na inspeção do úbere ou de sua secreção (FONSECA E SANTOS, 2000).

Estima-se que para cada caso de mastite clínica devem existir entre 15 a 40 casos de mastite subclínica nos rebanhos. Animais que apresentam mastite subclínica por *S. aureus* constituem-se em permanentes fontes de risco de infecção para outros animais e podem potencializar a prevalência das infecções dentro dos rebanhos. Assim, encurtar a duração dessas infecções é um importante componente dos programas de controle de mastite, o que pode ser feito por meio de tratamento da doença durante a lactação, onde o nível de cura varia entre 3,6 a 92% (MARQUES, 2006).

Segundo Costa (1998), a mastite é uma das mais complexas e dispendiosas doenças da produção leiteira, devido à sua alta prevalência e aos prejuízos que acarreta. Além disso, seu efeito é notado, principalmente, pela redução na produção e as alterações na composição do leite. Ao mesmo tempo, representa um risco potencial à saúde pública, em decorrência da eliminação de patógenos causadores de zoonoses e toxinas produzidas pelos micro-organismos do leite. Para o produtor, as perdas são de grande magnitude. Elas são reflexos de maior descarte de animais, gastos com medicamentos, redução na produção e descarte de leite (SIMÕES E OLIVEIRA, 2012).

Coldebella et al. (2004) relataram que em rebanhos compostos por múltiparas, da raça holandesa, com produtividade média diária de 30kg, a produção pode chegar a 5kg/vaca/dia devido a mastite.

Segundo a Instrução Normativa nº 62 (IN-62), de 29 de dezembro de 2011, o leite deve ser produzido por animais saudáveis e a glândula mamária é o órgão-chave para a sua produção. A saúde do úbere das fêmeas em produção nas explorações leiteiras pode ser avaliada através da contagem de células somáticas (CCS) presentes (RIBEIRO, 2008)

A International Dairy Federation (1981) estabeleceu 500.000 células somáticas (cel/mL) no leite como limite máximo para leite normal, passando este a ser um referencial máximo para países que queiram ingressar no mercado internacional de exportação de leite (SANTOS, 2012). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento alterou a legislação sobre a produção de leite através da Normativa nº 51. Os produtores Brasileiros tiveram até 2010 para produzirem leite com CCS máxima de 1.000.000 de células/mL, diminuindo para 600.000 células/mL em 2013. A partir de 2015, o parâmetro será de 500.000 células/mL para todas as regiões do país, ficando estabelecido que a partir de 2016, as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste a CCS máxima permitida no leite cru refrigerado será de 400.000 células/mL.

A CCS constitui um importante recurso para o monitoramento da qualidade do leite e da saúde da glândula mamária por indicar a ocorrência de mastite

subclínica e, portanto, de possíveis perdas econômicas. A coloração de células somáticas pode ser realizada utilizando-se metodologia indireta, como o CMT (Califórnia Mastite Teste) e direta, quer seja por contagem microscópica ou contagem eletrônica. O CMT é um método indireto, que avalia a quantidade de células somáticas do leite, sob a ação de um detergente aniônico capaz de romper a membrana celular. A formação do gel ocorre pela interação dos ácidos nucleicos celular com o detergente. É um método de triagem barato, de fácil execução e interpretação, capaz de detectar mastite subclínica, podendo ser realizado no campo (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2008). A figura 1 apresenta o quadro com a interpretação dos resultados obtidos no CMT.

Escore	CCS	Interpretação
0	0 – 200.000	Quarto sadio
T	200.000 – 400.000	Mastite subclínica
+	400.000 – 1.200.000	Mastite subclínica
++ (positivo)	1.200.0 – 5.000.000	Mastite subclínica
+++ (fortemente positivo)	>5.000.000	Mastite subclínica

Figura 1 Classificação dos escores de mastite subclínica de acordo como resultado do Card Mastitis Test (CMT) em relação a Contagem de Células Somáticas (CCS/mL/leite) e sua respectiva interpretação.

Fonte: Adaptado de Hoe (2011).

Para que se realize um programa de prevenção e controle da mastite, Radotits et al. (2000), recomenda: adequado manejo na ordenha, instalação e funcionamento correto dos equipamentos e, manutenção periódica dos equipamentos de ordenha, higienização do equipamentos e do úbere do animal, manejo do animal seco, boa nutrição para manter a habilidade da vaca de lutar contra as infecções, alimentação das vacas imediatamente após a

ordenha para que elas fiquem de pé por pelo menos uma hora antes de deitar, ordenhar as vacas infectadas por ultimo, terapia apropriada à mastite durante a lactação, descarte de vacas com infecção crônica, manutenção de um ambiente apropriado para bovinocultura leiteira, manutenção de um bom sistema de registro, monitoração do estado de saúde do úbere, revisões periódicas do programa de manejo e saúde do úbere.

Apesar destas medidas de controle da mastite, as vacas que desenvolvem esta enfermidade geralmente necessitam de antibióticos. A administração de antibióticos pela via intramamária é um método frequente de tratar a mastite bovina. Durante o tratamento na lactação, o medicamento ideal a ser usado por via intramamária deve causar mínima irritação à glândula, ter concentração inibitória mínima, baixo grau de ligação com o leite e tecidos glandulares, quimicamente se apresentar pouco ionizado, ser lipossolúvel, ser de liberação rápida após a aplicação e ter baixa persistência veículo aquoso oleoso (GARCIA, 1996).

Nas explorações leiteiras, antibióticos tais como penicilina, cefalosporina, estreptomicina, tetraciclina, e muitos outros, são utilizados para o tratamento e prevenção da mastite. Benefícios do uso de antibióticos incluem vacas mais saudáveis, mais produtivas, menor incidência de doenças, diminuição da morbidade e da mortalidade, diminuição da carga de patógenos e produção de quantidades abundantes de leite nutritivo, de alta qualidade para o consumo humano. Em contraste com estas vantagens são as sugestões de que o uso de antibióticos em animais pode ser responsável pelo surgimento de bactérias resistentes, que por sua vez pode afetar o tratamento de doenças ligadas a população humana que requerem a intervenção destes medicamentos (OLIVER E MURINDA, 2012).

Além disso, o leite de vacas em tratamento para a mastite está associado a uma maior incidência de resíduos de antibióticos no leite. O risco de resíduos de antibióticos em leite cru não é apenas um problema de saúde pública e segurança alimentar, mas um importante fator econômico para o produtor. Pequenas quantidades de antibióticos no leite já podem inibir culturas

lácteas sensíveis, interferindo na fabricação de queijos, iogurtes e de outros produtos (OLIVER & MURINDA, 2012).

Devido às terapias convencionais serem geralmente baseadas no uso de antibióticos que não são sempre eficazes quando as bactérias se tornam resistentes, associado com o fato de que os seus resíduos podem afetar a saúde humana e interferir nos processos na indústria do leite, a busca de novos agentes antimicrobianos e o estudo de produtos naturais de plantas como substitutos dos agentes antimicrobianos químicos está sendo bastante motivada (SPEROTTO, 2010).

3.2 MICRO-ORGANISMOS RELACIONADOS COM A MASTITE

O leite é um ótimo meio para o desenvolvimento microbiano e a mastite pode ser ocasionada por mais de 137 micro-organismos (BRITO et al., 2007). Segundo Radostits et al. (2002), entre os agentes etiológicos causadores de mastite, destacam-se os de origem contagiosa e os ambientais.

A mastite contagiosa é aquela causada por micro-organismos bem adaptados à sobrevivência no úbere e são transferidos de um quarto infectado a outro sadio através, principalmente, da mão do ordenhador ou teteiras da ordenhadeira no momento da ordenha. O reservatório primário é o próprio animal. *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis* são considerados os principais agentes contagiosos (SILVA E ARAÚJO, 2008). Essas bactérias, ao invadirem a glândula mamária bovina, provocam uma reação inflamatória mediana com aparecimento de vários casos com sintomatologia clínica. Algumas bactérias causadoras de mastite podem gerar toxinas termorresistentes, o que representa um risco considerável à saúde humana (BRAMLEY et al., 1999).

A mastite ambiental ou secundária ocorre quando bactérias presentes no ambiente se transferem para a glândula mamária, o que normalmente ocorre no intervalo entre as ordenhas, não se descartando a possibilidade destas bactérias também serem transmitidas de uma teta à outra também no momento

da ordenha. Considerando que os patógenos ambientais estão disseminados por todo o ambiente, todas as categorias animais estão sob risco: vacas em lactação, vacas secas e novilhas. Geralmente, a mastite ambiental é de curta duração quando comparada a mastite contagiosa, com maior tendência a evoluir para um quadro clínico do que para a forma subclínica. A maioria das infecções por estreptococos ambientais tem duração menor que 30 dias, e sua prevalência em qualquer período do ano raramente excede 10 a 15% do total de quartos de um rebanho (BRITO et al., 2007).

A figura 2 apresenta os principais agentes etiológicos ambientais e contagiosos relacionados a mastite bovina.

Agentes contagiosos	Agentes ambientais
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Mycoplasma spp.</i>	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Streptococcus uberis</i> e outros ambientais
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Leveduras, algas e fungos

Figura 2. Agentes etiológicos contagiosos e ambientais causadores de mastite bovina.

Fonte: Radostits et al. (2007)

Embora muitos patógenos bacterianos, como algumas bactérias do grupo coliformes, possam estar relacionados ao ambiente em que os animais vivem, existem aqueles altamente associados à glândula mamária e a pele do teto, como os *S. aureus*, que emergiram como um dos micro-organismos mais

prevalentes na maior parte do mundo (TOLLERSRUD et al., 2000). Segundo Mendonça et al. (1999), apesar da grande variedade de agentes infecciosos isolados a partir da glândula mamária, existem alguns que são predominantes, como é o caso dos estafilococos e estreptococos.

O gênero *Staphylococcus* compreende diversas espécies e subespécies, que se encontram amplamente distribuídas na natureza, sendo principalmente isolados na pele e membranas mucosas de aves e mamíferos. São 40 espécies descritas no gênero, a maioria coagulase-negativo, caracterizando-se a exclusividade da síntese desta enzima aos *S. aureus*, *S. schleiferi* subsps. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* (BANNERMAN, 2003).

Staphylococcus spp. são cocos Gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, apresentando metabolismo fermentativo com produção de ácido e não de gás, não fotossintético, não esporulado, catalase-positivos e capazes de se multiplicarem em meio contendo 10% de cloreto de sódio. São micro-organismos mesófilos, com temperatura de desenvolvimento de 7 a 48° C, com ótima de 37° C e pH na faixa de 4,0 a 10,0, com ótimo de 6,0 a 7,0. (KLOOS E BANNERMAN, 1999).

Neste gênero, o *S. aureus* sempre foi a espécie mais importante relacionada a uma série de infecções e intoxicações no ser humano e nos animais. Bactérias dessa espécie destacam-se como micro-organismos causadores de mastites contagiosas de maior importância, maior ocorrência nos rebanhos mundiais, e de tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antimicrobianos. As infecções intramamárias causadas por *S. aureus* apresentam implicações importantes em saúde pública, tendo em vista que as toxinas podem ser excretadas no leite e permanecer estáveis nos produtos oferecidos ao consumo. O risco à saúde humana está associado ao consumo de leite dos rebanhos infectados, uma vez que a maioria dos casos de mastite diagnosticados é de mastite subclínica (FAGUNDES E OLIVEIRA, 2004).

Mota et al. (2004) verificaram uma frequência de 59,27% de amostras de leite positivas ao CMT e 81,63% positivas ao exame microbiológico, destacando-se como micro-organismos prevalentes os *Staphylococcus* spp., (52,16%) em propriedades no estado de Pernambuco. Almeida et al. (2005), em propriedades na região do sul de Minas Gerais, analisaram amostras de leite provenientes de 96 rebanhos, sendo que as maiores frequências de isolamentos foram de *S. aureus* seguido do *Streptococcus agalactiae*.

A riqueza de nutrientes presentes no leite propicia um excelente substrato para diversos micro-organismos. A sua composição química favorece também o crescimento de várias espécies de leveduras. Os principais gêneros envolvidos na mastite micótica são *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., além de outros como *Geotrichum* spp., *Pichia* spp. e *Trichosporon* spp. (SPANANBERG, 2009). Em um estudo realizado por Santos e Martins (2005), no Estado de São Paulo, o isolamento de *C. albicans* ocorreu em 8,9% de 260 amostras leite de vacas com mastite.

Os agentes envolvidos na mastite micótica vivem no ambiente dos animais leiteiros, tais como na pele do teto, nas mãos dos ordenhadores e em vários substratos orgânicos. Este tipo de mastite ocorre sob a forma de surtos de casos clínicos, sejam isolados ou em vários animais, geralmente de curta duração, frequentemente com manifestação aguda e com maior concentração nos momentos do pré e pós-parto imediato. Vários aspectos influenciam o aparecimento de mastite micótica, entre eles o mau funcionamento do sistema de ordenha, o manejo inadequado da ordenha, a falta de higiene e a limpeza das instalações e dos equipamentos, além do uso prolongado de terapia antimicrobiana por via intramamária (SPANANBERG, 2009).

3.3 ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA MICROBIANA

As primeiras descrições sobre o uso de antimicrobianos datam de 3000 anos atrás, quando médicos chineses usavam bolores para tratar edemas inflamatórios e feridas infeccionadas, e os sumérios recomendavam um emplasto com uma mistura de vinho, cerveja, zimbro e ameixas (TAVARES, 2001).

Várias substâncias de origem vegetal, animal e mineral foram utilizadas na Antiguidade e na Idade Média para o tratamento de conhecidas “pestes”, que eram diversas epidemias de origem microbiana. Esses produtos, usados de forma empírica, sabe-se hoje que apresentam propriedades terapêutica anti-infecciosas devido a determinadas substâncias presentes em sua composição (TAVARES, 2001).

Um marco importante na história dos antimicrobianos foi a descoberta por Alexander Fleming, em 1928, da penicilina, primeiro antibiótico de utilidade clínica. Fleming, estudando culturas de *S. aureus*, observou que uma das culturas tinha sido contaminada por bolores e em volta dessas colônias não havia mais crescimento bacteriano. Então Fleming e seu colega, Dr. Pryce, descobriram que a substância responsável pela inibição do crescimento do *S. aureus* era produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, a qual foi denominada de penicilina (KONEMAM et al., 2001).

O descobrimento dos antibióticos foi um grande avanço para a aplicação terapêutica tanto na medicina humana quanto na veterinária. Eles são importantes na redução da morbidade e mortalidade de doenças infecciosas (TEIXEIRA, 2009).

A antibioticoterapia é usualmente utilizada como primeira opção no tratamento de diversas enfermidades na medicina veterinária e humana. Atualmente, uma variedade de drogas com princípios ativos diferentes são encontrados no mercado, tornando-se muito importante a avaliação da eficácia

desses medicamentos frente aos micro-organismos causadores destas doenças (MOTA et al., 2005).

O advento dos antibióticos e dos quimioterápicos permitiu o controle e cura das doenças infecciosas, mudando a evolução natural dessas doenças de forma marcante. No entanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos provocou um processo de aceleração do aparecimento de cepas microbianas resistentes a esses fármacos (TEIXEIRA, 2009).

O aparecimento de resistência aos antimicrobianos foi, é, e provavelmente continuará a ser um dos grandes problemas da medicina, pois é causada pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural dando vantagens aos micro-organismos mais aptos. As drogas atuam como agentes seletivos. O termo resistente se refere a aqueles micro-organismos que não se inibem pelas concentrações do antimicrobiano habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano, ou aqueles que apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente estudado ao qual não havia uma adequada resposta clínica quando usado como tratamento (MOTA et al., 2005).

A resistência pode ser de dois tipos: natural ou intrínseca, ou adquirida. A resistência natural ou intrínseca faz parte das características biológicas primitivas dos micro-organismos e é observada regularmente em uma determinada espécie bacteriana em relação a diferentes antimicrobianos. Resulta dos genes cromossômicos que codificam a existência, na célula, de estruturas ou mecanismos que impedem o antibiótico de agir em seu receptor ou que codificam a falta do sítio de ação da droga ou que determinam a existência de receptores inadequados para a ligação com uma substância específica (TEIXEIRA, 2009).

A resistência adquirida a um determinado antimicrobiano é aquela que surge em uma bactéria primitivamente sensível a este mesmo antimicrobiano. Essa resistência acontece devido a mutações que ocorrem no micro-organismo durante seu processo reprodutivo e resulta de erros de cópia na sequência de

bases que forma o DNA ou por meio de transferências do material genético, em que consiste na importação de genes causadores da resistência, pelos mecanismos de tradução, transformação e conjugação, que, frequentemente, envolve genes situados em plasmídeos e transposons (TEIXEIRA, 2009).

Estudos recentes têm sugerido uma relação entre o uso de agentes antimicrobianos em animais de produção e a emergência de patógenos humanos com susceptibilidade decrescente ou completamente resistente aos antibióticos. O alto nível de resistência múltipla apresenta um risco potencial para a saúde pública e pode dificultar o tratamento de doenças animais e humanas, agravando quadros clínicos curáveis (MOTA et al, 2004).

A presença de resíduos antimicrobianos no leite destinado ao consumo humano representa uma crescente preocupação, tendo em vista a má utilização de determinados antibióticos associada às normas higiênicas de manejo e ordenha mal conduzida, proporcionando a manutenção e disseminação de cepas resistentes entre os animais, gerando assim, também, um problema à sanidade animal. Os antibióticos pertencem ao grupo das substâncias residuais de maior influência na qualidade do leite. Eles são os contaminantes mais estudados em todo o mundo e os responsáveis pelas maiores regulamentações internacionais (MOTA et al, 2004). Existem relatos sobre a ocorrência de cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vaca associadas a casos de infecção humana e resistentes a vários antibióticos (ZAFALON et al., 2008).

Há evidências que o tratamento indiscriminado de animais com antibióticos tornem seus produtos e derivados fonte para resistência aos antibióticos na espécie humana. Desta forma, é de extrema importância o isolamento e a identificação desses agentes em laboratório como prova definitiva no diagnóstico das enfermidades, assim como a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana nas amostras isoladas, contribuindo para um melhor controle com a utilização de terapêutica adequada, além de promover um decréscimo na resistência aos antibióticos.

3.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro

A determinação do perfil de suscetibilidade de bactérias aos antimicrobianos, o antibiograma, é uma das principais atividades realizadas por laboratórios de microbiologia clínica. Os resultados desses testes auxiliam na seleção da terapia antimicrobiana mais adequada. Para a determinação do perfil de suscetibilidade, várias metodologias estão disponíveis. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição em caldo (CAMPANHA et al., 2011).

O CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) é uma organização internacional interdisciplinar, sem fins lucrativos, de desenvolvimento, padronização e educação, que promove uniformização das normas e diretrizes consensuais voluntárias na comunidade de atenção à saúde. Os documentos padronizados pelo CLSI incluem uma série de procedimentos para padronizar a execução dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. O não acompanhamento das atualizações do CLSI pode ocasionar uma discordância nos critérios interpretativos em relação aos atualmente recomendados, podendo influenciar na utilização incorreta de antimicrobianos, estimulando a proliferação da resistência bacteriana.

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um micro-organismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo desafiado com a concentração da substância ensaiada (PINTO et al., 2003).

O método de diluição é usado para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um micro-organismo. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A determinação das CIM's é considerada excelente ferramenta para determinar a susceptibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos (ALVES et al., 2008).

No teste de macrodiluição em tubos, preparam-se vários tubos de ensaio com meio de cultivo em caldo, aos quais são acrescentadas diversas concentrações do agente antimicrobiano a ser testado. A seguir, os tubos são inoculados com uma suspensão do micro-organismo analisado. Após a incubação, examinam-se os tubos e determina-se a CIM, que pode ser detectada a “olho nu” ou através de aparelhos baseados em leitura óptica. A técnica de microdiluição em caldo é uma adaptação da macrodiluição em caldo. É denominada “microdiluição”, porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em microplacas estéreis, próprias para microdiluição (ALVES et al., 2008).

Os testes de susceptibilidade às drogas antimicrobianas podem ser usados não só nas pesquisas de sensibilidade aos antimicrobianos, como também na busca de novos fármacos pela atividade antimicrobiana de amostras complexas, como extratos vegetais e de amostras puras (STOPPA et al., 2009).

3.4 AÇÃO ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS

Como descrito anteriormente, um dos maiores problemas de saúde pública, enfrentado nas últimas décadas consiste no aumento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas e fúngicas.

Visto que o Brasil é um rico ambiente para estudos com produtos naturais, os quais constituem uma importante fonte de novos compostos para serem utilizados na terapêutica, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais vem ganhando importância e está cada vez mais intensificada (TEIXEIRA, 2009).

Embora desde a antiguidade os povos utilizem plantas na conservação de alimentos, o estudo sistêmico das plantas como antibióticos é relativamente recente. Diversos condimentos como alho, orégano, tomilho e muitos outros, tem demonstrado atividade antimicrobiana, explicando a sua utilização histórica (BEDIN et al., 1998; OGARA et al., 2000; LABERT et al., 2001; CARVALHO et

al., 2004). Acredita-se que as plantas medicinais sejam as melhores fontes de obtenção dessas novas drogas e muitos estudos têm sido conduzidos, em diferentes partes do mundo, para comprovar sua eficiência. Muitas plantas são usadas por sua atividade antimicrobiana, a qual se deve a compostos sintetizados em seu metabolismo secundário (NASCIMENTO et al., 2000).

O uso de extratos vegetais e fitoquímicos com conhecida atividade antimicrobiana assume importante significado nos tratamentos terapêuticos. Muitas espécies vegetais são reconhecidas por suas substâncias ativas que apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de micro-organismos, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (NASCIMENTO et al., 2000).

Bastos et al., em 2007, estudando o uso de preparações caseiras de plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças infecciosas, verificou que das 45 amostras analisadas, 25 (55,6%) apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento de pelo menos um dos micro-organismos testados. Duas dessas amostras (romã e cebolinha + pepaconda + camarão + beterraba + alho + mel de abelha) foram capazes de inibir todas as cepas testadas. Outros diversos extratos foram caracterizados quanto a sua atividade antibacteriana e antifúngica: *Rosmarinus officinalis* (CLEFF et al., 2012); *Baccharis trimera*, *Bidens pilosa*, *Eucalyptus* sp., *Polygonum hydropiper* e *Tagetes minuta* (SHUCH, 2007); várias plantas condimentares (CARVALHO, CRUZ E WIEST, 2005); entre outras.

De um modo geral, um dos produtos vegetais que mais se destaca e que se apresenta como potencial fonte de compostos antimicrobianos são os óleos essenciais. Já se tem estabelecido cientificamente que esses óleos possuem propriedades antifúngicas e antibacterianas. Neste contexto, vários estudos vêm sendo conduzidos para avaliar e comprovar o uso empírico para tal atividade, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos (TEIXEIRA, 2009).

3.4.1 Óleos essenciais

O termo óleo essencial foi definido no século XVI por Paracelso, médico e alquimista suíço, para quem o componente efetivo de uma droga era a “quinta essência”.

Os óleos essenciais podem ser extraídos de parte de plantas como frutas, flores, cascas, ou de plantas inteiras, como especiarias e ervas medicinais. São caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas. Fisicamente, se apresentam no estado líquido à temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro. Não se misturam à água, e podem ser extraídos de diferentes modos, como hidrodestilação, destilação a vapor, CO₂ supercrítico, ou com a utilização de solventes orgânicos ou gorduras. O óleo obtido de uma planta serve como característica para aquela espécie. Mesmo que óleos diferentes apresentem compostos iguais qualitativamente, diferenças quantitativas farão com que aquele óleo tenha propriedades químicas e biológicas diferentes dos demais (EDRIS, 2007).

Os óleos essenciais são utilizados há séculos como flavorizantes, na fabricação de cosméticos e perfumarias, e farmacologicamente com fins medicinais, o que tem estimulado a procura por substâncias biologicamente ativas e eficazes, especialmente sobre micro-organismos (FIGUEIREDO et al., 2008).

Dentre as várias propriedades farmacológicas, pode-se citar ação antiespasmódica, estimulante sobre secreção do aparelho digestivo, cardiovascular, anestésica local, antiinflamatória e antimicrobiana, dentre outras (SIMÕES et al., 2000; BAKKALI et al., 2008).

Os compostos e suas porcentagens presentes nos óleos essenciais variam de acordo com a espécie considerada, as condições de coleta e extração, e as partes da planta utilizadas. Os principais compostos isolados dos óleos essenciais são terpenos e seus derivados oxigenados, terpenoides, incluindo

os compostos fenólicos (SOLÓRZANO-SANTOS E MIRANDA-NOVALES, 2011).

De acordo com González-Lamothe et al. (2009), os produtos do metabolismo secundário acumulado pelas plantas podem atuar de duas formas: como “potencializadores de atividade antibacteriana”, favorecendo a atividade de antibióticos cuja ação encontra-se limitada por mecanismos de multirresistência desenvolvidos pelos micro-organismos; ou como “atenuantes de virulência”, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção.

Franco et al. (2005), investigaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Eucalyptus cinérea*, pelo método de difusão em disco, e constataram qualitativamente o potencial antimicrobiano do óleo essencial da espécie em questão frente a bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e leveduras.

Feronatto et al. (2007) analisaram óleos essenciais obtidos de plantas nativas de *Baccharis dracunculifolia* e *Baccharis uncinella*, também conhecido como óleo-de-vassoura e os resultados obtidos revelaram que ambos os óleos apresentam atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Cleff et al., em 2012, demonstraram que o óleo essencial de alecrim apresentou atividade antifúngica frente a isolados de *Candida* spp. provenientes de animais.

Muitos óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de micro-organismos, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (TEIXEIRA, 2009). Segundo Daferera et al. (2003), o uso de óleos essenciais como agentes antimicrobianos oferece um baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana, pois sendo misturas de diferentes compostos, sua atividade antimicrobiana pode estar relacionada a diferentes mecanismos de ação, o que dificulta a adaptação dos micro-organismos.

3.4.2 Castanha-do-Brasil (BERTHOLLETIA EXCELSA)

Pertencente ao grupo das nozes de árvores, a Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) foi descrita pela primeira vez em 1808, quando Humboldt e Bompland, e posteriormente Kunth, denominaram árvore majestosa presente na Floresta Amazônica (MENNINGER, 1977; NYBG, 2006). O Ministério da Agricultura, por meio do Decreto 51209 de 18/09/1961, para efeito de comércio exterior, regulamentou a denominação de Castanha-do-Brasil (BRASIL, 1961).

A classificação botânica é descrita em: Divisão: *Angiospermae*→ Classe: *Dicotyledonea*→ Ordem: *Myrtiflorae*→ Família: *Lecythidaceae* → Gênero: *Bertholletia*→ Espécie: *excelsa*. A família tem 325 tipos de árvores nos trópicos americanos, divide-se em 15 gêneros, em que o *Bertholletia* é dominante com 75 espécies (BRASIL, 2002).

A amêndoa constitui um alimento bastante apreciado não só pelo seu sabor, como também pelas suas qualidades nutritivas. Sua composição tem sido amplamente estudada e demonstra ser uma rica fonte nutricional, e é popularmente chamada de “Carne Vegetal”, por ser um alimento energético, rico em proteínas e valorizado pela presença de antioxidantes (COZZOLINO, 2001).

O óleo da Castanha-do-Brasil é obtido pela prensagem das sementes, ou através do uso de solvente, e tem sido utilizado no enriquecimento de alimentos industrializados de forma a promover a sua qualidade. Novos métodos para purificação, deacidificação e extração têm sido testados além da tradicional prensagem (PACHECO, 2007). De acordo com a composição nutricional da Castanha-do-Brasil, os componentes mais abundantes são os lipídios, seguidos pelas proteínas, carboidratos e fibras, de forma que o valor energético é bastante elevado (MOODLEY et al., 2007). É importante ressaltar que os níveis dos nutrientes diferem com o tamanho da castanha, sua variedade e origem.

Além da aplicação na fórmula de cosméticos, o óleo também pode ser utilizado em adição a meios específicos, como fonte de carbono para micro-organismos, propiciando a produção de substâncias biosurfactantes, que devido a importância ecológica, são mais aceitos que os surfactantes sintéticos (COSTA et al., 2006).

3.4.3 Girassol (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)

O Girassol é uma planta que apresenta a seguinte classificação botânica: Synandrales (ordem), Compositae (família), Helianthus (gênero) e *Helianthus annus* (espécie) (CASTIGLIONI et al., 1997). Esta é uma planta com características muito especiais, principalmente em relação ao seu potencial para o aproveitamento econômico do óleo produzido de suas sementes, ração animal, além de ser utilizado na alimentação humana (SMIDERLE, 2000).

Dentre os óleos vegetais, o óleo de Semente de Girassol destaca-se por suas excelentes características físico-químicas e nutricionais. Possui alta relação de ácidos graxos poliinsaturados (65,3%)/ saturados (11,6%), sendo que o teor de poliinsaturados é constituído, em grande parte, pelo ácido linoléico (65%). Este é essencial ao desempenho das funções fisiológicas do organismo humano e deve ser ingerido através dos alimentos, já que não é sintetizado pelo organismo. Por essas características, é um dos óleos vegetais de melhor qualidade nutricional e organoléptica do mundo (CASTRO et al., 1997).

Em relação a atividade antimicrobiana dessa planta os relatos são escassos. Ensaio antifúngico foram realizados com extratos metanólicos das flores do Girassol, verificando atividade inibitória significativa contra fungos fitopatogênicos (PRATS et al., 2003). Visto que os testes apresentaram atividades antifúngicas consideráveis frente a agentes patogênicos a vegetais, é importante avaliar a atividade antimicrobiana do Girassol frente a micro-organismos causadores de doenças em humanos e animais.

4. ARTIGOS

O primeiro artigo, intitulado “Identificação de bactérias causadoras de mastite bovina e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos” está apresentado conforme as normas da Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Ciências Biológicas II – B2 e fator de impacto de 2,058.

O segundo artigo, intitulado “Antimicrobial activity of essential oils found in brazil nuts and sunflower seeds against microorganisms isolated from bovine subclinical mastites”, está escrito de acordo com as normas da Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Ciências Biológicas II - B3 e fator de impacto de 0,959.

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Resumo

O objetivo desse trabalho foi identificar bactérias em leite mastítico, comparando os resultados obtidos através de testes bioquímicos com o Sistema automatizado Vitek 2[®] e determinar o perfil de suscetibilidade á antibióticos utilizados no tratamento dessa enfermidade. Foram selecionadas 30 amostras provenientes de quartos com mastite subclínica, identificados como *Staphylococcus* spp. através de provas bioquímicas. O perfil de suscetibilidade foi realizado pela técnica de difusão em disco, frente a: Amoxicilina, Bacitracina, Cefalexina, Ceftiofur, Enrofloxacina, Gentamicina, Neomicina, Norfloxacina, Penicilina G, Tetraciclinae Trimetoprima e a identificação de espécie foi realizada através do Sistema Vitek 2[®]. Através das provas bioquímicas, 86,7% das bactérias estavam identificadas como *Staphylococcus* coagulase positiva e destas, o Sistema Vitek 2 identificou 73,3% como *S. aureus*. *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* foram erroneamente identificados como *Staphylococcus* spp. através das provas bioquímicas, demonstrando vulnerabilidade dos resultados fornecidos por este método. No antibiograma, 100,0% dos isolados foram resistentes a trimetoprima, 96,7% a tetraciclina, 90,0% a neomicina, norfloxacina e cefalexina, 86,7% a gentamicina, 73,3% a penicilina, 63,3% a enrofloxacina, 53,3% a amoxocilina e bacitracina, 56,7% a ceftiofur e 43,3% a ampicilina. Esses resultados demonstram a dificuldade encontrada no tratamento da mastite, devido a resistência dos agentes patológicos

Palavras-chave: mastite subclínica, identificação de micro-organismos, resistência bacteriana.

Abstract

This study aimed at identifying bacteria in mastitic milk – results of biochemical tests were compared with the ones gotten by the Vitek 2® system – and determining their susceptibility profile for antibiotics which are used to treat mastitis. Thirty samples from mammary quarts with subclinical mastitis were selected; *Staphylococcus* spp. was identified by biochemical evidence. The susceptibility profile was carried out by the disk diffusion method against Amoxicillin, Bacitracin, Cefalexin, Ceftiofur, Enrofloxacin, Gentamicin, Neomycin, Norfloxacin, Penicillin G, Tetracycline, Ampicillin and Trimethoprim whereas the identification of the species was performed by the Vitek 2® system. Biochemical tests identified 86.7% of the bacteria as coagulase-positive *Staphylococcus*; 73.3% of them was identified as *S. aureus* by the Vitek 2® system. However, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* were wrongly identified as *Staphylococcus* spp. by biochemical tests, a fact that shows how vulnerable results gotten by this method are. In the antibiogram, 100.0% of the isolated microorganisms were resistant to trimethoprim; 96.7%, to tetracycline; 90.0%, to neomycin, norfloxacin and cefalexin; 86.7%, to gentamicin; 73.3%, to penicillin; 63.3%, to enrofloxacin; 53.3%, to amoxicillin and bacitracin; 56.7%, to ceftiofur; and 43.3%, to ampicillin. These results show that treating mastitis is difficult due to the resistance of pathological agents.

Key words: subclinical mastitis, microorganism identification, bacterial resistance

Introdução

A mastite se constitui num processo inflamatório da glândula mamária, causadora de grandes perdas econômicas na bovinocultura leiteira, devido à redução na produção de leite e de sua qualidade, aumento do uso de medicamentos e risco de morte dos animais¹⁴. Esses prejuízos são representados por: 70% devido à redução na produção dos quartos mamários com mastite subclínica; 14% por desvalorização dos animais pela redução funcional dos quartos acometidos, descarte precoce do animal ou morte; 8% pela perda do leite descartado por alterações e/ou pela presença de resíduos de antibiótico após tratamento; 8% pelos gastos com tratamentos, honorários de veterinários, mais despesas com medicamentos¹⁸.

A etiologia dessa doença pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa, sendo as causas infecciosas as principais⁶. Embora muitos outros micro-organismos possam acometer a região intramamária causando infecção, bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* são os principais agentes patológicos, responsáveis principalmente pela mastite bovina crônica¹⁹. Porém, devido à diversidade de agentes causadores de mastite, é importante identificar o agente etiológico e dessa doença e determinar a sua sensibilidade aos agentes antimicrobianos indicados para o tratamento, a fim de permitir o estabelecimento de uma terapia planejada com elevadas chances de sucesso¹⁷.

Algumas características de virulência, que contribuem para a persistência de agentes etiológicos no tecido mamário, e o uso inadequado de antibióticos, que propicia o aparecimento de cepas multirresistentes comprometem a eficiência do tratamento da doença¹. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi identificar bactérias isoladas do leite de vaca com mastite subclínica, comparando os resultados obtidos através de um método bioquímico clássico de identificação com os obtidos no Sistema automatizado Vitek 2, assim como determinar o perfil de suscetibilidade desses isolados frente aos antibióticos utilizados no tratamento dessa doença.

Material e Métodos

Foram realizadas visitas com acompanhamento da EMATER e equipe UFPel pelo “Projeto regional de desenvolvimento da bovinocultura de leite – importância da qualidade do leite e boas práticas agropecuárias” em 11 propriedades leiteiras cadastradas ao programa, localizadas na região do município de Pelotas, RS, caracterizadas por rebanhos das raças Holandês e Jersey. As amostras eram provenientes dos quartos mamários que apresentaram mastite subclínica, verificada através do California Mastitis test (CMT).

Após serem colhidas, em tubos estéreis identificados, as amostras foram refrigeradas e encaminhadas para o Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Faculdade de Veterinária (FV) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), onde foram semeadas em ágar sangue por esgotamento e levadas a estufa por 36°C por 24h. Após o período de crescimento, as bactérias isoladas eram repicadas para a realização das provas de identificação. As colônias isoladas foram identificadas através da observação da ocorrência de Hemólise, coloração de Gram, Catalase, teste da Coagulase e provas bioquímicas específicas². Para a condução do estudo, 30 isolados de *Staphylococcus* spp. foram selecionados. A confirmação das espécies em questão foi dada através do sistema Vitek 2.

Para a determinação do perfil de suscetibilidade dos micro-organismos foi utilizada a técnica de disco de difusão de Kirb-Bauer (BRASIL, 2003). Os antimicrobianos testados foram Amoxicilina (10µg/disco), Bacitracina (10µg/disco), Cefalexina (30µg/disco), Cefotiofur (30µg/disco), Enrofloxacin (5µg/disco), Gentamicina (10µg/disco), Neomicina (30µg/disco), Norfloxacin (10µg/disco), Penicilina G (10µg/disco), Tetraciclina (30µg/disco) e Trimetoprima (5µg/disco).

Resultados

Através da realização das provas bioquímicas, 86,7% das bactérias em estudo foram identificadas como *Staphylococcus* coagulase positiva. A identificação das espécies através do sistema automatizado Vitek 2 confirmou que 22 (73,3%) das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva pertencem a espécie *S. aureus*.

A identificação das 30 bactérias selecionadas para esse estudo, isoladas do leite de mastite bovina subclínica, encontram-se descritas na tabela 1, conforme identificação bioquímica e através do Sistema Vitek 2. Conforme pode ser visualizado, dos quatro isolados bacterianos que apresentaram resultado negativo a prova da coagulase, apenas duas tiveram as espécies identificadas no Vitek: *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus sciuri*.

Alguns isolados identificados como *Staphylococcus* spp. através de provas bioquímicas apresentaram outras identificações quando passaram pelo Vitek, sendo eles: *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*.

O segundo gênero de bactérias que se apresentou mais frequente nesse estudo foi *Enterococcus*: *Enterococcus faecium* (três isolados) e *Enterococcus faecalis* (dois isolados), totalizando 16,7% das bactérias em estudo.

A tabela 2 apresenta o perfil de suscetibilidade das bactérias estudadas frente a diferentes antibióticos utilizados no tratamento da mastite.

A figura 1 apresenta o perfil de suscetibilidade das bactérias selecionadas em relação aos antibióticos. No antibiograma, 100,0% dos isolados foram resistentes a trimetoprima, 96,7% a tetraciclina, 90,0% a neomicina, norfloxacina e cefalexina, 86,7% a gentamicina, 73,3% a penicilina, 63,3% a enrofloxacina, 53,3% a amoxicilina e bacitracina, 56,7% a ceftiofur e 43,3% a ampicilina.

Discussão

Embora muitos micro-organismos possam acometer a região intramamária causando infecção, *Staphylococcus aureus* é o principal agente etiológico, responsável principalmente pela mastite bovina crônica⁴.

Medeiros e Souza (2009) analisaram 16 propriedades rurais leiteiras, na região de Cerqueira César, São Paulo. Os agentes etiológicos que apresentaram maior frequência nas amostras de leite de quartos mamários positivos para mastite clínica ou subclínica foram *S. aureus* (30%). No presente estudo, 73,3% das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva pertencem a espécie *S. aureus*, indicando a prevalência dessa espécie em casos da mastite.

De acordo com Melo (2008), a prevalência de *S. aureus*, como causadores da mastite bovina, pode estar relacionada aos mecanismos de resistência deste agente, tais como a presença do biofilme associado à redução da suscetibilidade a antimicrobianos, ao baixo percentual de cura durante a lactação e à presença deles tanto no ambiente quanto nos animais e no homem, considerando o fato desses patógenos não serem classificados como ambientais.

Altamente contagioso, *S. aureus* é capaz de causar infecções por mais de 30 dias habitando feridas nos tetos, mãos de ordenhadores e na glândula mamária de vacas infectadas, acarretando enormes prejuízos à pecuária leiteira, desde o comprometimento direto com a qualidade do leite até a perda severa da produção de leite²⁷.

No presente trabalho, os isolados selecionados de *Staphylococcus* coagulase negativa foram identificados, quanto a espécie, como: *Staphylococcus lentus* (uma cepa) e *Staphylococcus sciuri* (uma cepa). Santos (2010) observou que a espécie de *Staphylococcus* coagulase negativa de maior frequência em mastite clínica e subclínica de bovinos foi *Staphylococcus hyicus* (15,0%), *Staphylococcus chromogenes* (12,5%), *Staphylococcus gallinarum* (12,5%), *Staphylococcus lentus* (12,5%) e *Staphylococcus epidermidis* (10,8%), enquanto que *Staphylococcus sciuri* representou apenas 2,5% dos isolamentos. Segundo o autor, *Staphylococcus* coagulase negativa constitui um grupo bastante heterogêneo de micro-organismos associados a infecções da glândula mamária de bovinos, sendo comumente encontrados no ambiente dos estabelecimentos de ordenha, em equipamentos de ordenha e na pele dos tetos.

Segundo Farber et al. (2001), os resultados de testes bioquímicos utilizados para identificação bacteriana podem apresentar variabilidade pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, além de outras desvantagens como o baixo poder discriminatório em micro-organismos com pequena variabilidade genética e o risco de interpretações e identificações errôneas, quando se utiliza um número limitado de testes. Isso pode explicar o fato das bactérias *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* terem sido identificadas como *Staphylococcus* spp. nas provas bioquímicas.

Os *Enterococcus* são distinguidos do gênero *Staphylococcus* pela incapacidade de produção da catalase. Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram vulnerabilidade na identificação de micro-organismos através de provas bioquímicas, uma vez que quatro cepas identificadas como *Enterococcus* haviam sido consideradas como *Staphylococcus* spp..

Uma grande dificuldade associada com a identificação de espécies bacterianas baseada nas características fenotípicas está no fato de ocorrer divergência ou convergência. Divergência ocorre para linhagens de algumas espécies, geneticamente similares, mas com características fenotípicas diferentes. Convergência ocorre para linhagens de diferentes espécies, geneticamente diferentes, mas que se comportam fenotipicamente de forma similar⁹. Em ambas as situações, a identificação por testes fenotípicos, como as provas bioquímicas tradicionais, resultam em identificação errônea, como foi observado no presente trabalho.

As bactérias *Enterococcus* spp. são micro-organismos comensais, atuando como patógenos oportunistas. Podem ser encontrados no solo, água, plantas, alimentos, animais e insetos, de forma que, disseminados no ambiente da fazenda, podem contaminar a glândula mamária das vacas no período entre ordenhas ou durante o período seco²².

O conhecimento dos padrões de resistência antimicrobiana do microrganismo é necessário e fundamental para o desenvolvimento de métodos preventivos que sejam efetivos, assim como para a construção de estratégias de tratamento, quando necessárias²¹.

De forma semelhante ao resultado obtido no antibiograma desse trabalho, características de multirresistência também foram identificadas por Zanette et al. (2010): das 39 amostras positivas para *S. aureus* pesquisadas, nove (23,07%) apresentaram multirresistência, variando de três a oito antimicrobianos. Conforme consta na literatura, espécies de *S. aureus* isoladas de leite mastítico bovino apresentam características de virulência e resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento da doença ¹⁰.

O perfil de resistência apresentado pelas bactérias estudadas configura um importante motivo de preocupação, uma vez que os antibióticos disponíveis no mercado não apresentam efeito sobre tais micro-organismos dificulta o tratamento de animais doentes e, conseqüentemente, agrava as perdas econômicas decorrentes da mastite.

O antibiótico que apresentou maior ação in vitro sobre as bactérias nesse estudo (46,7%), a Bacitracina, no estudo realizado por Medeiros (2009), esse antibiótico foi associado a neomicina + tetraciclina, sendo o tratamento mais eficaz para os isolados bacterianos obtidos de mastite subclínica, obtendo como resultado aproximadamente o dobro do encontrado no presente trabalho. Segundo o autor, as associações entre antimicrobianos visam potencializar a ação dos mesmos, diminuir efeitos indesejáveis e aumentar o espectro de ação sobre os micro-organismos.

Valores baixos de sensibilidade a ampicilina, como apresentados no antibiograma, são esperados, visto que a ampicilina é uma penicilina de amplo espectro, resultando no seu uso indiscriminado no tratamento da mastite, causando a resistência do micro-organismo.

O valor encontrado em relação a resistência a Penicilina é próximo ao encontrado por Zafalon et al. (2008), que determinou que esse foi o princípio ativo ao qual os micro-organismos originados do leite apresentaram maior resistência (63,3%). Há relatos em que a maior prevalência de estirpes bacterianas isoladas de leite de vacas com mastite apresentam resistência única à penicilina (48,3%) ²⁷.

Costa et al. (2004) referiram-se a uma maior resistência de *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite clínica e subclínica aos antimicrobianos do grupo dos betalactâmicos-penicilina. Estes micro-organismos produzem betalactamases com capacidade de cindir o anel beta-lactâmico da estrutura do antimicrobiano, constituindo-

se no principal mecanismo de resistência. Em humanos, o aumento da resistência bacteriana em amostras isoladas de processos infecciosos parece não ser somente pelo mau e intensivo uso, mas também pela transmissão via alimentos de origem animal ou pelo contato direto com animais de produção.

Os *Staphylococcus* spp. geralmente, apresentam elevada resistência ao grupo de antibióticos beta-lactâmicos, acima de 70,0% á penicilina G, bem como, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina²⁵. Frente à ação desses antibióticos, 76,2% dos *Staphylococcus* spp forma resistentes a penicilina, 42,9% a ampicilina e 57,1% a amoxicilina.

A gentamicina apresentou baixo percentual de sensibilidade (13,3%), apesar de ser reconhecido como um princípio ativo que apresenta elevada ação frente a micro-organismos relacionados à mastite. Nader Filho et al. (2007) revelou que a gentamicina foi o antibiótico que apresentou maior (98,6%) ação *in vitro* sobre os *S. aureus* isolados de leite mastístico, enquanto Costa et al. (2000) e Freitas et al. (2005) encontraram valores mais baixos, quais sejam, 54,0% e 49,0%, respectivamente.

Há evidências que o tratamento indiscriminado de animais com antibióticos tornem seus produtos e derivados fonte para resistência aos antibióticos na espécie humana. Desta forma, é de extrema importância o isolamento e a identificação desses agentes em laboratório como prova definitiva no diagnóstico das enfermidades, assim como a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana nas amostras isoladas, contribuindo para um melhor controle com a utilização de terapêutica adequada, além de promover um decréscimo na resistência aos antibióticos. Para tanto, deve-se utilizar um método que possa ser aplicado com sensibilidade para a identificação precisa do micro-organismo, contribuindo para estudos epidemiológicos e etiológicos da doença.

Referências Bibliográficas

1. BARBERIO, A.; GIETL, H.; DALVIT, P. “In vitro” sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. **Rev. Napgama**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 10, 2002.
2. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica, Módulo V. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**, 2000.
3. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada. 8ª Edição, Janeiro de 2003.
4. BRITO, J. R. F. et al. Sensibilidade e especificidade do “california mastitis test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Coronel Pacheco, v. 2, n. 17, p.49-53, 1 abr. 1997.
5. COSTA, E. O.; RAIA, M.R.; WATANABE, E.T.; GARINO, F.; COELHO, V. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite de quartos sadios. **Revista Napgama**, v.3, n.4, 14-17, 2000.
6. COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista da Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v.1, n.1, p.3-7, 1998.
7. COSTA, E.O., GARINO, Jr. F., RIBEIRO, A.R., WATANABE, E.T., MELVILLE, P.A., BENITES, N.R. Resistência aos antimicrobianos de microrganismos do gênero *Staphylococcus* isolados de mastite bovina no decênio de 1992 a 2001. **Revista Napgama**. 7 (2):13-20, 2004.
8. FABER, J. M.; GENDEL, S. M.; TYLER, K. D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W. L.; FRITSCHER, S. J.; BARRETT, T. J. Molecular typing and differentiation.

- In: Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. **American Public Health Association (APHA)**. Chap. 11, p.127-158, 2011.
9. FRANCO, A.M., WECKWERTH, P.H., CASAROTO, G., DUARTE, M.A.; WECKWERTH, N.V., JÚNIOR, G.M., VIVAN, R. Comparison between biochemist classic test and the Polymerase Chain Reaction (PCR) for identification of *Enterococcus faecalis* from the oral cavity. **Salusvita**, Bauru, v.31., n.3., p.191-202, 2012.
 10. FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.
 11. MA, E.; WONG, C.; LAI, K.; CHAN, E.; YAM, W.C.; CHAN, A. Kocuria kristinae infection associated with acute cholecystitis. **BMC Infectious Diseases**, doi:10.1186/1471-2334-5-60, 2005.
 12. MEDEIROS, M. I. M.; SOUZA, L. C. Associação de agentes patogênicos isolados em análise microbiológica da água, com a presença de mastite clínica ou subclínica, em vacas de propriedades leiteiras da Região de Cerqueira César-SP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 580-585, 2009.
 13. MEDEIROS, S. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 7, jul. 2009.
 14. MELCHIOR, M.B., FINK-GREMMELS, J., GAASTRA, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. **J. Vet. Med. B.** v. 53, p. 326–332, 2006.
 15. MELO, P. C. Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina. 2008. 200 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária

- Preventiva) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal. 2008.
16. NADER FILHO, A., FERREIRA, L.M., AMARAL, L.A., OLIVEIRA, R.P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.74, n.1, p.1-4, jan./mar., 2007.
 17. PEIXOTO, R.; FRANÇA, C.A.; JÚNIOR, A.F.; VESCHI, J.L.; COSTA, M.M. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos de mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnostico. **Pesq. Vet. Bras.** 30(9):735-740, setembro 2010.
 18. PERES NETO, F.; ZAPPA,V. Mastite em vacas leiteiras. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Graça, SP, a. 9, n. 16, 2011.
 19. ROBERSON J. R.; FOX L. K., HANCOCK D. D.; GAY J. M. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **J. Dairy Sci.**, v.77, n.11, p.3354-3364, 1994.
 20. ROBERSON J. R.; FOX L. K., HANCOCK D. D.; GAY J. M. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **J. Dairy Sci.**, v.77, n.11, p.3354-3364, 1994.
 21. SABOUR, P.M., GILL, J.J., LEPP, D., PACAN, J.C., AHMED, R., DINGWELL, R. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **J Clin Microbiol**, 42 (8): 3449–3455, 2004.
 22. SANTOS, E.M.; BRITO, M.A.V.; LANGE, C. BRITO, J.R.; CERQUEIRA, M.M. *Streptococcus* and related genera as etiological agentes of bovine mastites. **Acta Scientiae Veterinariae**. 35 (1): 17-27, 2007.
 23. SANTOS, L. L. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira de Santa Izabel do Oeste, Paraná. **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 11, n. 4, p. 860-866, out./dez. 2010.

24. SPANAMBERG, A.; SANCHES, E.M.; SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v.39, n.1., Santa Maria, 2009.
25. TAVARES, W. Bactérias gram positivas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, DF, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.
26. TEIXEIRA, L.M. E FACKLAM, R.R. 2003. *Enterococcus*. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C. & Tenover F.C. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th edn. Washington: American Society for Microbiology, pp.422-433.
27. ZAFALON, L.F.; ARCARO, J.R.P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; CASTELANI, L.; BENVENUTOO, F. Investigation of the antimicrobial resistance patterns in *Staphylococcus aureus* isolated in the milking of cows in the lactation. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 67(2) 118-125, 2008.
28. ZANETTE, E., SCAPIN, D. E ROSSI, E.M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc & Ciência – ACBS**. 1(1):65-70, 2010.

Tabela 1. Identificação das bactérias através de provas bioquímicas e Vitek.

ID	PB	Vitek	ID	PB	Vitek
1	SCN	<i>Enterococcus faecium</i>	16	SCP	<i>S. aureus</i>
2	SCP	<i>S. aureus</i>	17	SCP	<i>S. aureus</i>
3	SCP	<i>S. aureus</i>	18	SCP	<i>S. aureus</i>
4	SCP	<i>S. aureus</i>	19	SCP	<i>S. aureus</i>
5	SCP	<i>Enterococcus faecium</i>	20	SCP	<i>S. aureus</i>
6	SCN	<i>Enterococcus faecalis</i>	21	SCN	<i>S. lentus</i>
7	SCN	<i>S. sciuri</i>	22	SCP	<i>S. aureus</i>
8	SCP	<i>Enterococcus faecalis</i>	23	SCP	<i>S. aureus</i>
9	SCP	<i>Enterococcus faecium</i>	24	SCP	<i>S. aureus</i>
10	SCP	<i>S. aureus</i>	25	SCP	<i>S. aureus</i>
11	SCP	<i>S. aureus</i>	26	SCP	<i>S. aureus</i>
12	SCP	<i>Enterococcus faecalis</i>	27	SCP	<i>S. aureus</i>
13	SCP	<i>S. aureus</i>	28	SCP	<i>S. aureus</i>
14	SCP	<i>S. aureus</i>	29	SCP	<i>S. aureus</i>
15	SCP	<i>S. aureus</i>	30	SCP	<i>S. aureus</i>

ID: número de identificação; PB: provas bioquímicas; SCP: *Staphylococcus* coagulase positiva; SCN: *Staphylococcus* coagulase negativa.

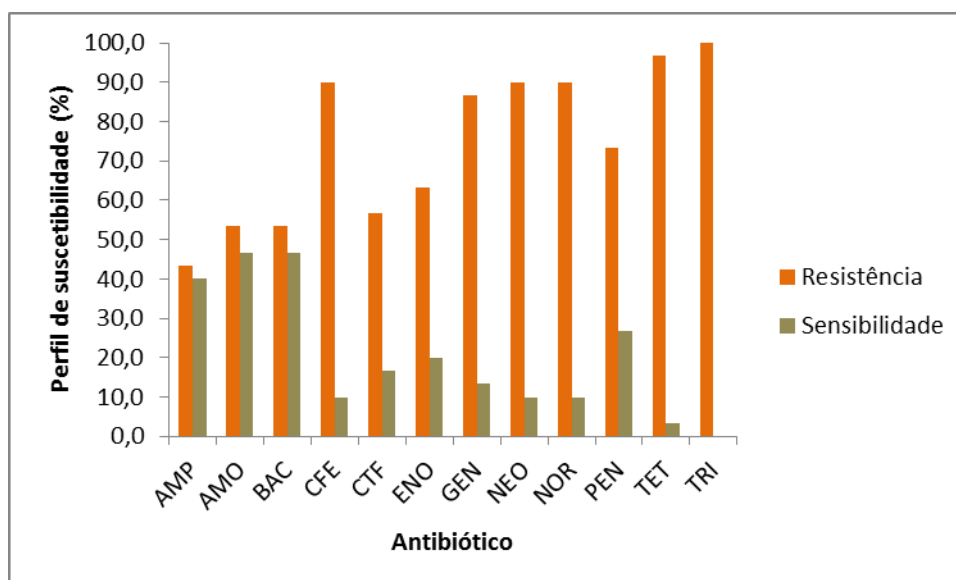
Tabela 2. Perfil de suscetibilidade das bactérias isoladas de leite proveniente em mastite subclínica frente a antibióticos de uso em bovinos

ID	Bactéria	AMP	AMO	BAC	CFE	CTF	ENO	GEN	NEO	NOR	PEN	TET	TRI
1	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R	S	R	N.	S	S	R	R	R	R	R
2	<i>S. aureus</i>	N.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R
3	<i>S. aureus</i>	N.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R
4	<i>S. aureus</i>	N.	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R
5	<i>Enterococcus faecium</i>	N.	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	R	R	R	R	R	N.	S	R	S	R	R	R
7	<i>S. sciuri</i>	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R
8	<i>Enterococcus faecalis</i>	S	S	S	S	R	N.	R	R	R	R	R	R
9	<i>Enterococcus faecium</i>	N.	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	R
10	<i>S. aureus</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
11	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	N.	R	R	R	R	R	R	R
12	<i>Enterococcus faecalis</i>	S	S	R	R	R	N.	R	R	S	R	R	R
13	<i>S. aureus</i>	S	S	R	R	N.	R	R	R	R	S	R	R
14	<i>S. aureus</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R

Continuação da Tabela 2.

ID	Bactéria	AMP	AMO	BAC	CFE	CTF	ENO	GEN	NEO	NOR	PEN	TET	TRI
16	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	N.	R	S	R	R	R	R	R
17	<i>S. aureus</i>	S	S	R	R	N.	R	R	S	R	S	R	R
18	<i>S. aureus</i>	S	S	S	R	R	N.	R	R	R	S	R	R
19	<i>S. aureus</i>	S	S	R	R	R	N.	R	R	R	R	R	R
20	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
21	<i>S. lentus</i>	R	R	R	R	N.	R	R	R	R	R	R	R
22	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	N.	R	R	R	R	R	R	R
23	<i>S. aureus</i>	S	S	R	R	N.	R	R	R	R	R	R	R
24	<i>S. aureus</i>	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
25	<i>S. aureus</i>	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
26	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
27	<i>S. aureus</i>	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
28	<i>S. aureus</i>	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R
29	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
30	<i>S. aureus</i>	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R

ID: Número de identificação; R: Resistente; S: Sensível; N.: Não Determinado; AMP: Ampicilina; AMO: Amoxocilina; BAC: Bacitracina; CFE: Cefalexina; CTF: Ceftiofur; ENO: Enrofloxacina; GEN: Gentamicina; NEO: Neomicina; NOR: Norfloxacina; PEN: Penicilina; TET: Tetraciclina; TRI: Trimetoprima;



AMO: Ampicilina; AMO: Amoxocilina; BAC: Bacitracina; CFE: Cefalexina; CTF: Ceftiofur; ENO: Enrofloxacina; GEN: Gentamicina; NEO: Neomicina; NOR: Norfloxacina; PEN: Penicilina; TET: Tetraciclina; TRI: Trimetoprima

Figura 1. Gráfico do Perfil de suscetibilidade *in vitro* das bactérias isoladas de mastite bovina frente a antibióticos utilizados para o tratamento.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ÓLEO DE CASTANHA DO BRASIL E DE SEMENTE DE GIRASSOL FRENTE A MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA SUBCLINICA

Cristina Hallal de Freitas¹, Anna Pires Terra², Josiara Furtado Mendes², Cláudio Martin Pereira de Pereira², Patrícia da Silva Nascente².

Resumo

A preocupação com a presença de resíduos de antibióticos no leite e o aparecimento de bactérias resistentes tem estimulado a busca por alternativas para o tratamento da mastite, destacando-se os produtos naturais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Castanha-do-Brasil e de Semente de Girassol frente á isolados de leite mastítico, assim como analisar as suas composições em ácidos graxos. Para o teste antimicrobiano foram selecionados os micro-organismos isolados de leite de vacas com mastite subclínica: *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Candida* spp. e *Cryptococcus laurentii*. Os constituintes dos óleos foram determinados por cromatografia gasosa e a atividade antimicrobiana foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo. Os ácidos graxos identificados foram: mirístico, palmítico, palmitoleico, margarico, esteárico, oleico, linoleico, linolênico, araquídico, gadolêico, behênico e lignocérico. A média da CIM para *S. aureus*, *Enterococcus* spp, *Candida* spp. e *Cryptococcus laurentii* foram, respectivamente: 36,30; 21,35; 15,62 e 10,41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (óleo de Castanha) e 23,5; 19,21; 7,81 e 1,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (óleo de Girassol). Esses valores demonstram que os óleos, em baixas concentrações, apresentaram ação antimicrobiana frente ais micro-organismos estudados, evidenciando o potencial uso desses óleos essenciais como recursos terapêuticos no controle da mastite.

Palavras-chave: Mastite subclínica, atividade antimicrobiana, óleos essenciais.

¹ Engenheira de Alimentos, Msc. Rua Raimundo Correa, 86. Bairro: Tres Vendas. Cidade: Pelotas, RS. (53)84187290 crishallal@hotmail.com (autor para correspondência)

² Universidade Federal de Pelotas.

Abstract

Concern with traces of antibiotics found in milk and with resistant bacteria has led to the search for alternatives, mainly natural products, to treat mastitis. This study aimed at evaluating the antimicrobial activity of essential oils found in Brazil nuts and sunflower seeds against microorganisms isolated from mastitic milk and at analyzing their fatty acids. The following microorganisms were isolated from milk produced by cows with subclinical mastitis and selected for the antimicrobial test: *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Candida* spp. and *Cryptococcus laurentii*. The oil components and the antimicrobial activity were determined by gas chromatography and by the broth microdilution technique, respectively. The following fatty acids were identified: myristic, palmitic, palmitoleic, margaric, stearic, oleic, linoleic, linolenic, arachidic, gadoleic, behenic and lignoceric. Averages of minimum inhibitory concentrations (MIC) for *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Candida* spp. and *Cryptococcus laurenti* were 36.30; 21.35; 15.62 and 10.41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Brazil nut oil) and 23.5; 19.21; 7.81 and 1.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (sunflower seed oil), respectively. These values show that these oils, in low concentration, have antimicrobial activity against the microorganisms under study. Therefore, this study provides evidence of the fact that these essential oils may be used as therapeutic resources for the control of mastitis.

Key-Words: Subclinical Mastitis, antimicrobial activity, essential oils.

Introduction

Mastitis, an inflammatory process in the mammary glands, causes major economic losses to dairy farms due to the decrease in milk production and quality, to the increase in medication use and to the risk of animal death⁷. The etiology of this disease has shown that it may have toxic, traumatic, allergic, metabolic, and, mainly, infectious origins.

Even though several other microorganisms may affect the intramammary region and cause an infection, *Staphylococcus aureus* is the main etiologic agent of chronic mastitis in dairy cows⁹. Despite the fact that bacteria are the agents which are more likely to be isolated, there are some cases of environmental microorganisms in the literature, mainly yeast from the genera *Candida* spp. and *Cryptococcus* spp.¹².

Antibiotic therapies have been the most common procedures in the treatment of mastitis in dairy cows. However, concern with traces of antibiotics in milk and with resistant bacterial strains has led to the search for alternatives that may mitigate or eliminate such problems⁵. Researchers have become increasingly interested in natural products as sources of new drugs, such as medicinal plants⁸.

Therefore, this study aimed at evaluating the antimicrobial activity of essential oils found in Brazil nuts and sunflower seeds against microorganisms isolated from milk from mammary quarts with subclinical mastitis.

Material and Methods

Chromatographic analyses of Brazil nut and sunflower seeds oils were carried out by a GC-2010 chromatographer (Shimadzu, Japan) with an Elite-WAX capillary column (0.25 μm x 30m x 0.25mm). The injection of 1 μL of the sample was carried out in split mode (1:25). The carrier gas was H_2 (1.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). The initial temperature of the column was 140°C for 5min; then, it was increased 4°C per minute, up to 230 °C for 10min. Quantification was performed by the area normalization method proposed by GCSolution software whereas the identification of fatty acids was carried out by comparison with FAME MIX 37 standards (Sigma-Aldrich).

In this study, microorganisms that had been previously identified by the Vitek 2 system were selected: *Staphylococcus aureus* (n=10), *Enterococcus* spp. (n=4), *Candida* spp (n=4) and *Cryptococcus laurentii* (n=3) from bovine subclinical mastitis.

The determination of the minimum inhibitory concentrations (MIC) of the oils was carried out by the broth microdilution technique, in agreement with CLSI 2008 (protocols M7-A6 and M27-A3, for bacteria and yeasts, respectively), adapted to a phytopharmacological agent.

In order to carry out the bacterial test, sterile microdilution plates had been previously filled with 100µL Müller-Hinton broth; ten successive oil dilutions, whose concentration varied from 170.8 to 0.33µg.mL⁻¹, were made. Afterwards, plates were inoculated with 50µL of the bacterium to be tested. It had been prepared to comply with 0.5 turbidity in the McFarland scale and adjusted in a cultivation media. After incubation at 36°C for 18 h, the plates had their minimum inhibitory concentrations (MIC) determined. In order to determine their minimum bactericidal concentrations (MBC), an aliquot of 5µL - from the first well of the microplate on which there was growth and from two preceding ones - was planted on a plate with Brain Heart Infusion Agar and incubated for 24 h so that bacterial growth could be observed.

Regarding yeasts, ten successive dilutions of oils were made on the microdilution plates; concentrations varied from 83.3 to 0.16 µg.mL⁻¹ in RPMI media. The microplates were inoculated with 100.0µL of the microorganism to be tested and incubated at 36°C for 48h. Then, the plates had their minimum inhibitory concentrations (MIC) determined. In order to determine their minimum fungicidal concentrations (MFC), an aliquot of 5µL - from the first well of the microplate on which there was growth and from two preceding ones - was planted on a plate with Sabouraud dextrose agar and incubated for 24 h so that yeast growth could be observed.

Results

Results of the chromatographic analysis of Brazil nut and sunflower seed oils are shown in Table 1. The following fatty acids were found in the oils under study: myristic acid (C 14:0), palmitic acid (C 16:0), palmitoleic acid (C 16:1), margaric acid (C 17:0), stearic acid (C 18:0), oleic acid (C18:1n9c), linoleic acid (C18:2n6c), linolenic acid (C18:3n3), arachidic acid (C20:0), gadoleic acid (C20:1n9), behenic acid (C22:0) and

lignoceric acid (C24:0). Results showed that oleic acid (C18:1n9c) and linoleic acid (C18:2n6c) are the fatty acids with the highest concentrations in Brazil nut oil. The former composes 30.61% whereas the latter composes 47.26% of Brazil nut oil. Myristic acid (C 14:0) is the one with the lowest concentration (0.044%) in the composition of the fatty acids found in the sample.

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the oils, in relation to the microorganisms under study, are shown in Table 2. In the case of Brazil nut oil, the averages of these concentrations were 36.30; 21.35; 15.62; and 10.41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Candida* spp. and *Cryptococcus laurentii*, respectively. In the case of 19 isolated microorganisms, MIC was similar to MBC/MFC. Regarding the sunflower seed oil, MIC's were 23.5; 19.21; 7.81; and 1.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Candida* spp. and *Cryptococcus laurentii*, respectively. MBC/MFC of this oil were equal to MIC's of 18 microorganisms.

Discussion

Venkatachalam et al. determined the fatty acids found in Brazil nut oil in 2006: their values were similar to the ones found in this study, i. e., 45.43% of linoleic acid and 28.75% of oleic acid. Other authors, who also studied the content of fatty acids in this oil, found similar results^{10,12}. Gas chromatography was employed to quantify the content of fatty acids in both previously mentioned studies.

The sunflower seed oil has the same main compounds of the Brazil nut one, i. e., oleic acid represents 35.80% and linoleic acid is 52,64% of the total amount of fatty acids. Margaric acid (C 17:0) comprises only 0.039% of this oil. It is worth mentioning that linoleic acid is the most abundant unsaturated fatty acid in both samples under study.

Studies reported in literature have shown that linoleic acid is able to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, since it affects the protein synthesis on cell walls and on the nucleic acids⁶.

MIC values were higher against *S. aureus* (36.6 and 23.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for Brazil nut and sunflower seed oils, respectively) for both essential oils under study. Increase in the prevalence of multiresistant *S. aureus* which causes bovine mastitis is a serious problem worldwide since antimicrobial agents have got less effective and morbidity rates and

costs to fight the disease have increased. There is considerable genetic heterogeneity in natural populations of *S. aureus*. Besides, it is an important pathogen which causes diseases that result from food ingestion, i. e., the intake of toxins; thus, it may lead to a public health problem¹⁵.

MBC was equal to MIC in 80% of the isolated microorganisms in the Brazil nut oil and in 70% of the sunflower seed oil ones. It shows that the oils exerted bactericidal/fungicidal and bacteriostatic/fungistatic activities against these strains. In a study carried out by Aquino et al. (2010), the essential oil of *Ocimum basilicum* had bactericidal and bacteriostatic activity against *S.aureus* strains. Five out of eight strains under study were inhibited and killed when MIC's and MBC's were 3.12 and 6.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively.

Table 2 shows that the essential oils under study exerted activity against yeasts in low concentrations; they varied from 10.41 to 20.83 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in the case of Brazil nut oil and from 0.33 to 10.41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in the case of sunflower seed oil. The activity essential oils exert against these microorganisms has been emphasized due to the scarcity of antimycotic pharmacological agents available in an adequate way to treat mycotic mastitis, mainly when antimicrobial medicines often used to fight the bacterial disease are compared.

High sensitivity was observed for *Cryptococcus laurentii* when sunflower seed oil was used; average MIC and MFC were 1.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Regarding isolated microorganisms of *Candida* spp., the oils under analysis also had inhibitory activity in low concentrations; this fact is relevant since *Candida* represents the most commonly isolated pathogen from infections found in mammary glands of dairy cows, among all yeasts^{11,14}. Besides, these results are also important due to the development of resistance against azolic agents which may cure candidiasis (caused by this yeast) in animals².

Results showed that essential oils exerted antimicrobial activity against these microorganisms. Taking into account not only the present difficulty to control and treat bovine mastitis but also the traces of antibiotics found in milk and its derivatives, data collected in this study provide evidence of the potential use of Brazil nut and sunflower seed oils as therapeutic resources for the control of this disease.

References

1. AQUINO, L.C.; SANTOS, G.G.; TRINDADE, R.C.; ALVES, J.A.; SANTOS, P.O.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; CARVALHO, L.M. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjerição frente a bactérias de carnes bovinas. **Alim. Nutr. Araquara**. v.21, n.4; p.529-535, 2010.
2. CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.; FONSECA, A.O.; ALVES, G.H.; MEIRELES, M.C.A.; RODRIGUES, M.R.A. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.1, p.43-49, 2012.
3. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. M7-A6, 2008.
4. COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista da Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v.1, n.1, p.3-7, 1998.
5. FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.
6. MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **An bras Dermatol**, v. 78, n. 5, p. 393-410, jul./ago. 2003.
7. MELCHIOR, M.B., FINK-GREMMELS, J., GAASTRA, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. **J. Vet. Med. B**. v. 53, 326–332, 2006.

8. PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M. C. M and FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica**. Brasilica. Vol. 20, n.4. 2006.
9. ROBERSON J. R.; FOX L. K., HANCOCK D. D.; GAY J. M. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **J. Dairy Sci.**, v.77, n.11, p.3354-3364, 1994.
10. RYAN, E.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T.P.; MAGUIRE, A.R.; O'BRIEN, N.M. Fatty acid profile, tocoferol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 57, n.3/4, p. 219-228, 2006.
11. SANTOS, R.C.; MARIN, J.M.; Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v.159, p.251-253, 2005.
12. SPANAMBERG, A.; SANCHES, E.M.; SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v.39, n.1., Santa Maria, 2009.
13. VENKATACHALAM, M.; SATHE, S.K. Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.470, 2006.
14. WUNDER JÚNIOR, E.A. Mastite bovina: avaliação microbiológica do leite, com ênfase nas leveduras isoladas de casos de mastite clínica e subclínica, na região do planalto médio-RS, em 2005 e 2006. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

15. ZAFALON, L.F.; ARCARO, J.R.P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; CASTELANI, L.; BENVENUTOO, F. Investigation og the antimicrobial resistance patterns in *Sthaphylococcus aureus* isolated in the milking of cows in the lactation. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 67(2) 118-125, 2008.

Table 1. Identification and concentration of fatty acids found in Brazil nut and sunflower seed oils

Compound	Brazil nut oil (%)	Sunflower seed oil (%)
Myristic acid (C 14:0)	0.044	0.071
Palmitic acid (C 16:0)	13.467	5.791
Palmitoleic acid (C 16:1)	0.232	0.073
Margaric acid (C 17:0)	0.129	0.039
Stearic acid (C 18:0)	7.741	4.106
Oleic acid (C 18:1n9c)	30.606	35.805
Linoleic acid (C 18:2n6c)	47.256	53.638
Linolenic acid (C 18:3n3)	0.095	0.043
Arachidic acid (C 20:0)	0.194	0.244
Gadoleic acid (C 20:1n9)	0.070	0.096
Behenic acid (C 22:0)	0.099	0.0866
Lignoceric acid (C 24:0)	0.065	0.228
Total	100.00	100.00

Table 2. Minimum inhibitory concentrations and minimum bactericidal/fungicidal concentrations of essential oils found in Brazil nuts and sunflower seeds

Microorganism	Brazil nut oil		Sunflower seed oil	
	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MBC/MFC	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	MBC/MFC
<i>S. aureus</i>	42,71	42,71	21,35	21,35
	42,71	42,71	21,35	21,35
	21,35	42,71	21,35	21,35
	42,71	42,71	21,35	21,35
	85,42	85,42	42,71	42,71
	21,35	42,71	21,35	42,71
	21,35	21,35	10,68	21,35
	42,71	42,71	21,35	21,35
	21,35	21,35	42,71	42,71
	21,35	21,35	10,68	21,35
<i>Enterococcus</i> spp.	21,35	21,35	21,35	21,35
	21,35	21,35	21,35	21,35
	21,35	21,35	21,35	21,35
	21,35	21,35	21,35	21,35
<i>Candida</i> spp.	10,41	10,41	5,21	5,21
	20,83	20,83	5,21	5,21
	20,83	20,83	10,41	10,41
	10,41	10,41	10,41	10,41
<i>Cryptococcus</i> <i>laurentii</i>	10,41	10,41	0,65	0,65
	10,41	10,41	2,60	2,60
	10,41	10,41	0,33	0,33

5. CONCLUSÃO

- Através da realização das provas bioquímicas, 86,7% das bactérias *Staphylococcus* spp, isoladas de leite de vaca com mastite subclínica foram coagulase positivas. A identificação das espécies através do sistema automatizado Vitek 2 confirmou que 22 (73,3%) das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva pertencem a espécie *S. aureus*, sendo esse o principal agente etiológico responsável pela mastite.
- Os isolados selecionados de *Staphylococcus* coagulase negativa foram identificados, quanto a espécie, como: *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus sciuri*.
- Resultados obtidos nesse trabalho demonstram vulnerabilidade na identificação de micro-organismos através de provas bioquímicas, uma vez que cepas identificadas como *Enterococcus*, através do Vitek 2, haviam sido consideradas como *Staphylococcus* coagulase positiva.
- No antibiograma, 100,0% dos isolados bacterianos foram resistentes a trimetoprima, 96,7% a tetraciclina, 90,0% a neomicina, norfloxacin e cefalexina, 86,7% a gentamicina, 73,3% a penicilina, 63,3% a enrofloxacin, 53,3% a amoxicilina e bacitracina, 56,7% a ceftiofur e 43,3% a ampicilina. O perfil de resistência apresentado pelas bactérias estudadas configura um importante motivo de preocupação, uma vez que os antibióticos disponíveis no mercado não apresentam efeito sobre tais micro-organismos dificulta o tratamento de animais doentes e, conseqüentemente, agrava as perdas econômicas decorrentes da mastite.
- Os resultados obtidos através do cromatograma demonstra que os ácidos graxos que estão em maior concentração no óleo de Castanha-do-Brasil são o ácido oléico (C18:1n9c) e ácido linoléico (C18:2n6c), representando 30,61% e 47,26%, respectivamente.

- No óleo de Semente de Girassol, os componentes majoritários são os mesmos do óleo de Castanha-do-Brasil, sendo que a composição de ácido oléico representa 35,80 % e do ácido linoléico 52,64% da composição total de ácidos graxos.
- A CIM do óleo de Castanha-do-Brasil foi: 36,30; 21,35; 15,62 e 10,41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Candida* spp e *Cryptococcus laurentii*, respectivamente. Para 90,5% dos isolados, a CIM foi semelhante a CBM/CFM. Em relação ao óleo de Semente de Girassol, a CIM média foi igual a: 23,5; 19,21; 7,81 e 1,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para *S. aureus*, *Enterococcus* spp, *Candida* spp e *Cryptococcus laurentii*, respectivamente. A CBM/CFM desse óleo foi igual à CIM para 85,7% dos micro-organismos, indicando que os óleos apresentaram ação bacteriostática/fungistática e bactericida/fungicida frente a essas cepas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. C.; MENDES, C.P.A.; SILVA, D. B. Fatores determinantes da ocorrência de mastite bovina, detectada em rebanhos através da análise de leite em latões. **Revista Higiene Alimentar.**, v.19, n.134. Agosto, 2005.

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quím Nova.** 31(5):1224-9, 2008.

BAKKALI, M.T.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAMOMAR, M. Biological effects of essential-oils-a review. **Food and Chemical Toxicology.** 46: 446-475, 2008.

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci grow aerobically. In: MURRAY, P.R et al. (Eds). Manual of clinical microbiology. Washington: **American Society for Microbiology**, p.384-404, 2003.

BARBERIO, A.; GIETL, H.; DALVIT, P. “In vitro” sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. **Rev. Napgama**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 10, 2002.

BEDIN, C.; WALD, V.B.; WIEST, J.M.; Atividade antibacteriana in vitro do decoto de *Origanum appli* (Dormin.) Boros – Labiatae (orégano, manjerona) sobre agentes de interesse em alimentos. **Arq. Faculd. Vet. UFRGS.** Porto Alegre, v.26, n.01, p.113-115, 1998.

BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J.; FOX, L. K.; HARMON, R. J.; HOGAN, J. S.; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P.; SMITH, K. L.; SORDILLO

L. M. Current Concepts of Bovine Mastitis. 4. ed. Madison: National Mastitis Council, 1999. 64 p.

BRASIL. Decreto nº51.209, de 18/08/1961. Aprova as novas especificações para classificação e fiscalização da exportação da "Castanha-do-Brasil". Brasília/DF: Diário Oficial de Brasília, p. 853-855. 1961.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeto de Monitoramento da Castanha-do-Brasil. **Relatório de Atividades** – 2002. Brasília/DF: 2002. P. 110.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 53(5):531-537, 2001.

CAMPANA, E. H.; CARVALHAES, C. G.; BARBOSA, P. P.; MACHADO, A. M. O.; PAULA, A. M.; GALES, A. C. Avaliação das metodologias M.I.C.E.®, Etest® e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 2, p. 157-164, 2011.

CARVALHO, A.F.; COSTA, C.; NOVAES, D.M.; PINTO, M.P.A.; AROUCA, N.E. Agricultura urbana: alternativa de segurança alimentar e geração de renda, Viçosa, MG. In: **2º Congresso Brasileiro de Extensão Rural**, Anais, Belo Horizonte, 2004.

CARVALHO, H.H.C.; CRUZ, F.T.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/ Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.7, n.3, p.25-31, 2005.

CASTIGLIONO, V.B.; BALLA, A.; CASTRO, C.; SILVEIRA, J.M. Fases de desenvolvimento da planta de Girassol. Londrina: EMBRAPA-CNPSO 24p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 5°), 1997.

CASTRO, C. de; CASTIGLIONI, V. B. R.; BALLA, A.; LEITE, R. M. V. B. de C.; MELO, H. C.; GUEDES, L. C. A.; FARIAS, J. R. A cultura do girassol. Londrina: EMBRAPA / CNPSO, 1997. 36p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 13).

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.; FONSECA, A.O.; ALVES, G.H.; MEIRELES, M.C.A.; RODRIGUES, M.R.A. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isolados de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.1, p.43-49, 2012.

COLDEBELLA, A.; MACHADO, P. F.; DEMETRIO, P. C. G. B.; RIBEIRO JUNIOR, P. J.; MEYER, P. M.; CORASSIN, C. H.; CASSOLI, L. D. Contagem de Células Somáticas e Produção de Leite em Vacas Holandesas Confinadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v.33, n.3, p. 623-634, 2004.

COSTA, R.M.A.; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de Mutagênese Ambiental. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** 12: 24-26, 2000.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista da Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v.1, n.1, p.3-7, 1998.

COSTA, H.S. **Estudo do comportamento do processo de ozonização como póstratamento de efluentes de sistemas de tratamento anaeróbio de águas residuárias domiciliares**. Tese de doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

COZZOLINO, S. M. Novas recomendações de nutrientes interpretação e utilização. In: Usos e aplicações das “Dietary Reference Intake”. DRIS. São Paulo: ILSI/SBAN, 2001.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Construindo a História dos produtos naturais. **Multiciência**. V.7. p.16. 2006.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**. 21: 308-323, 2007.

ERNST, E.; PITTLER, M.H. Risks associated with herbal medicinal products. **Wiener Medizinische Wochenschrift** 152:183-189, 1998.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FARAGO, P.V.; TAKEDA, I.J.M.; BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R. Análise morfo-anatômica de folhas de *Pereskia grandifolia* Haw., Cactaceae. **Acta Farm Bonaerense** 23: 323- 327, 2004.

FERRONATTO, R; MARCHESAN, E.D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, n.2, p.224-230, 2007.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G., PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour Frag J**, 23: 213-22, 2008

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

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R et al. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.8, p. 3400-19, 2009.

HEBERT, A.; SAYASITH, K; SENECHAI, S.; DUBREUIL, P.; LAGACE, J.. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **Microbiol Lett** 193: 57-62, 2000.

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2011. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus* In: MURRAY, P. R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. Manual of Clinical Microbiology. 7. ed. Washington, D.C.: ASM Press, p. 264, 1999.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.A.; SCHERECKNBERGUER, PC.C.; WIM, W.C. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1465p, 2001.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J.; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of orégano essential oil. Thymol and carvacrol. **J. Appl. Microbiol.**, Washington, v.91, p. 453-462, 2001.

MARGATHO, L.F.F.; HIPOLITO, M.; KANETO, C.N. Métodos de prevenção, controle e tratamento da mastite bovina. Bol. Téc. Inst. Biol., São Paulo, n.9, p.5-35, 1938.

MARQUES, D. C. Criação de Bovinos. 7. ed. rev., atual e ampl., Belo Horizonte: CVP Consultoria Veterinária e publicações. p. 435-450, 2006.

MARTINS, V.G. **Avaliação da Toxicidade de Substâncias Antivirais Derivadas de Algas Marinhas e Substancias Sintéticas em Camundongos BALB/c**. Dissertação de mestrado submetida a Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2009.

MELCHIOR, M.B., FINK-GREMMELS, J., GAASTRA, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. **J. Vet. Med. B.** 53, 326–332, 2006.

MENDONÇA, C.L. et al. Etiologia da mastite bovina. **Veterinária Notícias.**, Uberlândia, v.5, n.1, p.107-118, 1999.

MENNINGER, E.A.. Edible nuts of the world. **Brazil nut family**. 174p. 1977.

MOTA, R. A. et al. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do estado de Pernambuco. **Revista Napgama.**, São Paulo. v.7, p.10-13, 2004.

NASCIMENTO, F.S.; TAVEIRA, C.C. Avaliação da qualidade de amostras de Camellia sinensis (L.) Kuntze (chá verde) comercializadas no Distrito Federal – Brasil. **Anu Prod Inic Cient Disc** .13(17):63-80, 2010.

NOVAIS, T.S. COSTA, J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.14, supl., p.08-11, 2003.

NYBG – The New York Botanical Garden. The Brazil nut Industry – Past, present and the future. Disponível em: <http://www.nybg.org/bsci/braznut/>. Acesso em 10/06/2013.

OGARA, E.A.; HILL, D.J.; MASLIN, D.J. Activities of garlic poder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. Appl. Environm. **Microbiol.**, Washington. V.66, p. 2269-2273, 2000.

OLIVER, S.P.; MURINDA, S.E.. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **Vet. Clin. North Am. Food An. Pract.** 28, 165-185, 2012

OYARZABAL, M.E.B. **Aplicação do óleo essencial do Orégano (*Origanum vulgare*) no tratamento da mastite bovina e presença de fungos no leite bovino in natura**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

PACHECO, A.M. **Selênio e aflatoxinas em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) e qualidade de produtos derivados**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007

PEIXOTO, R.; FRANÇA, C.A.; JÚNIOR, A.F.; VESCHI, J.L.; COSTA, M.M. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos de mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnostico. **Pesq. Vet. Bras.** 30(9):735-740, 2010.

PERES NETO, F.; ZAPPA,V. Mastite em vacas leiteiras. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Graça, SP, a. 9, n. 16, 2011.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p, 2003.

PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M. C. M and FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica. Brasilica**. Vol. 20, n.4. 2006.

RADOSTITS, O.M., SAY, C.C.; BLOOD, D.C. et al. Clínica veterinária. 9.ed. Rio de Janeiro, 2000. p.1118-1119.

RIBEIRO, J. N. Segurança alimentar no leite à entrada da fábrica. **Segurança e Qualidade Alimentar**, Lisboa, n. 4, maio, 2008.

ROBERSON J. R.; FOX L. K., HANCOCK D. D.; GAY J. M. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **J. Dairy Sci.**, v.77, n.11, p.3354-3364, 1994.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; TAMIKO, I.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materiais Research**, v.6.; p.327-320, 2003.

SANTOS , M. V. Controle da mastite ambiental. Mundo do Leite, São Paulo, a. 10, n. 56, ago./set. p. 16-21, 2012.

SCHUCH, L.F.D. **Plantas medicinais em atenção primária veterinária: atividade antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e a dermatófilos**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

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.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed.

Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Editoia da UFSC, 2001.

SIMÕES, T.; OLIVEIRA, A. Mastite Bovina, considerações e Impacto econômico. Disponível em http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf. Aracajú, 2012.

SMIDERLE, O. J. Produtividade e Teor de Óleo de Girassol em Plantio Direto Sob Quatro Doses de Calcário. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2010. 19p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Roraima, 30).

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, MG; Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agentes. **Current Opinion in Biotechnology**; 23; 1-6; 2011.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E.M.; SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v.39, n.1., Santa Maria, 2009.

SPEROTTO, V.R. **Atividade antibacteriana *in vitro* do decoto de *Achyrocline saturoides* (Lam.) D.C. – Asteracea – (“macela”), sobre bactérias isoladas de mastite bovina.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul., 2010.

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; ANDRADE, M. L. S.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p.498-502, 2009.

TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos. Editora Atheneu, 3ª edição, São Paulo, 2001.

TEIXEIRA, A.B. **Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotipos I, II e III de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown.** Dissertação(Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, 2009.

TOLLERSRUD, T. et al. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. From Europe and the United States. **Journal Clinical Microbiology.**, v.38, n.8, p.2998- 3003, 2000.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.A. Medicinal plants: safe cure? **Quim. Nova**, v.28, p.519-528, 2005.

ZAFALON, L.F.; ARCARO, J.R.P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; CASTELANI, L.; BENVENUTOO, F. Investigation og the antimicrobial resistance patterns in *Sthaphylococcus aureus* isolated in the milking of cows in the lactation. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 67(2) 118-125, 2008.