

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

Yuri Barreiros

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES À BASE DE GOMA  
XANTANA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA *IN VITRO* EM ESPÉCIES DE  
MICRORGANISMOS CAUSADORES DA MASTITE BOVINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Ariolvado Bolzan

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Barreiros, Yuri

Desenvolvimento de Filmes à Base de Goma Xantana e Avaliação da Atividade Antimicrobiana In Vitro em Espécies de Microrganismos Causadores da Mastite Bovina / Yuri Barreiros ; orientador, Ricardo Antonio Francisco Machado, coorientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo, 2018.

120 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Mastite bovina. 3. Solução filmogênica. 4. Óleo essencial. 5. Atividade antimicrobiana. I. Antonio Francisco Machado, Ricardo. II. Henrique Hermes de Araújo, Pedro. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Yuri Barreiros

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES À BASE DE GOMA  
XANTANA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA *IN VITRO* EM ESPÉCIES DE  
MICRORGANISMOS CAUSADORES DA MASTITE BOVINA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 11 de setembro de 2018.

---

Prof.<sup>a</sup> Cíntia Soares, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenadora do Curso

---

Prof. Ricardo Antonio Francisco Machado, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.  
Coorientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Ariovaldo Bolzan, Dr.  
Coorientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Jonathan Alexsander Bork, Dr.  
Universidade do Sul de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Cristiane da Costa Bresolin, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Luiz Fernando Belchior Ribeiro, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade e ao Laboratório de Controle e Processos de Polimerização pela disponibilização do espaço físico para realização dos ensaios experimentais.

Aos docentes e servidores que compõem o Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química da UFSC (PosENQ).

Ao Prof. Pedro, Ricardo e Ariovaldo pela orientação, disponibilidade e acessibilidade na resolução de problemas.

A Prof.<sup>a</sup> Fabienne do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (MIP/UFSC), por ter disponibilizado o laboratório e principalmente pela ajuda nos testes microbiológicos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e bolsa de estudos.

À Equipe do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB/UFSC) pelas análises de microscopia óptica.

A Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao servidor Leandro Guarezi.

Ao Luiz e aos professores Jonathan e Cristiane que se disponibilizaram a compor a banca examinadora desse documento.

A todos os meus colegas do PosENQ e do LCP que não farei distinção nesse trabalho, o meu muito obrigado.



*“Ambition is the path to success. Persistence  
is the vehicle you arrive in.”  
(Bill Bradley)*





## RESUMO

A mastite bovina é uma doença que causa grandes perdas econômicas para as indústrias de laticínios. Esta doença é provocada por microrganismos, que ao entrar em contato com o canal do teto causam inflamação na glândula mamária. A desinfecção dos tetos é a prática mais comum para reduzir a incidência desta doença. Soluções desinfetantes (*pós-dipping*) formam uma barreira protetora no teto que impedem o crescimento desses microrganismos patogênicos. Porém estas soluções podem impactar negativamente a saúde do animal ou a qualidade do leite. Neste trabalho, foram produzidas soluções filmogênicas à base de goma xantana incorporada com óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllata*), canela (*Cinnamomum cassia*) e orégano (*Origanum vulgare*) com o objetivo de avaliar sua atividade antimicrobiana frente a três espécies de microrganismos causadores da mastite bovina, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. As soluções filmogênicas foram preparadas com diferentes concentrações (0,1; 0,3; 0,5; 1; 2 e 3%) dos óleos essenciais utilizando duas metodologias diferentes, uma de baixa energia na qual se obteve uma emulsão (SFE) por agitação mecânica, e uma de alta energia obtendo uma nanoemulsão (SFN) por ultrassom. Os testes antimicrobianos foram avaliados por difusão em ágar e, neste teste, os resultados foram melhores para as SFE do que para as SFN, o que pode ter ocorrido por influência do surfactante utilizado na nanoemulsão.

As SFE foram mais eficazes nos testes por difusão, a formação dos halos ficaram próximas ou maiores dos halos formados pelo controle positivo (*pós-dipping* comercial), principalmente nas concentrações de 2 e 3% de óleo de canela e óleo de orégano contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Já nos resultados dos testes de concentração inibitória mínima (CIM) adaptado em placas, tanto as SFE como as SFN mostraram excelente eficiência nas concentrações de óleo acima de 1%, inibindo completamente o crescimento de todos os microrganismos. Os melhores resultados antimicrobianos contra todos os microrganismos foram utilizando as formulações contendo 0,3% de óleo de orégano, tanto para as SFE como para as SFN. Estes resultados indicam que as soluções formadoras de filme contendo óleos essenciais preparadas neste trabalho tem potencial aplicação no tratamento da mastite bovina.

**Palavras-chave:** Mastite bovina; solução filmogênica; óleo essencial; atividade antimicrobiana.



## ABSTRACT

Bovine mastitis is a disease responsible for causing large economic losses to the dairy industry. It is caused by microorganisms after contact with the ceiling canal, causing mammary gland inflammation. Ceilings disinfection is the most common practice to reduce the incidence of this disease. Post-dipping solutions form a protective barrier in the roof that prevents the growth of these pathogenic microorganisms, but these solutions may negatively affect animal health or milk quality. In this work, filmogenic solutions based on xanthan gum incorporated with clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*), cinnamon (*Cinnamomum cassia*) and oregano (*Origanum vulgare*) were produced and then evaluated around the antimicrobial activity against three species bovine mastitis-causing microorganisms, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The filmogenic solutions were prepared with different concentrations (0.1, 0.3, 0.5, 1, 2 and 3%) of the essential oils using two different methodologies, one of low energy in which an emulsion (FSE) was obtained by mechanical agitation, and a high energy obtaining a nanoemulsion (FSN) by ultrasound. The antimicrobial tests were evaluated by agar diffusion and, in this test, the results were better for the SFE than for the SFN, which may be related to the presence of surfactant to stabilize the nanoemulsion. The halos formation was similar or greater than the halos formed by the positive control (commercial post-dipping), mainly at concentrations of 2 and 3% of cinnamon oil and oregano oil against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*. The results of the minimum inhibitory (MIC) concentration tests (adapted methodology to plates), both FSE and FSN showed excellent efficiency at oil concentrations above 1%, inhibiting completely the growth of all microorganisms. The best antimicrobial results against all microorganisms were using formulations containing 0.3% of oregano oil, for both FSE and FSN. These results showed that the xanthan gum film forming solutions incorporated essential oils had promisor application in mastitis prevention.

**Key words:** Bovine mastitis; film-forming solution; Essential oil; antimicrobial activity



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da prevalência de mastite clínica e subclínica em um rebanho de bovinos leiteiros. ....	29
Figura 2 - Média da CCS dos produtores no Brasil no período de 2006 a 2016. ....	30
Figura 3 - Custo médio de um caso de mastite clínica (US\$ 107). ....	37
Figura 4 - Estrutura química de alguns constituintes de óleos essenciais. ....	43
Figura 5 - Estrutura química da goma xantana. ....	50
Figura 6 - Cromatogramas dos OECR (1), OECA (2) e OEOR (3). ....	64
Figura 7 - Histograma da distribuição média das gotas de óleo essencial de cravo incorporado nas SFE em concentrações de 0,1% e 3% no dia 1 e dia 30. ....	66
Figura 8 - Ensaio de difusão em placa de ágar utilizando a técnica do poço para determinar a atividade antimicrobiana das SFE e SFN contendo óleo essencial de cravo (1 - OECR), canela (2 – OECA) e orégano (3 – OEOR). ....	74
Figura 9 - Ensaio da concentração inibitória mínima (CIM) em placa adaptado das SFE e SFN contendo óleo essencial de cravo (■), canela (■) e orégano (■) nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1; 2 e 3%. ....	77



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre a viscosidade, o escore e a contagem de células somáticas do teste CMT. ....	28
Tabela 2 - Efeito da mastite bovina em relação aos componentes do leite. ....	38
Tabela 3 - Diferentes formulações da solução filmogênica base. ....	57
Tabela 4 - Formulações das soluções filmogênica da emulsão (SFE)...	59
Tabela 5 - Formulações das soluções filmogênica da nanoemulsão (SFN).....	60
Tabela 6 - Viscosidade das formulações da solução filmogênica base. ....	63
Tabela 7 - Principais componentes dos óleos essenciais de cravo, canela e orégano determinados por CG-MS.....	65
Tabela 8 - Diâmetro médio (Dp) das gotas de óleo incorporadas nas SFE no dia 1 e dia 30 para os óleos essenciais de cravo (OECR), canela (OECA) e orégano (OEOR). ....	68
Tabela 9 - Diâmetro médio (Dp) das gotas de óleo das nanoemulsões antes e após a incorporação nas SFN no dia 1.....	69
Tabela 10 - Diâmetro médio (Dp) das gotas de óleo das nanoemulsões antes e após a incorporação nas SFN no dia 30.....	70
Tabela 11 - Ensaio da atividade antimicrobiana das SFE e SFN incorporadas com óleos essenciais de cravo (OECR), canela (OECA) e orégano (OEOR) contra o crescimento de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> pela técnica de difusão em poços.....	73
Tabela 12 - Ensaio da concentração inibitória mínima (CIM) em placa adaptado das SFE e SFN contendo óleo essencial de cravo (OECR), canela (OECA) e orégano (OEOR) nas concentrações de 0,1; 0,3 e 0,5%. ....	75
Tabela 13 - Melhores resultados dos testes por difusão em Agar. ....	78
Tabela 14 - Melhores resultados dos testes da concentração inibitória mínima (CIM). ....	78





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BA - Bahia  
C<sup>-</sup> - Controle negativo  
C<sup>+</sup> - Controle positivo  
CBM - Concentração bactericida mínima  
CE - Ceará  
CCS - Contagem de células somáticas  
CFM - Concentração fungicida mínima  
CG-MS - Cromatógrafo gasoso com espectro de massa  
CIM - Concentração inibitória mínima  
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute  
CMT - *California Mastitis Test*  
ES - Espírito Santo  
DLS - Dynamic light scattering  
D<sub>p</sub> - Diâmetro da partícula  
FDA - Food and Drug Administration  
GO - Goiás  
MG - Minas Gerais  
MHA - Ágar Mueller-Hinton  
MS - Mato Grosso do Sul  
NIST - National Institute of Standards and Technology  
OECA - Óleo essencial de canela  
OECR - Óleo essencial de cravo  
OEOR - Óleo essencial de orégano  
PdI - Índice de polidispersão  
pH - Potencial hidrogeniônico  
PR - Paraná  
RJ - Rio de Janeiro  
SLS - Lauril sulfato de sódio  
SFE - Solução filmogênica da emulsão  
SFN - Solução filmogênica da nanoemulsão  
SP - São Paulo  
UFC - Unidades formadoras de colônias



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1 OBJETIVOS .....	25
1.1.1 Objetivo Geral .....	25
1.1.2 Objetivos Específicos.....	25
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	27
2.1 MASTITE BOVINA .....	27
2.2 ETIOLOGIA DA MASTITE .....	30
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	31
2.2.2 <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	32
2.2.3 <i>Mycoplasma bovis</i> .....	33
2.2.4 <i>Escherichia coli</i> .....	34
2.2.5 <i>Streptococcus uberis</i> .....	35
2.2.6 <i>Candida albicans</i> .....	36
2.3 IMPACTO ECONÔMICO DA MASTITE BOVINA .....	36
2.4 EFEITOS NA PRODUÇÃO DO LEITE, COMPOSIÇÃO E QUALIDADE .....	38
2.5 PREVENÇÃO, CONTROLE E TRATAMENTO.....	39
2.6 PÓS-DIPPING .....	41
2.7 ÓLEO ESSENCIAL.....	42
2.7.1 Óleo de cravo .....	44
2.7.2 Óleo de orégano .....	45
2.7.3 Óleo de canela .....	47
2.8 GOMA XANTANA.....	49
2.9 NANOEMULSÃO .....	52
2.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS REFERENTES AO ESTADO DA ARTE .....	55

<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	57
3.1 MATERIAL.....	57
3.2 INVESTIGAÇÃO E ELABORAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE.....	57
3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	58
3.4 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS .....	58
3.5 DISTRIBUIÇÃO MÉDIA DO TAMANHO DAS GOTAS E ESTABILIDADE.....	60
3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	61
<b>3.6.1 Microrganismos</b> .....	61
<b>3.6.2 Preparo do inóculo</b> .....	61
<b>3.6.3 Difusão em ágar (técnica do poço)</b> .....	61
<b>3.6.4 Concentração inibitória mínima (CIM) em placa adaptada</b> .....	62
<b>3.6.5 Controle positivo e negativo</b> .....	62
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	63
4.1 INVESTIGAÇÃO E ELABORAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE.....	63
4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL .....	63
4.3 DISTRIBUIÇÃO MÉDIA DO TAMANHO DAS GOTAS E ESTABILIDADE.....	65
4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	72
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	79
REFERÊNCIAS.....	81
<b>APÊNDICE A – Distribuição das gotas de óleo essencial de cravo incorporado nas SFE no dia 1 e após 30 dias</b> .....	107
<b>APÊNDICE B – Distribuição das gotas de óleo essencial de canela incorporado nas SFE no dia 1 e após 30 dias</b> .....	109
<b>APÊNDICE C – Distribuição das gotas de óleo essencial de orégano incorporado nas SFE no dia 1 e após 30 dias</b> .....	111

<b>APÊNDICE D – Distribuição das gotas de óleo essencial da nanoemulsão no dia 1 e após 30 dias.....</b>	<b>113</b>
<b>APÊNDICE E – Distribuição das gotas de óleo essencial de cravo incorporado nas SFN no dia 1 e após 30 dias.....</b>	<b>114</b>
<b>APÊNDICE F – Distribuição das gotas de óleo essencial de canela incorporado nas SFN no dia 1 e após 30 dias. ....</b>	<b>116</b>
<b>APÊNDICE G – Distribuição das gotas de óleo essencial de orégano incorporado nas SFN no dia 1 e após 30 dias.....</b>	<b>118</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A mastite é uma das doenças mais frequentes e com grande impacto econômico no setor de laticínios, havendo perdas na produção de leite, abates e medicina veterinária. A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária causada por diversas espécies de microrganismos (ABEBE *et al.*, 2016).

A mastite pode ser classificada como clínica ou subclínica, dependendo de como a doença se manifesta. Na mastite clínica os sinais são visíveis e são caracterizadas por apresentarem inchaço e vermelhidão no úbere, enquanto na subclínica os sintomas não são visíveis, sendo sua identificação observada através de alterações na composição do leite. Ainda pode ser dividida em mastite ambiental ou contagiosa segundo a forma de contaminação do microrganismo (RADOSTITS *et al.*, 2014).

Existem diversos métodos de tratamento e prevenção para reduzir os prejuízos ocasionados por essa doença, e os antibióticos são as substâncias mais utilizadas para o tratamento. Contudo, a eficiência deste é considerada, geralmente, insuficiente e varia de acordo com os microrganismos envolvidos no processo inflamatório. Além disso, o uso excessivo de antibióticos pode levar ao surgimento de cepas resistentes, e ainda pode haver resíduos no leite se tornando uma grande preocupação para os consumidores e as indústrias (DINGWELL *et al.*, 2003; WHITE; McDERMOTT, 2001).

A higiene é a principal medida para prevenir e controlar a mastite, sendo a desinfecção dos tetos o método mais utilizado devido à sua alta eficiência. Diversas soluções são utilizadas para cobrir o teto de maneira a formar uma barreira protetora que inibe o crescimento dos microrganismos (NMC, 1996). Os desinfetantes de tetos, conhecidos comercialmente como “*pós-dipping*”, possuem em sua composição substâncias como a clorexidina, iodo, peróxido de hidrogênio, ácido láctico, hipoclorito de sódio e triclosan, substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana. Porém, estas substâncias podem impactar na qualidade dos laticínios e na saúde do animal, causando irritação e ressecamento dos tetos, impacto na microbiota anfibiótica animal e aumento da resistência antimicrobiana, podendo ainda gerar resíduos no leite (WU *et al.*, 2016; GUO; IWATA, 2017; LI *et al.*, 2014; MARGATHO; PEDRINI; CURCI, 2014; FITZPATRICK; GARVEY; GLEESON, 2018).

Diante disso, os óleos essenciais vêm sendo investigados como produtos naturais e alternativos na prevenção da mastite, já que são

substâncias consideradas geralmente seguras de acordo com a Food and Drug Administration (FDA, 2017) dos Estados Unidos. Os óleos essenciais apresentam em sua composição compostos biologicamente ativos com propriedades antimicrobianas (AMATISTE *et al.*, 2014; HAMEDÍ; RAZAVI-ROHANI; GANDOMI, 2014; YOUSEFI ASLI *et al.*, 2017). Óleos essenciais de canela, cravo e orégano têm ganhado atenção, visto a sua elevada atividade antimicrobiana contra uma ampla variedade de microrganismos (YILDIRIM; OZTOP; SOYER, 2017; MULLA *et al.*, 2017; HEREDIA-GUERRERO *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2017), que pode ser justificada pela presença de compostos bioativos em sua composição, como cinamaldeído, eugenol e carvacrol (BURT, 2004; SANTURIO *et al.*, 2011; RADAELLI *et al.*, 2016).

Matrizes poliméricas biodegradáveis são utilizadas para incorporar os óleos essenciais na formulação de produtos, como a goma xantana. As propriedades toxicológicas e de segurança da goma xantana para aplicações alimentícias e farmacêuticas têm sido extensivamente pesquisadas, devido às suas propriedades como agente de controle reológico em soluções aquosas, como agente dispersante, e estabilizador de emulsões e suspensões (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

No entanto, pesquisas referentes à aplicação de óleos essenciais relacionados à mastite bovina ainda são escassas principalmente se tratando de sua incorporação em soluções filmogênicas, possibilitando então a produção de filmes com propriedades antimicrobianas. Isto desperta o interesse de investigar possíveis formulações contendo goma xantana, glicerina, água e diferentes concentrações de óleo e, então, analisar sua atividade antimicrobiana frente a alguns microrganismos responsáveis pela mastite bovina, almejando uma futura aplicação como desinfetante *pós-dipping*.



## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Produzir soluções filmogênica à base de goma xantana e glicerina, incorporado com os óleos essenciais de cravo, canela e orégano e avaliar sua atividade antimicrobiana *in vitro* contra espécies de microrganismos causadores da mastite bovina.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a composição da formulação base da solução filmogênica por meio da viscosidade de um produto de referência;
- Avaliar a dispersão dos óleos essenciais quanto ao diâmetro nas soluções filmogênicas e estabilidade coloidal;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das soluções filmogênicas no controle de cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, espécies de bactérias e levedura relacionadas à mastite bovina;



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MASTITE BOVINA

A mastite bovina é uma doença multifatorial e complexa, resultante da interação entre vacas, microrganismos e o meio ambiente (RADOSTITS *et al.*, 2014). É definida como uma inflamação da glândula mamária (úbere) causada por células de defesa do organismo do animal na tentativa de eliminar microrganismos patogênicos (AITKEN; CORL; SORDILLO, 2011). Para a indústria de laticínios é considerada a doença mais grave em termos de perda econômica (CONSTABLE *et al.*, 2017).

Geralmente a inflamação do úbere é causada pela entrada dos microrganismos no canal do teto. Os microrganismos se multiplicam e produzem toxinas que causam lesões no tecido secretor do leite, causando irritantes traumas físicos e químicos, afetando diretamente a produção do leite tanto em quantidade como em qualidade, ocasionando mudanças físicas, químicas e organolépticas (KULKARNI; KALIWAL, 2013). Depois de infectado o úbere, as células de defesa dão início ao processo inflamatório para a eliminação dos microrganismos patogênicos com a finalidade de reparar o tecido danificado para que a glândula mamária retorne a sua função (BELOTI, 2014).

De acordo com Radostitis *et. al.* (2014), o desenvolvimento da mastite pode se dividir em três fases: invasão, onde ocorre a penetração do microrganismo pelo canal do teto; infecção, os microrganismos se multiplicam colonizando o tecido secretor da glândula mamária; e inflamação, que representa o início da mastite, com diferentes graus de alterações do úbere e do leite.

A mastite pode ser dividida em dois grupos, quanto a sua forma de manifestação: a mastite clínica e a mastite subclínica. Chama-se mastite clínica os casos da doença em que os sinais são visíveis, tais como inchaço do quarto infectado, aumento da temperatura, flocos ou coágulos no leite, pus ou qualquer alteração das características do leite (SCHROEDER, 2012). Na mastite subclínica não há nenhum sinal visível da doença. É caracterizada por alterações na composição do leite, tais como aumento na contagem de células somáticas, aumento nos teores de cloro ( $\text{Cl}^-$ ), sódio ( $\text{Na}^+$ ) e proteínas séricas, e diminuição nos teores de caseínas, lactose e gordura do leite (FONSECA; SANTOS, 2001).

A doença é diagnosticada de acordo com o aumento da contagem de células somáticas (CCS) através de testes auxiliares. O *California*

*Mastitis Test* (CMT) é o teste mais barato, rápido e confiável para detecção da mastite subclínica e pode ser realizado pelos próprios produtores de leite (CONSTABLE *et al.*, 2017). Neste teste o reagente do CMT (detergente aniônico neutro e um indicador de pH) é adicionado a uma amostra de leite, no qual rompe a membrana celular das células somáticas liberando o material nucléico (DNA). O material nucléico possui alta viscosidade, sendo assim a viscosidade se torna o indicativo da quantidade de células na amostra. O resultado do teste é avaliado em função do grau de gelatinização expressos em 5 escores, os quais estimam a contagem de células somáticas da amostra, conforme a Tabela 1 (SANTOS, 2013).

Tabela 1 - Relação entre a viscosidade, o escore e a contagem de células somáticas do teste CMT.

Viscosidade	Escore	CCS
Ausente	0	100.000
Leve	Traços	300.000
+	Leve/moderada	900.000
++	Moderada	2.700.000
+++	Intensa	8.100.000

Fonte: Adaptado de Santos (2013).

As células somáticas consistem principalmente em leucócitos, na sua maior parte os neutrófilos e algumas células epiteliais. A contagem de células somáticas é influenciada por diversos fatores, mas principalmente por infecções intramamárias, tornando-se um indicador bastante confiável no diagnóstico da mastite subclínica possibilitando medir o nível de infecção na glândula mamária do animal (MULLER, 2002).

Geralmente o leite não infectado contém abaixo de 200.000 células somáticas/mL. Se a contagem de células somáticas estiver acima de 300.000, algo está errado e isto pode indicar inflamação do úbere. Há uma infinidade de estudos indicando que o leite da vaca tem um nível natural entre 100.000 a 150.000 células somáticas/mL e a contagem de células somáticas muito altas indicam alterações na produção do leite (HILLERTONS, 1999).

A mastite subclínica é a causadora dos maiores prejuízos na produção leiteira. Estima-se que, para cada vaca com mastite clínica, existam até nove, ou mais, com mastite subclínica (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI; 2011).

Figura 1 - Representação esquemática da prevalência de mastite clínica e subclínica em um rebanho de bovinos leiteiros.



Fonte: Fonseca; Santos (2007).

Existe ainda outra divisão conceitual em termos da mastite, referindo-se ao tipo de agente causador, que pode ser ambiental ou contagioso. Dessa forma, a mastite é dividida em dois grandes grupos quanto ao tipo de agente patogênico causador: mastite contagiosa e mastite ambiental.

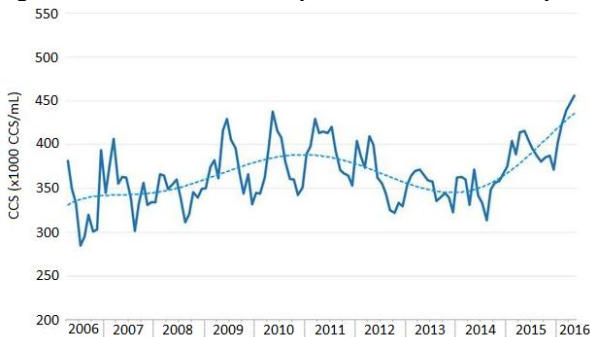
A mastite contagiosa caracteriza-se por apresentar baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos, geralmente de longa duração ou crônicos e apresentando alta contagem de células somáticas. Esse tipo de mastite é causada por patógenos cujo habitat preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos. O método predominante de transmissão de uma vaca para outra é pelo emprego de toalhas contaminadas para enxugar o úbere, presença de leite residual nas ordenhadeiras e equipamentos de ordenha inadequados (RADOSTITS *et al.*, 2014). A mastite ambiental é causada por agentes que vivem preferencialmente no habitat das vacas, em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas. Esse tipo de mastite caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração, frequentemente com manifestação aguda. Ao contrário da mastite contagiosa, nesse caso, a maioria das novas infecções ocorre durante o período entre as ordenhas, embora também haja ocorrência de novos casos durante a ordenha (FONSECA; SANTOS, 2001).

Não há diferenças marcadas na suscetibilidade à mastite. No entanto, a doença é mais frequente nas vacas de maior produção, nas mais velhas (7 a 9 anos) e nas que estão no início ou no final da lactação (CORDOVA, 2012).

A mastite é uma condição patológica dificilmente entendida, pois apresenta características multifatoriais, ou seja, há muitas variáveis que influenciam a ocorrência da mastite, como fatores ambientais, genéticos e problemas de manejo. É muito difícil generalizar a real importância de cada variável relacionada, porque certos fatores afetam determinados microrganismos (FONSECA; SANTOS, 2001).

Nos últimos anos o Brasil vem enfrentando um aumento da prevalência de mastite bovina, o que está impactando a economia. Entre o período de 2006 a 2016 foi obtido informações de quase 44 mil produtores de leite, localizados no estado de SP, MG, ES, RJ, BA, CE, GO, MS, e PR.

Figura 2 - Média da CCS dos produtores no Brasil no período de 2006 a 2016.



Fonte: Adaptado de Cassoli (2016).

Conforme a Figura 2 pode-se observar que existe uma forte tendência do aumento da CCS. A média anual da CCS é de 351 a 400 mil CCS/mL, indicando um alto índice de prevalência da mastite no qual afeta diretamente o setor de laticínios. Estes dados mostram que nos últimos 10 anos o Brasil não avançou no controle da doença, apesar dos diversos controles de mastite disponíveis. Dessa forma a mastite, é um dos maiores desafios que o Brasil terá pela frente.

## 2.2 ETIOLOGIA DA MASTITE

A mastite bovina é causada por muitos agentes infecciosos diferentes, Watts (1988) identificou 137 espécies e subespécies de microrganismos que podem estar presentes na glândula mamária de vacas leiteiras. Muitos deles fazem parte da microbiota anfibiótica, porém outros podem causar infecções.

Na bibliografia científica há registrado mais de 200 microrganismos diferentes como causadores da mastite bovina (BLOWEY; EDMONDSON, 1995). Os agentes infecciosos são classificados em dois grandes grupos: os agentes contagiosos, que se disseminam de um quarto infectado para outro quarto ou vaca, e os agentes ambientais, geralmente presentes no meio ambiente da vaca e que a partir dessa fonte alcançam o teto (RADOSTITS *et al.*, 2014).

Os principais patógenos na etiologia da mastite são o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma bovis*, sendo esses os agentes contagiosos. Os principais agentes ambientais são a *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Citrobacter*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Prototheca*, *Nocardia* e *Candida albicans* (BLOWEY; EDMONDSON, 1995; RIET-CORREA *et al.*, 2001; CONSTABLE *et al.*, 2017).

### **2.2.1 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos, catalase positivos e coagulase positivos. São considerados como os causadores mais frequentes da mastite bovina na maioria dos países (GILLESPIE *et al.*, 2009). Geralmente é um dos patógenos mais isolados no leite, com cerca de 3% das vacas leiteras em todo o mundo infectadas (SCHUKKEN *et al.*, 2009), apresentando nas vacas contaminadas a contagem de células somáticas muito altas (BLOWEY; EDMONDSON, 1995).

Em rebanhos com baixa CCS, a prevalência da infecção varia de 1-10%. Em rebanhos, com alta CCS, até 50% das vacas podem estar infectadas pelo *S. aureus*, com taxas de infecção dos quartos variando em 10-25%. A prevalência do *S. aureus* em novilhas no momento do parto pode variar em 5-15% (CONSTABLE *et al.*, 2017).

Ainda que os *S. aureus* possam sobreviver semanas no ambiente (QUINN *et al.*, 2005), acredita-se que a maioria das transmissões entre as vacas ocorra no momento da ordenha, através do contato das glândulas com as mãos do ordenhador e ordenhadeiras contaminadas (RADOSTITS *et al.*, 2014).

O microrganismo é capaz de colonizar a pele e o canal do teto, e isso provavelmente predispõe à infecção intramamária. Entretanto, a glândula mamária é o principal reservatório e fonte de infecção do microrganismo (QUINN *et al.*, 2005). Embora os *S. aureus* possam-se multiplicar na superfície da pele e, a partir desse local, funcionar como

fonte de infecção para o úbere, as lesões cutâneas do teto geralmente são infectadas a partir do úbere, e a pele do teto é uma das fontes menos comuns de infecção (RADOSTITS *et al.*, 2014). Dessa forma, grande parte das infecções é provavelmente endógena, isto é, provocada por uma cepa residente no interior do úbere (HIRSH; ZEE, 2003).

A infecção por *S. aureus* frequentemente resulta em doença crônica, subclínica, altamente contagiosa e difícil ou impossível de tratar, com taxas de cura inferiores a 25% (RAINARD, 2005), devido ao alto nível de resistência aos antimicrobianos (FREY *et al.*, 2013).

### **2.2.2 *Streptococcus agalactiae***

São cocos Gram-positivos, catalase negativo, coagulase negativo, considerado um importante patógeno contagioso nos casos da mastite bovina (BLOWEY; EDMONDSON, 1995). *S. agalactiae* é um microrganismo comumente encontrado como membro da microbiota anfibiótica da glândula mamária bovina. Esse agente é frequentemente encontrado no leite e na superfície do canal do teto, não invadindo o tecido (RIET-CORREA *et al.*, 2001).

O principal reservatório e fonte de infecção é o úbere (KEEFE, 1997), embora, quando a higiene é deficiente, a contaminação a partir do ambiente possa funcionar como fonte adicional (RADOSTITS *et al.*, 2014). Acredita-se que o *S. agalactiae* penetra no canal do teto mais comumente por meio das ordenhadeiras mecânicas, mãos do ordenhador e toalhas para secar o úbere (CONSTABLE *et al.*, 2017).

*S. agalactiae* é capaz de causar mastite clínica e subclínica com alta CCS, o que pode ter um impacto financeiro substancial sobre os produtores de leite, devido a seus efeitos na qualidade e quantidade do leite (KEEFE, 2012).

As maiorias dos antibióticos são eficazes contra *S. agalactiae*, o que facilita o tratamento das infecções (BLOWEY; EDMONDSON, 1995). Assim, a prevalência de mastite causada por *S. agalactiae* pode ser reduzida com sucesso com um programa de tratamento com agentes antimicrobianos e manejo adequado do rebanho para limitar a incidência de novas infecções (EDMONDSON, 2011).

A prevalência de rebanhos infectados com *S. agalactiae* varia em todo o mundo. Embora alguns países aparentemente tenham conseguido quase erradicar o patógeno (BRADLEY *et al.*, 2007; PIEPERS *et al.*, 2007), outros, como Egito, Brasil e Noruega ainda relatam prevalências de rebanho de 20, 7 e 6,4% respectivamente (OLIVEIRA *et al.*, 2015; ELHAIG; SELIM, 2015; HOLMOY *et al.*, 2018). No sudeste da



Austrália, Penry *et al.* (2014) relatou que o *S. agalactiae* está presente em 1 a 6% dos rebanhos, sendo considerado um importante patógeno.

### 2.2.3 *Mycoplasma bovis*

Embora várias espécies de *Mycoplasma* tenham sido isoladas a partir de surtos de mastite bovina, *Mycoplasma bovis* é a espécie mais comumente encontrada em grandes rebanhos leiteiros (QUINN *et al.*, 2005), causando surtos de mastite em todo o mundo (FOX, 2012). As mastites causadas por esse agente são altamente contagiosas e podem ser clinicamente severas. Geralmente acometem mais de um quarto e a CCS é muito alta, podendo atingir mais de 20 milhões de células por mL de leite (RIET-CORREA *et al.*, 2001; NICHOLAS; FOX; LYSNYANSKY, 2016).

*Mycoplasma bovis* é geralmente classificado como um microrganismo contagioso da mastite (USDA; APHIS, 2008; ROYSTER; WAGNER, 2015), geralmente causa mastite clínica ou subclínica leve, que pode evoluir para mastite crônica, sendo que surtos clínicos graves também podem se desenvolver (POTHMANN *et al.*, 2015; RUEGG; ERSKINE, 2015).

A entrada da doença num rebanho geralmente ocorre em decorrência da compra e da introdução de animais sem a realização de quarentena (RADOSTITS *et al.*, 2014). A transmissão entre animais ocorre principalmente na época da ordenha (RUEGG, 2012) ou através de tratamentos em massa da mastite utilizando a mesma seringa ou cânula mamária para mais de um animal (CONSTABLE *et al.*, 2017). As superfícies mucosas dos olhos, cavidades nasais, orelhas e vagina dos animais são os locais de colonização de *Mycoplasma* em gado leiteiro (FOX; KIRK; BRITTEN, 2005) e pode estar associado à mastite (BIDDLE *et al.*, 2005).

A mastite por *Mycoplasma* é considerada intratável devido à ausência de antibióticos eficazes ou vacinas aprovadas para profilaxia da infecção mamária por *M. bovis* (NICHOLAS; AYLING, 2003). A estratégia de controle é evitar a entrada de vacas infectadas no rebanho ou abater as vacas infectadas. Porém, isso resulta em custos significativos de reposição de animais para o produtor (FOX; KIRK; BRITTEN, 2005; ROYSTER; WAGNER, 2015; NICHOLAS; FOX; LYSNYANSKY, 2016).

A doença é registrada em diversos países, em Israel, por exemplo, *M. bovis* é visto como um patógeno emergente. Lysnyansky *et al.* (2016) registrou infecções por *M. bovis* no período de 2004-2014, no ano de

2004-2007 as infecções foram relativamente baixas (0-0,68%), mas aumentaram para 3,77% em 2008 e variaram de 0,77 a 2,77% durante os anos de 2009 a 2014. A prevalência de mastite por *Mycoplasma* pode ser afetada também em países europeus, com base em amostragem do leite dos tanques de resfriamento, com relatos de 1,5% na Bélgica (PASSCHYN *et al.*, 2012).

### **2.2.4 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo, é um dos principais agentes da mastite bovina em todo o mundo, sendo um importante patógeno causador da mastite ambiental (BRADLEY; GREEN, 2000a; LONGO *et al.*, 2001; SHPIGEL *et al.*, 1998). Seu controle é mais difícil que o da mastite contagiosa, uma vez que depende de medidas estritas de higiene. *E. coli*, ao invadir a glândula mamária, pode se multiplicar muito rápido, levando a lise bacteriana e liberação de endotoxina, que é extremamente tóxico ao animal (RIET-CORREA *et al.*, 2001).

A fonte comum de *E. coli* são as fezes dos animais, que podem contaminar o períneo e o úbere de modo direto ou indireto através da cama, boxes de parição, solo, água, ordenhadeira mecânica, esponjas e toalhas do úbere e mãos dos ordenhadores (RADOSTITS *et al.*, 2014). Uma das causas mais frequentes da mastite bovina por este microrganismo está tipicamente associada à mastite aguda clínica. No entanto, os sintomas clínicos variam amplamente de leves a agudos (DOPFER *et al.*, 1999; BRADLEY, 2002), podendo também ocorrer infecções subclínicas e crônicas (BRADLEY; GREEN, 2000).

A mastite bovina causada por *E. coli* é frequentemente caracterizada por uma infecção rápida e é geralmente eliminada espontaneamente (BURVENICH *et al.*, 2003). No entanto, a infecção causada por *E. coli* pode ser grave, causando dano tecidual significativo à glândula mamária (WENZ *et al.*, 2001). Em alguns casos, ocorre a persistência do microrganismo na glândula, indicando que alguns isolados de *E. coli* adaptam-se ao hospedeiro (LEFÈVRE *et al.*, 2010). Em um estudo com 300 rebanhos holandeses, cerca de 5% de todos os episódios de mastite clínica de *E. coli* foram causados por infecções intramamárias persistentes (DOPFER *et al.*, 1999). Da mesma forma, um estudo realizado no Reino Unido demonstrou que 20,5% de todos os casos de mastite clínica associados à *E. coli* surgiram em quartos persistentemente infectados (BRADLEY; GREEN, 2001).

Devido à existência onipresente, fácil transmissão e características de resistência às drogas, infecções por *E. coli* são em

geral difíceis de serem tratadas (OLDE RIEKERINK *et al.*, 2010; STEENEVELD *et al.*, 2011; SAINI *et al.*, 2012; DAHMEN *et al.*, 2013).

Para uma implementação bem-sucedida de um programa clínico de controle da mastite por *E. coli*, é importante identificar o patógeno e fazer os testes de sensibilidade aos antimicrobianos, para a escolha de do melhor tratamento antimicrobiano em casos de infecção (LINDEMAN *et al.*, 2013).

### **2.2.5 *Streptococcus uberis***

*Streptococcus uberis* são cocos Gram-positivo que correspondem a um microrganismo ambiental associado à mastite (BLOWEY; EDMONDSON, 1995). Infecções intramamárias bovinas causadas por *S. uberis* podem progredir com sintomas clínicos ou subclínicos e, muitas vezes, a infecção aguda leva a infecções crônicas, que podem persistir na glândula mamária infectada por mais de uma lactação (OLIVER, 1998). A incidência é maior durante o primeiro mês de lactação ou no fim do período de secagem (RADOSTITS *et al.*, 2014).

Em muitas partes do mundo, sua incidência aumentou durante as últimas décadas, conforme revisado por Ruegg (2012). Um estudo envolvendo microrganismos causadores de mastite na indústria de lácteos do sudeste da Austrália reportou que 33% das amostras clínicas de mastite submetidas à cultura foram positivas para *S. uberis* (CHARMAN *et al.*, 2012).

Este microrganismo é onipresente no ambiente da vaca, e, conseqüentemente, a glândula mamária permanece continuamente exposta à bactéria, sendo a principal fonte de contaminação as camas de palha, onde ocorre a transmissão a partir dos tetos de um animal ao outro. Porém, a contaminação pode ocorrer também durante o processo de ordenha (RADOSTITS *et al.*, 2014).

Atualmente, os antibióticos intramamários são amplamente utilizados para controlar a mastite associada ao *S. uberis*. No entanto, o tratamento não é sempre bem-sucedido, sendo necessário abater os animais cronicamente infectados (McDOUGALL *et al.*, 2004; COFFEY *et al.*, 2006).

Apesar do grave impacto econômico causado pela mastite por *S. uberis*, os fatores críticos de virulência responsáveis pela colonização bacteriana das glândulas mamárias e subsequente patogênese da mastite não são bem compreendidos, mostrando um grande obstáculo para o

desenvolvimento de medidas efetivas de controle e prevenção (DEGO *et al.*, 2018).

### **2.2.6 *Candida albicans***

Entre as diversas espécies do gênero *Candida*, a *Candida albicans* é a espécie mais frequente em doença animal (QUINN *et al.*, 2005). É citada como a levedura prevalente nos casos de mastite micótica (RIET-CORREA *et al.*, 2001). A maior parte das doenças provocadas por *Candida* surge de uma fonte endógena, isto é, são causadas por uma cepa comensal. O úbere bovino torna-se infectado por meio do canal do teto quando se administra medicação, durante a ordenha, por disseminação de um animal para outro ou a partir do ambiente (HIRSH; ZEE, 2003).

A mastite micótica pode ser classificada como primária ou secundária. A primária ocorre sob a forma subclínica e de forma espontânea, geralmente identificada nas primeiras semanas de lactação. A secundária ocorre em estado clínico detectável, é a forma mais encontrada e se desenvolve após a administração de fármacos para o tratamento ou prevenção da mastite (SPANAMBERG *et al.*, 2009).

A incidência de mastite causada por *C. albicans* geralmente é baixa, mas tem sido relatado um aumento nos últimos anos em alguns países. Em um estudo realizado no Brasil por Sartori *et al.* (2014) foram isolados 12,8% de *C. albicans* em 428 amostras de leite coletadas nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Já no México, nos estados de Querétaro, Hidalgo, Puebla e Cidade do México, Zaragoza *et al.* (2011) identificou 3,8% de *C. albicans* em 282 amostras de leite.

O tratamento com antibióticos é totalmente ineficaz, uma vez que as leveduras e fungos não respondem aos antibióticos (BLOWEY; EDMONDSON, 1995). Portanto a maneira mais eficiente são as boas práticas de higienização.

## **2.3 IMPACTO ECONÔMICO DA MASTITE BOVINA**

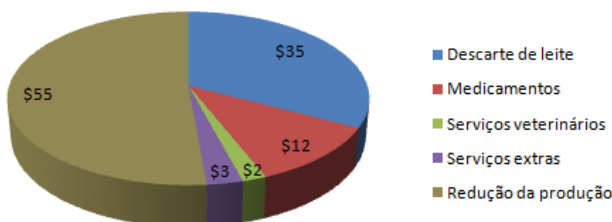
Embora as mastites ocorram esporadicamente em todas as espécies, elas assumem maior importância econômica no gado de leite, sendo considerada uma das doenças mais caras para as indústrias de laticínios (RADOSTITS *et al.*, 2014).

Os custos da mastite para a indústria de laticínios incluem os custos do tratamento (medicamentos e veterinário), o leite descartado de

vacas com mastite clínica ou tratadas, programa de controle, fatalidades, a diminuição da produção e qualidade do leite, aumento do abate, reposição das vacas, secagem prematura, aspectos de bem-estar animal e outros problemas de saúde associados (BLOWEY; EDMONDSON, 1995; HALASA *et al.*, 2007; WILSON *et al.*, 2004).

Os cálculos econômicos variam entre países e até mesmo entre regiões dentro de um país. Além disso, os resultados desses cálculos mudam com o tempo devido as mudanças na regulamentação da qualidade do leite e mudanças nas circunstâncias do mercado (ALLORE; ERB, 1998; OSTERÁS *et al.*, 2005). Fonseca e Santos (2007) afirmam que em casos de mastite clínica o custo situa-se entre US\$ 46 e 142, com média de US\$ 107 por caso (Figura 3).

Figura 3 - Custo médio de um caso de mastite clínica (US\$ 107).



Fonte: Fonseca; Santos (2007).

Nos Estados Unidos, por exemplo, a perda econômica da mastite é estimada em cerca de US\$ 185/vaca anualmente. Se assumirmos o mesmo preço do leite e esse valor for multiplicado pelo número total de vacas leiteiras (9,5 milhões de cabeças), o custo anual total da mastite é de cerca de US\$ 1,8 bilhão. Isto representa aproximadamente 10% do valor total das vendas de leite da fazenda, e cerca de dois terços dessa perda se deve à redução na produção de leite em vacas subclínicamente infectadas (CONSTABLE *et al.*, 2017; SCHROEDER, 2012).

Um estudo feito na Suécia avaliou a perda econômica associada à mastite clínica e subclínica. O custo anual de mastite, assumindo que a incidência inicial (32 e 33 casos de mastite clínica e subclínica por 100 bovinos, respectivamente) poderia ser reduzida em 50%, foi estimado em 8.095 €. Este valor correspondeu a 5% do custo retorno líquido para o rebanho, dada à incidência inicial de mastite. Expresso em média por vaca/ano, o custo evitável da mastite foi estimado em 54 € (NIELSEN, 2009). Já na França, um estudo envolvendo 197 rebanhos apresentou um custo médio de 78 € por vaca/ano (FOURICHON *et al.*, 2001).

Dessa forma compreendendo os impactos econômicos, especialmente os custos indiretos de longo prazo, ficará mais fácil a escolha em relação ao controle da mastite.

## 2.4 EFEITOS NA PRODUÇÃO DO LEITE, COMPOSIÇÃO E QUALIDADE

A mastite bovina reduz a capacidade de produção e qualidade do leite. Nos casos subclínicos a doença não apresenta sintomas, porém é observado alterações na composição do leite na qual afeta a qualidade do processamento de derivados (VIVAR-QUINTANA; DE LA MANO; REVILLA, 2006; SHARIF; MUHAMMAD, 2009), o grau dessas alterações depende do agente infeccioso, da gravidade e duração da infecção. Já do ponto de vista clínico as alterações do leite são mais evidente, apresetando sintomas como inchaço e vermelhidão, além disso, é observado presença de grumos, pus, sangue e alterações na composição do leite (RIET-CORREA *et al.*, 2001).

De forma geral, as mudanças na composição do leite envolvem um aumento dos componentes sanguíneos presentes no leite e uma diminuição dos constituintes normais do leite. Na Tabela 2 mostra o efeito da mastite subclínica (isto é, a alta contagem de células somáticas) em relação a vários nutrientes do leite.

Tabela 2 - Efeito da mastite bovina em relação aos componentes do leite.

Componentes	Efeito da mastite subclínica
Proteína total	Ligeiramente diminuída
Caseína	Diminui entre 6-18%
Lactose	Diminui entre 5-20%
Sólidos sem gordura	Diminui em média 8%
Gordura	Diminui entre 4-12%
Cálcio	Diminui
Fósforo	Diminui
Potássio	Diminui
Estabilidade e qualidade da conservação	Diminui
Sabor	Desagradável
Plasmina (degrada a caseína)	Aumenta
Lipase (degrada a gordura)	Aumenta
Imunoglobulinas	Aumenta
Sódio	Aumenta

Fonte: Blowey; Edmondson (1995).

A diminuição da caseína é de grande importância para os fabricantes de produtos derivados do leite, principalmente para os que fabricam queijo já que reduz o rendimento da produção. As mudanças no nível de gordura e da lactose são de grande importância econômica já que constitui a base do preço do leite. A mastite também produz níveis altos da enzima lipase e plasmina que degradam a gordura e caseína tendo um efeito na qualidade de conservação do leite (BLOWEY; EDMONDSON, 1995).

Há diversos estudos que demonstrando que essas alterações estão diretamente ligadas a um leite de qualidade. Sendo assim, estes elementos são de grande importância para os produtores manterem a qualidade (BANSAL *et al.*, 2005; BATAVANI; ASRI; NAEBZADEH, 2007; ALEMU *et al.*, 2013).

## 2.5 PREVENÇÃO, CONTROLE E TRATAMENTO

As principais medidas para prevenir e controlar a mastite inclui as boas práticas de higiene, controle dos equipamentos de ordenha, desinfecção do teto antes e após ordenha, vacinas, gerenciamento do rebanho e abate de animais cronicamente infectados (McDOUGALL *et al.*, 2009; DUFOUR *et al.*, 2012; DE VliegHER *et al.*, 2012).

O primeiro passo para a prevenção é reduzir a exposição do teto e seu orifício às bactérias patogênicas através da higiene (RIET-CORREA *et al.*, 2001). A limpeza do teto é muito importante no controle da mastite, os tetos devem ser limpos com água ou antissépticos, e secos antes da ordenha. As mãos do ordenhador também devem ser limpas para não ser um veículo de contágio para outras vacas (NMC, 2018). Do mesmo modo é preciso tomar cuidado com os equipamentos de ordenha, pois o deslizamento do equipamento, níveis incorretos de vácuo e a má higienização da ordenhadeira são fatores para a infecção ser transmitida (SWENSON; REECE, 1999).

A imersão dos tetos, “*teat dipping*”, após a ordenha é a medida mais empregada no controle da mastite contagiosa. Os *pós-dipping*, como são chamados os produtos, são uma solução antisséptica que elimina as bactérias resultantes no ato da ordenha e previne a contaminação por um período de tempo limitado entre as ordenhas (QUINN *et al.*, 2005; RADOSTITS *et al.*, 2014).

O aumento da resposta imunológica pela vacinação é uma proposta atraente, sendo que muitas pesquisas foram feitas com a esperança de formular uma vacina que tivesse a capacidade de reduzir a incidência de mastite (SANKAR, 2016).

Mas poucas vacinas demonstraram resultados satisfatórios, devido que uma única vacina não previne a mastite causada pela grande quantidade de patógenos e seus diferentes mecanismos de patogênese (SANKAR, 2016). Dessa forma é preciso mais pesquisas e avaliação antes que a vacina possa ser usada como uma ferramenta confiável contra a mastite.

Nos casos mais graves da mastite, quando a doença já esta num estado mais evoluído, o uso de antibióticos (como penicilinas naturais ou sintéticas) é a principal estratégia proposta como uma forma simples e eficaz para o tratamento (GOMES; HENRIQUEZ, 2016). Porém, constitui grande preocupação quanto há a presença de resíduos no leite de consumo, uma vez que representam risco para a saúde do consumidor e interferem na produção dos derivados, inviabilizando muitas vezes a produção destes e, conseqüentemente causando sérios prejuízos econômicos (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI; 2011).

Apesar da eficiência há os custos elevados de seu uso, como também o surgimento de resistência e a falta de resposta do gado aos antibióticos que se tornam uma questão crítica. O uso excessivo e indevido de antibióticos na mastite bovina pode representar um sério problema relacionado com o surgimento de cepas resistentes (WHITE; McDERMOTT, 2001).

Devido a esses inconvenientes, algumas alternativas vêm surgindo com objetivo de tratar a mastite sem uso de antióticos, como o uso de bacteriófagos (BASDEW; LAING, 2014), nanopartículas (DEHKORDI; HOSSEINPOUR; KAHRIZANGI, 2011), citocinas (SANKAR, 2016) e antimicrobianos derivados de plantas (ANANDA *et al.*, 2009) e animais (HAFEZ *et al.*, 2013).

Ainda quando há vacas em tratamento deve ser feito a administração correta dos rebanhos deixando as vacas infectadas em ultimo lugar para serem ordenhadas. Nos casos em que as técnicas de eliminação dos microrganismos falham é recomendado abater o animal para reduzir o foco de infecção (RIET-CORREA *et al.*, 2001).

A prevenção e o controle não são fáceis, mas são possíveis através de mudanças no manejo do rebanho. Em um programa de controle da mastite é importante conhecer o nível de infecção de um rebanho, seja por quarto infectado com mastite subclínica ou índice de mastite clínica, como também os agentes envolvidos nestas mastites para aperfeiçoar os atuais programas de prevenção.



## 2.6 PÓS-DIPPING

A aplicação do *pós-dipping* nos tetos da vaca após a ordenha é um meio eficaz e amplamente praticado para reduzir a incidência da mastite, sendo o método de prevenção preferido. Ao imergir o teto na solução é formada uma barreira protetora que veda o teto e reduz efetivamente a ocorrência de infecções até a próxima ordenha que pode ser causada por uma variedade de microrganismos como, por exemplo, o *S. aureus*, *S. agalactiae* e *Coryne bacterium bovis* (PANKEY *et al.*, 1984; NMC, 1996).

Um *pós-dipping* deve atender a diferentes requisitos para cumprir o seu propósito. Deve ter eficácia antimicrobiana comprovada, prevenir novas infecções intramamárias, manter em ótima condição a pele do teto, pois uma pele saudável é essencial para manter a defesa natural contra infecções, se os tetos estiverem secos e rachados podem abrigar microrganismos patogênicos causadores da mastite. Não deve ser tóxico e nem irritante a vaca ou ao usuário e não deve deixar resíduos no leite que possam afetar a saúde humana (HOGAN *et al.*, 1990; MEIN *et al.*, 2001; GODDEN *et al.*, 2016; BLOWEY; EDMONDSON, 2010).

Os *pós-dipping* são compostos de muitos ingredientes dependendo da formulação, mas três são os ingredientes principais do produto: uma substância ativa antimicrobiana, um emulsionante para regular a viscosidade e manter outros ingredientes presos à matriz e um emoliente, para hidratar o teto reduzindo a irritação (QUIRK, 2010). As principais substâncias ativas incorporadas nos produtos são iodo, gluconato de clorexidina, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, triclosan e ácido láctico, podendo ser combinados (FITZPATRICK; GARVEY; GLEESON, 2018).

Existem diferentes tipos de *pós-dipping* como os que formam uma barreira protetora, de filme, em pó ou líquidos e seu uso é bastante antigo, uma vez que existem diversas patentes e estudos (PUGLIESE, 1974; LOOSEMORE, 1995). Geralmente os mais utilizados são os formadores de filmes e suas primeiras versões do *pós-dipping* produziam apenas um filme do tipo látex que tinha que ser descascado ou lavado dos tetos antes da ordenha (ANDREWS, 1977).

Um dos problemas com esse revestimento foi a sua difícil remoção completa com água e sua baixa eficiência. Contudo novas formulações foram surgindo contendo ingredientes formadores de filme que permanecessem semiúmidos na superfície aplicada o que facilita a sua remoção.

Atualmente são vários os produtos comercialmente disponíveis, no qual podemos citar o Filmadine® e o TEC PRO®. O Filmadine é uma solução espessa à base de ácido láctico e o TEC PRO uma solução mais aquosa a base de triclorocarbanilida como composto ativo, em que ambos ao serem aplicados formam uma película sob a pele protegendo de microrganismos patogênicos. No entanto, existem alguns impactos negativos relacionados ao uso desses compostos sintéticos, como irritação e rascacamento dos tetos, aumentam a resistência dos microrganismos e podem deixar resíduos no leite.

## 2.7 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais são líquidos lipofílicos, extraídos de diversas plantas contendo diferentes componentes naturais biologicamente ativos, têm propriedades antimicrobianas e antioxidantes (AMATISTE, *et al.*, 2014; HAMEDÍ; RAZAVI-ROHANI; GANDOMI, 2014; YOUSEFI ASLI *et al.*, 2017).

Desde a idade média, os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados para aplicações bactericidas, viricidas, fungicidas, antiparasitárias, inseticidas, medicinais e cosméticas. Atualmente são utilizados especialmente nas indústrias farmacêutica, sanitária, cosmética, agrícola e alimentícia (BAKKALI *et al.*, 2008).

Podem ser extraídos de diferentes partes dos vegetais, como botões, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou casca. Tradicionalmente o óleo essencial é extraído por destilação a vapor, hidrodestilação, expressão ou por extração com etanol e dióxido de carbono em estado fluido supercrítico. Entre todos os métodos, o método de destilação a vapor tem sido amplamente utilizado, especialmente para a produção em escala comercial (CASSEL; VARGAS, 2006; DI LEO LIRA *et al.*, 2009; POURGHOLAMI *et al.*, 1999; GUAN *et al.*, 2007).

Dependendo do tipo e concentração, eles exibem efeitos citotóxicos nas células vivas, mas geralmente não são tóxicos (BAKKALI *et al.*, 2007). Sua composição varia dependendo do tipo de espécie da planta, origem geográfica da planta, condições climáticas, composição do solo, estágio do ciclo vegetativo e parte da planta que foi usada para a extração do óleo essencial (ANGIONI *et al.*, 2006; MASOTTI *et al.*, 2003).

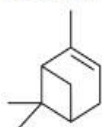
A Figura 4 mostra a estrutura química de algumas substâncias presentes em óleos essenciais. Os compostos antimicrobianos mais ativos presentes nos óleos essenciais podem ser divididos em quatro

grupos baseados na estrutura química: terpenos (ex. P-cimeno, limoneno), terpenóides (por exemplo, timol, carvacrol), fenilpropanos (por exemplo, eugenol, vanilina) e outros compostos tais como alicina ou isotiocianatos (HYLDGAARD *et al.*, 2012).

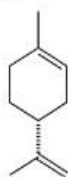
Figura 4 - Estrutura química de alguns constituintes de óleos essenciais.

### Terpenos

#### Monoterpenos



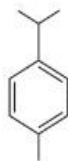
$\alpha$ -Pinoeno



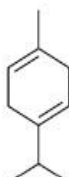
Limoneno



Sabineno

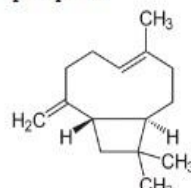


P-cimeno



$\gamma$ -Terpineno

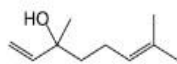
#### Sesquiterpenos



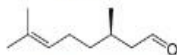
$\beta$ -Cariofileno

### Terpenóides

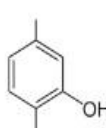
#### Monoterpenóides



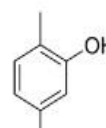
Linalol



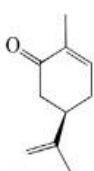
Citronelal



Timol



Carvacrol

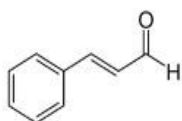


Carvona

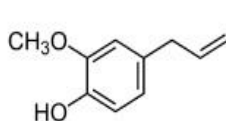


Borneol

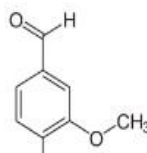
### Fenilpropanóides



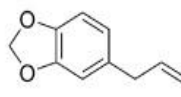
Cinamaldeído



Eugenol

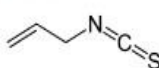


Vanilina

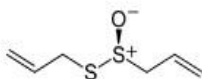


Safrol

### Outros



Isotiocianato de alila



Alicina

Fonte: Hyldgaard; Mygind; Meyer (2012).

Devido à hidrofobicidade dos componentes dos óleos essenciais, eles passam facilmente através da membrana celular bacteriana, interferindo nos mecanismos de transporte molecular que levam à inativação celular (BURT, 2004; GOÑI *et al.*, 2009).

Os mecanismos possíveis para os óleos essenciais e os seus componentes contra células bacterianas relatados na literatura são: (1) a degradação da parede celular, (2) danos à membrana citoplasmática, (3) os danos para proteínas de membrana, (4) o vazamento do conteúdo das células, e (5) coagulação do citoplasma e depleção da força motriz do próton (BURT, 2004). No entanto, a hidrofobicidade dos óleos essenciais pode reduzir a interação com as bactérias em um ambiente aquoso, que retarda sua ação bactericida e reduz sua toxicidade para as bactérias (BURT; REINDERS, 2003; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002).

### 2.7.1 Óleo de cravo

O cravo (*Syzygium aromaticum*) é uma especiaria obtida do botão da flor seca da árvore de cravo-da-índia (ZHENG; KENNEY; LAM, 1992). Possui aroma forte e agradável, e um sabor ardente, muitas vezes causando dormência nos lábios (NOWAK *et al.*, 2012).

O cravo é rico em óleo essencial composto de várias classes e grupos de compostos químicos, como monoterpenos, sesquiterpenos e compostos de hidrocarbonetos fenólicos (HOSSAIN *et al.*, 2012). Aproximadamente, 89% do óleo essencial de cravo é eugenol, principal composto bioativo, e 5% a 15% é acetato de eugenila e  $\beta$ -cariofileno. Outro composto importante encontrado no óleo essencial de cravo em concentrações até 2,1% é  $\alpha$ -humuleno. Outros compostos voláteis presentes em menores concentrações no óleo essencial de cravo-da-índia são  $\beta$ -pineno, limoneno, farnesol, benzaldeído, 2-heptanona e hexanoato de etilo (JIROVETZ *et al.*, 2006). Porém, a composição do óleo de cravo, juntamente com suas propriedades, depende da origem da planta, sua estação de crescimento, o clima, a hora do dia e a umidade do ar. Outro fator essencial é o tempo que passa entre o momento de colher a matéria-prima e a produção de óleo (NOWAK *et al.*, 2012).

O óleo essencial de cravo é conhecido por ter atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, dentre outras. Atualmente, o óleo de cravo é um importante medicamento natural usado em muitas áreas, incluindo odontologia, produtos farmacêuticos e aromaterapia. É usado como analgésico, antisséptico, desinfetante e antibacteriano porque inibe o crescimento ou mata a maioria dos

patógenos, tais como: *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*. O óleo é recomendado para a inalação no tratamento da dor de garganta, resfriados, catarro e inflamação das membranas mucosas da boca. Também ajuda a lidar com problemas respiratórios, fraqueza geral e neuralgia (PODLEWSKI; CHALIBOGOWSKA-PODLEWSKA, 2010; CIMANGA *et al.*, 2002).

Joseph e Sujatha (2011) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo de cravo contra *Staphylococcus spp.* obtendo o valor de concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de 2,5% v/v. Da mesma forma, Baby *et al.* (2011) compararam a eficácia antimicrobiana do óleo de cravo contra *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, apresentando bons resultados. Mytle *et al.* (2006) estudaram a atividade antilisterial do óleo de cravo (1% e 2% v / v) em salsichas de frango durante o armazenamento refrigerado e observaram uma diminuição na contaminação por *L. monocytogenes* quando armazenadas a 5 e 15 ° C. Além disso, o óleo de cravo teve um excelente efeito inibitório sobre a *Listeria monocytogenes* em carne e queijo (MENON; GARG, 2001), como também foi utilizado para melhorar a imunidade contra *Streptococcus agalactiae* na criação de tilápias (BRUM *et al.*, 2017). O efeito do óleo de cravo também foi analisado contra cepas de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite. Os resultados mostraram uma inibição de 69,4% (BUDRI *et al.*, 2015).

Ainda alguns estudos relatam atividades antifúngica (CHAMI *et al.*, 2005), antialérgica, anticarcinogênica e antimutagênica (MIYAZAWA; HISAMA, 2001) do óleo essencial de cravo-da-índia. Além de tudo, o óleo possui um enorme potencial comercial e pode ser usado como conservante, corante ou condimento em produtos alimentícios (AGUILAR-GONZÁLEZ; PALOU; LÓPEZ-MALO, 2015).

### 2.7.2 Óleo de orégano

O orégano (*Origanum vulgare*) é uma planta aromática difundida nos países do mediterrâneo, no qual suas folhas são utilizadas frescas ou secas como ingrediente alimentar devido ao seu sabor e aroma agradável (KINTZIOS, 2004).

Dados atuais mostram que os óleos essenciais de espécies de orégano são fontes ricas de compostos ativos com importância biológica particular, conhecidos por suas atividades antibacterianas, antifúngicas,

antioxidantes, anticancerígenas e anti-inflamatórias (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015; BAÂTOUR *et al.*, 2012).

Muitos estudos confirmaram os reais benefícios para a saúde e seu uso para o tratamento de uma vasta lista de doenças, incluindo distúrbios do trato respiratório, como tosse ou catarro brônquico (como agente expectorante e espasmolítico), em distúrbios gastrointestinais (como colerético, digestivo, eupéptico e espasmolítico), como antisséptico oral, em desordens do trato urinário (como diurético e antisséptico) e em afecções dermatológicas (alívio do prurido, crostas cicatrizadas e picadas de insetos), infecções virais e até câncer (BARICEVIC; BARTOL, 2002).

O óleo essencial é composto principalmente de terpenóides, sendo o carvacrol e o timol os dois principais monoterpênóides fenólicos. Essas substâncias constituem cerca de 78-85% do óleo essencial e são os principais compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana do óleo (KOKKINI *et al.*, 1997). Além disso, outros constituintes menores, como os hidrocarbonetos monoterpênicos  $\gamma$ -terpineno e o p-cimeno, também contribuem para a atividade antibacteriana do óleo (BURT, 2004).

O timol tem uma atividade inibitória contra uma ampla gama de bactérias, incluindo *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*, enquanto o carvacrol é eficaz contra bactérias patogênicas como *S. typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Bacillus cereus*. (GAYSINSKY *et al.*, 2007).

Boskovic *et al.* (2015) estudaram os efeitos antibactericidas do óleo de orégano em *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* e foi observado que o óleo exibiu atividade bactericida contra todos os microrganismos testados obtendo o valor da concentração inibitória mínima (CIM) de 160-640  $\mu\text{g/mL}$  e a concentração bactericida mínima (CBM) de 320-2560  $\mu\text{g/mL}$ . Aguirre, Borneo e León (2013) investigaram a atividade antimicrobiana de filmes de proteínas com óleo de orégano contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* avaliando o halo de inibição observando as zonas maiores para o *S. aureus*, enquanto menores para *E. coli* e *P. aeruginosa*. Ainda tem sido relatada a eficiência do óleo de orégano em sistemas alimentares como a carne bovina, a adição de 0,8% do óleo essencial resultou na redução da maioria da população bacteriana, com bactérias de ácido láctico e *Listeria monocytogenes* (TSIGARIDA; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000).

Fratini *et al.* (2014) avaliou a atividade antibactericida de dez óleos essenciais comerciais mais conhecidos e utilizados contra seis bactérias, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosum* e *Escherichia coli*, responsáveis pela mastite em animais. Entre todos os óleos, o óleo de orégano foi um dos que apresentou melhor resultado mostrando ótima atividade inibitória. O óleo de orégano também foi estudado em cepas isoladas da *C. albicans* de mastite clínica bovina, no qual o óleo revelou atividade anticandida valores da concentração inibitória mínima de 80% (KSOURI *et al.*, 2017).

### 2.7.3 Óleo de canela

A canela (*Cinnamomum verum*) é uma planta nativa da Ásia obtida da casca interna das árvores pertencentes ao gênero *Cinnamomum* (JAYAPRAKASHA; RAO, 2011). Por milhares de anos tem sido uma especiaria usada como um tempero popular e medicamento natural por diferentes culturas ao redor do mundo (LU *et al.*, 2011; HAJIMONFAREDNEJAD *et al.*, 2018).

Estudos científicos revelaram que a canela possui muitos efeitos medicinais, incluindo efeitos antimicrobianos, antidiabéticos, antilipêmicos, antifúngicos, antioxidantes, imunomoduladores, antitumorais, anti-hipertensivos e antivirais (SHEN *et al.*, 2012; HAJIMONFAREDNEJAD *et al.*, 2017; FISCHER *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2015).

Esta erva tem sido usada medicinalmente há anos para combater a dor de dente, limpar as infecções do trato urinário e aliviar a irritação do estômago. Tem uma ampla gama de usos históricos, incluindo o tratamento da diarreia, artrite, bronquite, resfriados, gripes, náuseas, edema e vários distúrbios menstruais (THOMAS; DUETHI, 2004; WHO, 1999)

A casca da canela e as folhas são as principais fontes do óleo essencial de canela (WANG; ZHANG; SHI, 2018). A maioria dos compostos químicos do óleo essencial de canela são monoterpenos e sesquiterpenos (MIYAZAWA *et al.*, 2001). Esses compostos incluem o cinamaldeído, ácido cinâmico, derivados de cinamato (VANGALAPATI *et al.*, 2012; SENANAYAKE; LEE; WILLS, 1978), limoneno,  $\beta$ -pineno, canfeno (SIMIC *et al.*, 2004), trans-cinamaldeído, acetato de cinamila, eugenol, L-borneol, cânfora, óxido de cariofileno, b-cariofileno, acetato de L-borneol, E-nerolidol,  $\alpha$ -cubebina,  $\alpha$ -terpineol, terpinolene e  $\alpha$ -thujene (TUNG *et al.*, 2008; TUNG *et al.*, 2010). A

quantidade e a presença de cada composto variam dependendo da parte da planta (RAO; GAN, 2014).

O principal composto aromático extraído da casca da canela é o cinamaldeído (50%-90%), substância que fornece o odor e sabor característico da canela (ZHANG *et al.*, 2016; JU *et al.*, 2018; WANG; ZHANG; SHI, 2018). Além disso, é a substância responsável por apresentar atividade antibacteriana contra diversos microrganismos, como *Pseudomonas*, *Aspergillus parasiticus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, *Serratia*, *Bronchothrix*, *Carnobacterium* e *Lactobacillus* (THOMAS; DUETHI, 2004).

As propriedades do óleo essencial de canela chamaram muito a atenção dos pesquisadores e diversos estudos foram realizados. Khaleque *et al.* (2016) relataram que altas concentrações de óleos essenciais de canela poderiam inibir a *L. monocytogenes* na carne bovina moída e melhorar a segurança dos produtos de carne moída. Zhang *et al.* (2017) descobriram que o óleo essencial de canela pode inibir o crescimento de *Aeromonas spp.* e *Lactococcus spp.*, e com base na análise sensorial, revelou que o óleo essencial de canela pode prolongar a vida útil dos filés de carpa comum embalados a vácuo em cerca de 2 dias.

O óleo de canela também foi testado quanto à atividade antifúngica contra *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger in vitro*. O enriquecimento de óleo resultou em redução significativa no desenvolvimento de colônias subsequentes para os patógenos examinados. A produção de esporos de fungos inibiu até 63% a 25 ppm de concentração de óleo de canela (TZORTZAKIS, 2009). Ainda, a atividade antifúngica do óleo essencial de canela foi avaliada em  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas por macrodiluição em contato direto com o molde. Uma forte atividade foi obtida, com uma CIM de 0,05 e 0,1 mg/mL, e uma CFM de 0,05 e 0,2 mg/mL, ambas as faixas dependendo das suspensões fúngicas iniciais (MANSO *et al.*, 2013).

Um estudo ainda verificou a atividade antimicrobiana do óleo contra os principais patógenos causadores da mastite bovina tanto no meio de cultura pura quanto no leite. Ensaio de difusão em disco foram realizados e observou-se que discos contendo 20 µL de solução de óleo de canela a 2% resultaram em zonas de inibição de 29,6, 19,1, 27,0, 33,3 e 30,7 mm para as culturas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus xylosus* e



*Escherichia coli*, respectivamente, na qual foram ajustadas para  $1 \times 10^5$  UFC/mL. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do óleo de canela foi de 0,00625% e 0,025% (v/v) para *S. hyicus*, 0,025% e 0,10% (v/v) para *E. coli* e 0,0125% e 0,05% para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. xyloso*, respectivamente, para as culturas inoculadas com  $1 \times 10^5$  UFC/mL (ZHU *et al.*, 2016).

## 2.8 GOMA XANTANA

A goma xantana é um polissacarídeo natural produzido industrialmente através da fermentação aeróbia de açúcares pelo microrganismo *Xanthomonas Campestris* (BECKER *et al.*, 1998).

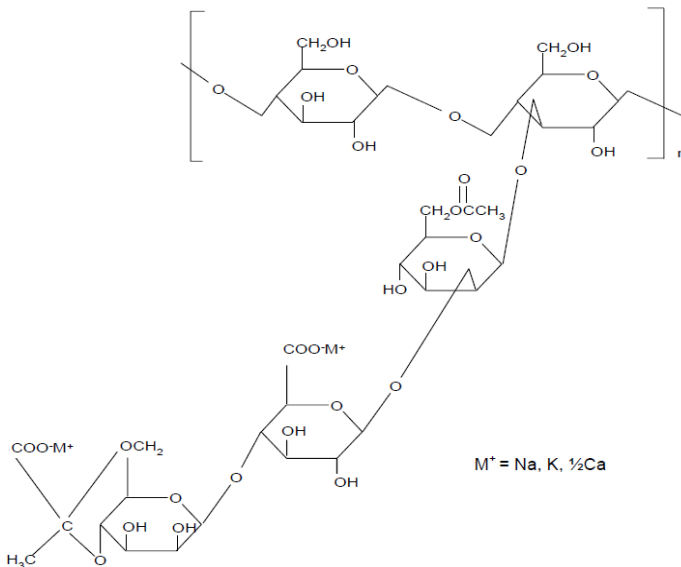
Também definida como hidrocolóide, a goma xantana é completamente solúvel em água quente ou fria, hidrata-se rapidamente uma vez dispersa em água resultando em soluções de alta viscosidade a baixa concentração em comparação com outras soluções de polissacarídeos (SHARMA; NARESH; DHULDHOYA, 2006). Soluções de xantana são altamente pseudoplásticas, ou seja, a viscosidade aparente diminui com o aumento da tensão de cisalhamento (ROCKS, 1971).

A goma xantana foi aprovada pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos (FDA) em 1969 como uma substância segura e não tóxica, desta forma aplicada em muitas pesquisas alimentícias e farmacêuticas (KENNEDY; BRADSHAW, 1984).

A distribuição do peso molecular varia de  $2 \times 10^6$  a  $20 \times 10^6$  g/mol, essa distribuição do peso molecular depende da associação entre cadeias, formando agregados de várias cadeias individuais. As variações das condições de fermentação utilizadas na produção são fatores que podem influenciar o peso molecular da goma xantana (PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011).

A goma xantana possui uma estrutura primária consistindo de unidades pentassacarídicas repetidas formadas por duas unidades de glicose, duas de manose e uma unidade de ácido glucurônico (Fig. 5).

Figura 5 - Estrutura química da goma xantana.



Fonte: Sharma; Naresh; Dhuldhoya (2006).

As soluções de goma de xantana são muito resistentes às variações de pH, isto é, são estáveis em condições alcalinas e ácidas. Entre pH 1 a 13, a viscosidade da solução da goma xantana é praticamente constante (SHARMA; NARESH; DHULDHOYA, 2006), porém, dependendo da concentração da goma xantana em determinadas faixas de pH podem haver mudanças na viscosidade. Por exemplo, não há mudança na viscosidade na faixa de pH 1,5 a 11 numa solução de goma xantana a 1%, entretanto à 0,25% de goma a estabilidade é menor e a viscosidade máxima é alcançada entre pH 6 e 8 (NISHINARI; DOI, 1993), ou seja, quanto maior a concentração, maior a estabilidade da solução (GLICKSMAN, 1982).

A presença de sais sobre as soluções de goma xantana pode causar alterações no comportamento reológico. A adição de um sal em uma solução de goma a baixas concentrações pode reduzir ligeiramente a viscosidade, enquanto a concentrações mais altas de goma ocorre o efeito contrário (SWORN, 2009). Porém, de acordo com BeMiller e Whistler (2012), a viscosidade vai depender somente da concentração da goma xantana quando o conteúdo do sal for maior que 0,1% (m/v).

A viscosidade das soluções de goma xantana é quase independente da temperatura, sua viscosidade é praticamente inalterada nas temperaturas entre 0 a 100°C, são resistentes ao calor e se mantém estável por longos períodos de tempo, sem nenhuma alteração significativa na viscosidade (SHARMA; NARESH; DHULDHOYA, 2006). A estabilidade térmica da goma xantana contra a hidrólise é muito melhor do que muitos outros polissacarídeos ou polímeros solúveis em água, possivelmente devido à estrutura helicoidal ordenada da goma xantana que protege as moléculas da despolimerização (STOKKE; CHRISTENSEN, 1996). No entanto, Rocks (1971) afirma que uma pequena mudança é observada somente quando solução de goma xantana são autoclavadas a 121°C por 15 a 30 minutos. Assim, as propriedades reológicas dos produtos finais permanecem estáveis independentemente de ser mantida no refrigerador ou armazenada a temperatura ambiente.

A goma xantana é resistente à degradação enzimática por diferentes enzimas tais como protease, celulose, hemicelulase, pectinase e amilase. No entanto, a xantana é completamente biodegradável, isto é, está sujeito a despolimerização por enzimas formadas por certos microrganismos sob certas condições ambientais, e, além disso, pode ser degradada por agentes oxidantes fortes como peróxidos e persulfatos (SHARMA; NARESH; DHULDHOYA, 2006).

A funcionalidade da goma xantana depende da preparação correta da solução, pois a má preparação da solução pode levar a uma má funcionalidade na aplicação final. Deve-se hidratar corretamente a goma xantana para obter a melhor funcionalidade, sendo que a hidratação depende de quatro fatores: dispersão, taxa de agitação do solvente, composição do solvente e tamanho de partícula. Para hidratar adequadamente, as partículas de goma devem estar bem dispersas, a má dispersão leva a aglomeração de partículas durante a mistura, o que resulta na formação de grumos parcialmente inchados. Idealmente, a goma xantana deve ser dispersa e hidratada sob condições de mistura de alto cisalhamento. Equipamentos como um moinho coloidal, um funil de dispersão ou misturadores de pá de alta velocidade são todos adequados para a preparação de soluções de goma xantana. Ingredientes secos como açúcar, amido ou sal, podem ser utilizados como dispersantes para auxiliar na hidratação, também podendo ser utilizado não solvente como álcool, glicerol ou óleos separando fisicamente as partículas de goma xantana (SWORN, 2009).

## 2.9 NANOEMULSÃO

As nanoemulsões consistem em uma dispersão de pequenas gotas de um líquido imiscível em outro líquido imiscível (geralmente água em óleo A/O), sendo os três principais componentes o óleo, surfactante/co-surfactante e água. O tamanho das gotas na nanoemulsão está na faixa de 10-200 nm e mostram estreita distribuição de tamanho (BHATT; MADHAV, 2011; McCLEMENTS, 2011).

As nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, sendo apenas cineticamente estáveis. Sua estabilidade física a longo prazo é uma consequência direta do tamanho das pequenas gotas, o que impossibilita os fenômenos de desestabilização convencionais. O tamanho de gota muito pequeno causa uma grande redução na força de gravidade e o movimento browniano pode ser suficiente para superar a gravidade. Isso significa que não há formação de creme ou sedimentação no armazenamento. O pequeno tamanho das gotículas também impede qualquer floculação das gotículas. A floculação fraca é evitada e isso permite que o sistema permaneça disperso sem separação. As pequenas gotículas também impedem a sua coalescência, uma vez que estas gotículas não são deformáveis e, conseqüentemente, as flutuações da superfície são evitadas (TADROS *et al.*, 2004; SINGH *et al.*, 2017; LIEBERMAN; RIEGER; BANKER, 1998). Em muitas aplicações comerciais, é importante que um produto à base de nanoemulsão permaneça tanto física e quimicamente estável quando exposto a condições ambientais específicas durante a sua fabricação, armazenamento, transporte, e manipulação (tais como o pH, força iônica, temperatura, e as forças mecânicas) (ZHANG; McCLEMENTS, 2018).

O termo "estabilidade" pode significar a capacidade de uma nanoemulsão resistir mudanças em suas propriedades físico-químicas ao longo do tempo (McCLEMENTS, 2015), porém as nanoemulsões estão sujeitas a instabilidade devido ao fenômeno conhecido como Degradação de Ostwald. Este fenômeno é o processo pelo qual gotículas maiores crescem em detrimento das menores devido a diferenças em seu potencial químico. Na degradação de Ostwald, o crescimento ocorre pela difusão da fase dispersa através da fase contínua, onde as pequenas gotas de emulsão têm maior solubilidade local do óleo do que as maiores, devido à diferença nas pressões de Laplace (WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008; SAKAI *et al.*, 2002).

O surfactante tem um papel fundamental no que diz respeito à estabilidade da nanoemulsão. A sua adição é muito importante para a

formação das pequenas gotas já que diminui a tensão superficial, ou seja, diminui a energia de superfície por unidade de área entre as fases óleo e água da emulsão. Além disso, o surfactante funciona como estabilizante devido às interações eletrostáticas repulsivas e o impedimento estérico (MASON *et al.*, 2006; DELMAS *et al.*, 2011; TADROS *et al.*, 2004). Os surfactantes promovem a estabilidade de diferentes maneiras, como os surfactantes iônicos que fornecem carga elétrica, enquanto os surfactantes não-iônicos criam uma barreira estérica nos grupos moleculares volumosos (SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2012).

Existem basicamente duas grandes categorias de técnicas para a preparação de nanoemulsões: métodos de alta energia e métodos de baixa energia. Nos métodos de alta energia, os dispositivos mecânicos fornecem grandes forças disruptivas, sendo os métodos mais comuns realizados através de ultrassom, microfluidização e homogeneização a alta pressão.

Os métodos de ultrassom utilizam ondas sonoras de alta frequência entre 20 e 100 kHz para produzir as nanoemulsões. Existem dois mecanismos que participam na emulsificação ultra-sônica. Em primeiro lugar, o campo acústico cria ondas interfaciais que fazem com que a fase oleosa se disperse na fase contínua como gotículas. Em segundo lugar, o ultrassom provoca cavitação acústica que fornece formação e colapso de microbolhas, respectivamente, devido a flutuações de pressão de uma única onda sonora. Desta forma, enormes níveis de turbulência altamente localizada são gerados e isso causa micro-implosões que induzem condições de alto cisalhamento, e as gotículas de emulsão se transformam em gotículas menores. (ABBAS *et al.*, 2013; SHAMSARA *et al.*, 2015). A determinação dos parâmetros operacionais é muito importante, pois o tamanho das gotículas diminui com o aumento do tempo de sonicação e da potência de entrada (LEONG *et al.*, 2009). Mas os parâmetros mais críticos que afetam a eficiência da homogeneização são o tipo de emulsificante, a quantidade e a viscosidade das fases (MAA; TSU, 1999; LEONG *et al.*, 2009). Assim, a otimização desses parâmetros é essencial no preparo de nanoemulsões.

Na microfluidização é utilizado um dispositivo chamado microfluidificador que fornece altas pressões. Durante o processo, a alta pressão força a macroemulsão a passar para a câmara de interação criando um tremendo cisalhamento e, assim, podem ser produzidas nanoemulsões com partículas pequenas. Normalmente, a emulsão grosseira é passada repetidamente (por vezes até 100 ciclos) até obter o

tamanho da gota desejada (SINGH *et al.*, 2017; CHIME; KENECHUKWU; ATTAMA, 2014; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015).

A homogeneização a alta pressão é feita utilizando várias forças, tais como cisalhamento hidráulico, intensa turbulência e cavitação. Neste método o homogeneizador faz dispersar dois líquidos por um pequeno orifício a alta pressão para produzir a nanoemulsão. A homogeneização a alta pressão é um método altamente eficiente, disponível tanto em laboratório como em grande escala, mas consome uma grande quantidade de energia e a temperatura geralmente aumenta durante o processamento, o que pode deteriorar os componentes (QADIR; FAIYAZUDDIN; HUSSAIN, 2016; SETYA; TALEGAONKAR; RAZDAN, 2014).

Os métodos de baixa energia, no entanto, não há necessidade de uma força externa, sendo os mais frequentes a emulsificação espontânea e a inversão de fases. A emulsificação espontânea é produzida a temperatura ambiente, adicionando água a uma solução de óleo e surfactante agitando suavemente. Quando se mistura forma gotículas de óleo espontaneamente no qual o mecanismo vai depender do movimento da substância dispersível em água que vai transitar da fase oleosa para a fase aquosa. Isso leva à turbulência interfacial e, portanto, à formação das gotas (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; McCLEMENTS; RAO, 2011). Já a inversão de fases utiliza a energia química que é liberada por causa das transições de fase durante o processo de emulsificação. A quantidade necessária de transições de fase é obtida alterando a composição à temperatura constante ou alterando a temperatura à composição constante (SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; THAKUR *et al.*, 2012).

Um aspecto importante da preparação da nanoemulsão através das técnicas acima mencionadas é o controle do tamanho final da gota, que pode ser influenciado pelo tempo de residência, viscosidade relativa, concentração do surfactante e comprimento do surfactante. Além disso, a escolha do método vai depender do tipo de aplicação (GUPTA *et al.*, 2016).

Dessa forma, as nanoemulsões se tornam importantes para diversas aplicações como fármacos, alimentos, cosméticos entre outros (SARKER, 2005; SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2012; SONNEVILLE-AUBRUN; SIMONNET; L'ALLORET, 2004).

Moraes-Lovison *et al.* (2017) estudaram a produção de nanoemulsões encapsulando óleo de orégano em diferentes concentrações com o objetivo de avaliar a sua estabilidade físico-

química e atividade antibacteriana sendo incorporado em patê de frango. Os diâmetros médios das gotas das nanoemulsões estavam na faixa de 35 a 55 nm, e as nanoemulsões contendo 5% de óleo foram as mais estáveis durante o período de armazenamento de 45 dias. As nanoemulsões apresentaram boa ação antibacteriana demonstrada pelos baixos valores nos testes *in vitro* para concentração inibitória mínima (0,56 e 0,60 mg/mL para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente, e para concentração bactericida mínima, 0,90 e 3,32 mg/mL para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente. Além disso, a aplicação da nanoemulsão do óleo de orégano não alterou as características físico-químicas do produto.

Yildirim, Oztop e Soyer (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana de nanoemulsões do óleo de canela. Os testes foram feitos na *E. coli* através do método de difusão em ágar sendo a colônia inoculada com o padrão 0,5 McFarland. A partir dos resultados foi observado zonas média de inibição entre 6,3-6,3; 7,2-7,7; 8,3-8,6 e 8,7-9,3 mm para concentrações de 4%, 6%, 8% e 10% respectivamente.

Da mesma forma Zhang *et al.* (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana de nanoemulsões preparadas com óleo de canela, cravo e a mistura de óleo e cravo. Foi observado atividade antimicrobiana contra quatro microorganismos, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonellatyphimurium* e *Staphylococcus aureus*. Todas as amostras de óleo essencial de cravo, canela e a mistura de cravo e canela apresentaram boa atividade antibacteriana para as quatro cepas testadas. No entanto, a nanoemulsão com a mistura de cravo e canela exibiu a mais alta atividade antibacteriana.

## 2.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS REFERENTES AO ESTADO DA ARTE

Baseado no referencial teórico apresentado é possível visualizar a necessidade da produção e desenvolvimento de produtos à base de substâncias naturais com propriedades antimicrobiana contra os microrganismos causadores da mastite, capazes de substituir os produtos *pós-dipping* convencionais e sintéticos. Almejando uma redução nos impactos ambientais (produto ecologicamente correto) e também na qualidade do leite sem causar danos aos animais. Além disso, não há registro na literatura de produção de formulações formadoras de filme à base de goma xantana contendo óleos essenciais como princípio ativo, motivando o desenvolvimento do presente trabalho.

O que se encontra disponível na literatura são patentes de produtos semelhantes, com a finalidade de prevenção da mastite bovina. Loosemore (1995), por exemplo, descreve soluções aquosas formadora de filme a base de PVA (álcool polivinílico) incorporando clorohexidina como agente antimicrobiano. Pallos *et al.* (1996) apresentaram soluções incluindo agentes formadores de filme como hidroxietilcelulose, metil-hidroxipropilcelulose e etil-hidroxietilcelulose e iodo complexado como composto ativo. Já Hemling *et al.* (1998) apresentou soluções formadora de filme a base de poliéter poliuretano e goma benzoín incorporando diacetato de clorexidina como substância ativa.

Com isso, nas páginas seguintes estão abordados os materiais e métodos que foram utilizados para produção e avaliação antimicrobiana das soluções formadoras de filme à base de goma xantana contendo óleos essenciais como princípio ativo, seguido dos resultados e discussões pertinentes sobre o trabalho e a conclusão final.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

A goma xantana, o corante vermelho e o TEC PRÓ *pós-dipping* foram fornecidos pela Nutrivital Ltda./Brasil. Os óleos de cravo (OECR), orégano (OEOR) e canela (OECA) foram adquiridos da empresa FERQUIMA Ind. E Com. Ltda./Brasil. O Crodamol™ (ácido esteárico) foi obtido da Alpha Química/Brasil. O surfactante lauril sulfato de sódio (SLS) foi adquirido da Sigma Aldrich/Brasil e a glicerina da Embacaps/Brasil. O meio de cultura Mueller Hinton ágar (MHA) foi obtido da Kasvi®/Brasil.

#### 3.2 INVESTIGAÇÃO E ELABORAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE

A formulação base foi preparada por meio da investigação da viscosidade. Sua composição foi determinada utilizando como referência a viscosidade de um produto comercial (TEC PRÓ *pós-dipping*).

Tabela 3 - Diferentes formulações da solução filmogênica base.

Amostras	Goma xantana (g)	Glicerina (g)	Água (g)
1	2,5	1,0	80
2	2,5	2,5	80
3	2,5	5,0	80
4	2,5	10	80
5	2,0	1,0	80
6	2,0	2,5	80
7	2,0	5,0	80
8	2,0	10	80
9	1,5	1,0	80
10	1,5	2,5	80
11	1,5	5,0	80
12	1,5	10	80
13	1,0	1,0	80
14	1,0	2,5	80
15	1,0	5,0	80
16	1,0	10	80
17	0,5	1,0	80
18	0,5	2,5	80
19	0,5	5,0	80
20	0,5	10	80

Foram preparadas 20 amostras para análise, na qual foi fixada a quantidade de água destilada e variou-se a quantidade de goma xantana e glicerina, conforme Tabela 3.

As análises das viscosidades foram determinadas utilizando um reômetro rotacional ThermoHaake modelo ViscoTester 6L equipado com “*spindle*” L4. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente nas rotações de 12, 20, 30, 50, 60, 100 e 200 RPM. O tempo de cada medida registrada foi conforme a estabilidade do valor da viscosidade no equipamento.

### 3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A composição química dos óleos foi determinada em um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A acoplado a um espectrômetro de massa (CG-MS) Agilent 5975C. Utilizou-se uma coluna HP-5MS (30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme). A temperatura inicial foi mantida a 70°C durante 1 min, depois elevada a uma taxa de 3°C/min até atingir 240°C, onde permaneceu por 5 min. A temperatura do injetor foi mantida a 240 °C.

As amostras foram previamente diluídas em diclorometano (1 g/L) e injetadas. As substâncias presentes nos óleos essenciais foram identificadas por meio da comparação entre os espectros de massa disponíveis na biblioteca do NIST (National Institute of Standards and Technology).

### 3.4 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS

Foram preparadas duas soluções filmogênicas por meio de metodologias diferentes, adicionando substâncias com determinadas funcionalidades para que o produto alcance as características desejadas. A goma xantana foi utilizada como agente formador de filme, os óleos essenciais como antimicrobianos, a glicerina como emoliente, SLS como emulsificante e o crodamol como estabilizante.

O preparo da primeira solução foi baseado em um método de baixa energia, apenas fazendo uma emulsão (SFE) do óleo essencial sob agitação mecânica. O óleo essencial foi disperso em diferentes concentrações em água, goma xantana e glicerina. A solução foi preparada à temperatura ambiente, conforme Tabela 4. Misturou-se o óleo essencial na água destilada a 500 rpm por 30 min com o agitador mecânico IKA® RW 20 acoplado com impelidor do tipo pá. Em seguida, adicionou-se goma xantana, glicerina e o corante sob agitação

nas mesmas condições por 60 min. Neste método as concentrações de goma xantana e glicerina foram definidas de acordo com o resultado dos testes de viscosidade.

Tabela 4 - Formulações das soluções filmogênica da emulsão (SFE).

Amostra	Óleo essencial (%) <sup>a</sup>	Goma xantana (%) <sup>a</sup>	Glicerina (%) <sup>a</sup>	Corante (%) <sup>a</sup>
SFE1	0,1	0,6	3,0	0,3
SFE2	0,3	0,6	3,0	0,3
SFE3	0,5	0,6	3,0	0,3
SFE4	1,0	0,6	3,0	0,3
SFE5	2,0	0,6	3,0	0,3
SFE6	3,0	0,6	3,0	0,3

<sup>a</sup> % = m/m.

Para a segunda solução filmogênica, utilizou-se um método de alta energia fazendo uma nanoemulsão do óleo essencial concentrado, que posteriormente foi diluído em uma solução base e então foi formada uma solução filmogênica contendo nanoemulsão (SFN) de óleo essencial.

A nanoemulsão foi preparada com 20% de óleo essencial e 20% de crodamol como fase orgânica, e uma fase aquosa composta de 1% de surfactante (SLS) e 59% de água à temperatura ambiente de 25° C. A fase aquosa foi adicionada à fase orgânica, agitando a mistura a 500 rpm por 10 min com auxílio do agitador magnético IKA®. Por fim, a solução foi sonicada em banho de gelo com ultrassom Fisher Scientific Model 500 Sonic Dismembrator durante 1 min (30 s on e 10 s off) a 50% de amplitude. A metodologia de preparo da nanoemulsão foi baseada no método descrito por Scartazzini (2018).

Em seguida, foi preparada a solução filmogênica (Tabela 5). Inicialmente, preparou-se a solução base na qual se misturou a goma xantana, glicerina e o corante na água destilada a 500 rpm por 50 min com agitador mecânico acoplado com impelidor do tipo pá. Posteriormente, a nanoemulsão previamente preparada foi adicionada na solução formadora de filme base sob agitação mecânica nas mesmas condições por 10 min, a fim de diluí-la para que o óleo atinja as mesmas concentrações da formulação das SFE.

Tabela 5 - Formulações das soluções filmogênica da nanoemulsão (SFN).

Amostra	Goma xantana (%) <sup>a</sup>	Glicerina (%) <sup>a</sup>	Nanoemulsão (%) <sup>a</sup>	Corante (%) <sup>a</sup>
SFN1	0,6	3,0	0,5	0,3
SFN2	0,6	3,0	1,5	0,3
SFN3	0,6	3,0	2,5	0,3
SFN4	0,6	3,0	5,0	0,3
SFN5	0,6	3,0	10	0,3
SFN6	0,6	3,0	15	0,3

<sup>a</sup> % m/m.

### 3.5 DISTRIBUIÇÃO MÉDIA DO TAMANHO DAS GOTAS E ESTABILIDADE

A distribuição média do tamanho das gotas de óleo das SFE foi determinada por meio de microscopia óptica. As soluções filmogênicas foram coradas com o corante Sudan IV, em seguida analisou-se no microscópio Olympus BX41 na magnificação de 1000 vezes para as concentrações de 0,1, 0,3 e 0,5%, e 400 vezes para as concentrações de 1, 2 e 3%. Foram capturadas três imagens de cada amostra em locais diferentes e para determinar a distribuição e o diâmetro médio das gotas de óleo essencial foi utilizado um software de processamento e análise de imagens digitais, o ImageJ. Aproximadamente 300 gotas de óleo em cada imagem tiveram seu diâmetro determinado. Em seguida, para avaliar a distribuição foi plotado um histograma do diâmetro das gotas e feito um ajuste não linear para determinar o diâmetro médio.

O tamanho médio das gotas das nanoemulsões e das SFN foi medido por espalhamento dinâmico de luz (DLS) por meio do equipamento Zetasizer Nano S da Malver Instruments®, com comprimento de onda 633 nm e ângulo de leitura de 173°. Diluiu-se 50 µL da amostra em 2 mL de água destilada à temperatura ambiente de 25 °C. A leitura foi feita em duplicata com média de 15 leituras por amostra. Foram realizadas as análises da nanoemulsão e da solução filmogênica, a fim de investigar a variação no tamanho médio das gotas após a diluição. Os dados foram expressos em  $D_p$  e PDI que representam o tamanho médio das nanopartículas e o índice de polidispersão respectivamente.

A estabilidade das formulações foi avaliada por armazenamento durante 30 dias a temperatura ambiente de 25 °C, no qual foi avaliada a distribuição do tamanho médio das gotas de óleo no primeiro e último dia.

## 3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 3.6.1 Microrganismos

Três espécies de microrganismos causadores da mastite bovina foram testadas sendo duas cepas de bactérias e uma de levedura. Foram utilizadas as seguintes cepas padrões: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (bactéria Gram-positiva), *Escherichia coli* ATCC 25922 (bactéria Gram-negativa) e *Candida albicans* ATCC 10231 (levedura), provenientes do estoque do Laboratório de Genética Molecular de Bactérias - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

### 3.6.2 Preparo do inóculo

Os microrganismos foram semeados a partir do estoque pela técnica do esgotamento em estrias em placa de ágar Mueller-Hinton (MHA) e incubados a 37 °C por 18-24 horas. Em seguida, colônias individuais semeadas no ágar foram inseridas em um tubo de ensaio com 10 mL de solução salina [Cloreto de sódio a 0,85% (p/v)] para padronizar a densidade celular, conforme a escala 0,5 McFarland (correspondente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL e densidade óptica de 0,08 a 0,1 a 625nm), conforme descrito pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

### 3.6.3 Difusão em ágar (técnica do poço)

A técnica foi baseado num estudo realizado por Magaldi *et al.* (2004). Foi vertido 60 mL do meio de cultura ágar (MHA) em placas de Petri de 150x20 mm. Após a solidificação foram feitos poços de 4 mm de diâmetro. As placas foram inoculadas com *swab* sobre a superfície do ágar com o inóculo padronizado, conforme recomendações do CLSI. Nos poços foram adicionados 100 µL das soluções filmogênicas incorporadas com os óleos essenciais nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1; 2 e 3%), e dos controles positivo e negativo. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e após a incubação os diâmetros do halo de inibição foram avaliados. Cada ensaio foi realizado em duplicata técnica e biológica.

### 3.6.4 Concentração inibitória mínima (CIM) em placa adaptada

Esta técnica foi adaptada a partir da metodologia descrita pelo CLSI, de forma que o produto ficasse distribuído sobre uma superfície, aproximando *in vitro* da real aplicação. O inóculo padrão 0,5 McFarland foi diluído para uma concentração de  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL de maneira a termos uma estimativa quantitativa da inibição microbiana pelo produto. O inóculo foi distribuído com *swab* em placas de Petri de 90x15 mm previamente preparadas com o meio de cultura ágar (MHA). Em seguida, foi adicionado 1 mL das soluções filmogênicas sobre toda a superfície das placas com auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Ao final da incubação, a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento microbiano na placa. A porcentagem de inibição foi determinada pela razão do número de UFC das placas com os filmes ativos (contendo óleo essencial) com as do controle negativo. Além disso, nesta metodologia, as cepas microbianas padronizadas também foram cultivadas no MHA sem a presença de produto, como controle experimental da contagem e na presença do produto sem óleo essencial (branco) para verificar se apresentava inibição. Todos os testes foram feitos em duplicata biológica e técnica.

### 3.6.5 Controle positivo e negativo

Para avaliar a capacidade de inibição das soluções filmogênicas preparadas contra os microrganismos testados, foi utilizado um método comparativo. Usou-se um controle positivo e um negativo. Como controle positivo utilizou-se um produto comercial - TEC PRÓ *pós-dipping*, um produto comercialmente utilizado para prevenção da mastite, que possui triclorocarbanilida como substância antimicrobiana em sua composição. Como controle negativo das SFE foi preparada a formulação substituindo o óleo essencial por água destilada. O controle negativo das SFN foi preparado substituindo o óleo essencial da nanoemulsão por crodamol, em seguida foi diluída na solução base. Foram preparados seis controles negativos em relação as SFN.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 INVESTIGAÇÃO E ELABORAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE

Os resultados mostraram que todas as formulações apresentaram comportamento pseudoplástico, bem como o produto comercial. De acordo com a Tabela 6 é observado que conforme aumenta a tensão de cisalhamento há diminuição na viscosidade, o que classifica as soluções filmogênicas base como pseudoplásticas.

Tabela 6 - Viscosidade das formulações da solução filmogênica base.

Amostra	RPM						
	12	20	30	50	60	100	200
	Viscosidade (mPa.s)						
1	21290	13580	9520	5840	5020	3320	1900
2	20080	13100	9080	5740	4830	3150	1800
3	19380	12810	8870	5640	4780	3100	1770
4	18570	12200	8430	5450	4690	3060	1750
5	16040	10240	7140	4620	3950	2610	1500
6	15430	9930	6900	4480	3870	2550	1430
7	15150	9690	6780	4390	3790	2480	1420
8	14580	9320	6700	4270	3650	2380	1420
9	11050	7140	5030	3290	2800	1880	1080
10	10710	6990	4910	3210	2750	1820	1050
11	10360	6640	4570	3070	2630	1760	1020
12	9760	6350	4470	3010	2630	1740	1020
13	7170	4500	3210	2200	1890	1270	730
14	6960	4420	3150	2120	1820	1220	700
15	6810	4300	3080	2060	1790	1190	680
16	6690	4240	3030	2060	1780	1190	680
17	2740	1920	1330	890	670	510	270
18	2630	1810	1220	800	610	480	240
19	2580	1750	1160	740	570	460	230
20	2510	1710	1100	700	550	460	210
TEC PRÓ <i>pós-dipping</i>	2220	1330	910	650	580	410	220

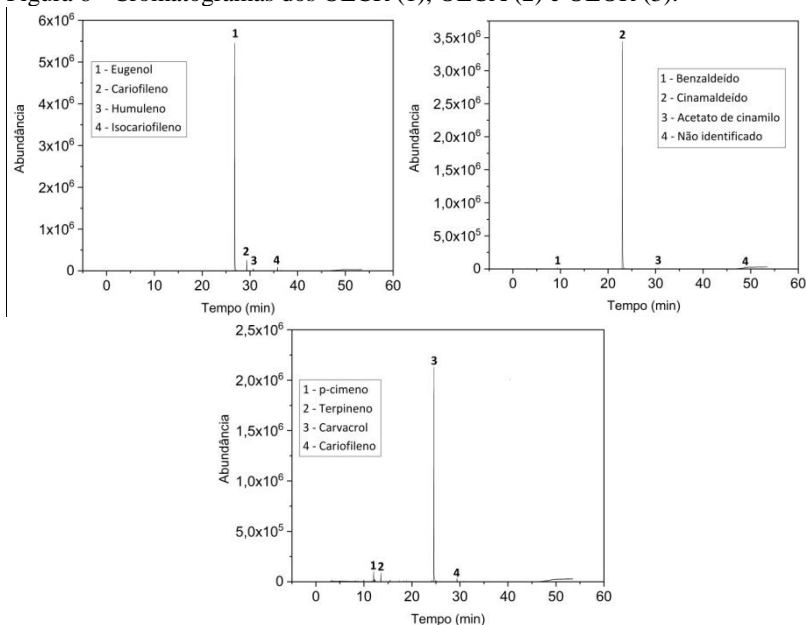
É observada uma grande influência da goma xantana na viscosidade da solução. Conforme diminuí a quantidade de xantana, há clara redução da viscosidade. No caso da glicerina é observada pouca influência na viscosidade. Conforme a variação realizada, ao aumentar a quantidade de glicerina há uma leve diminuição na viscosidade.

Dessa maneira, ao analisar a viscosidade do produto comercial com as viscosidades das soluções bases preparadas, optou-se escolher a amostra 18 como a formulação base utilizada neste trabalho, correspondente a 0,6% de goma xantana e 3% de glicerina. Essa escolha foi feita, devido essa amostra ser a que mais se aproximou da viscosidade e aspecto do produto comercial.

#### 4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

A composição química do OECR, OECA e OEOR estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6 - Cromatogramas dos OECR (1), OECA (2) e OEOR (3).



Os dados estão representados como a área (%) de cada componente assim como o tempo de retenção na coluna (Tabela 7). Pela análise do OECR foi possível identificar quatro componentes, o que corresponde a uma mistura de isocariofileno (1,4%), humuleno (0,9%), cariofileno (4,4%) e o eugenol (93,3), sendo este o constituinte majoritário. O principal constituinte identificado do OECA foi o cinamaldeído (98,29%), seguido de benzaldeído (0,51%) e acetato de



cinamilo (0,46%). O OEOR de acordo com seu espectro de massa foi constatado quatro substâncias, sendo o carvacrol (90,5%) o composto majoritário, acompanhado de terpineno (3,7%), p-cimeno (4,1%) e cariofileno (1,7%).

A composição química dos óleos essenciais analisados mostrou-se compatível conforme dados da literatura, pois estudos relatam que as substâncias características do OEOR, OECA e OEOR são o eugenol, cinamaldeído e o carvacrol respectivamente (CUI *et al.*, 2018; CHORIANOPOULOS *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2018).

Tabela 7 - Principais componentes dos óleos essenciais de cravo, canela e orégano determinados por CG-MS.

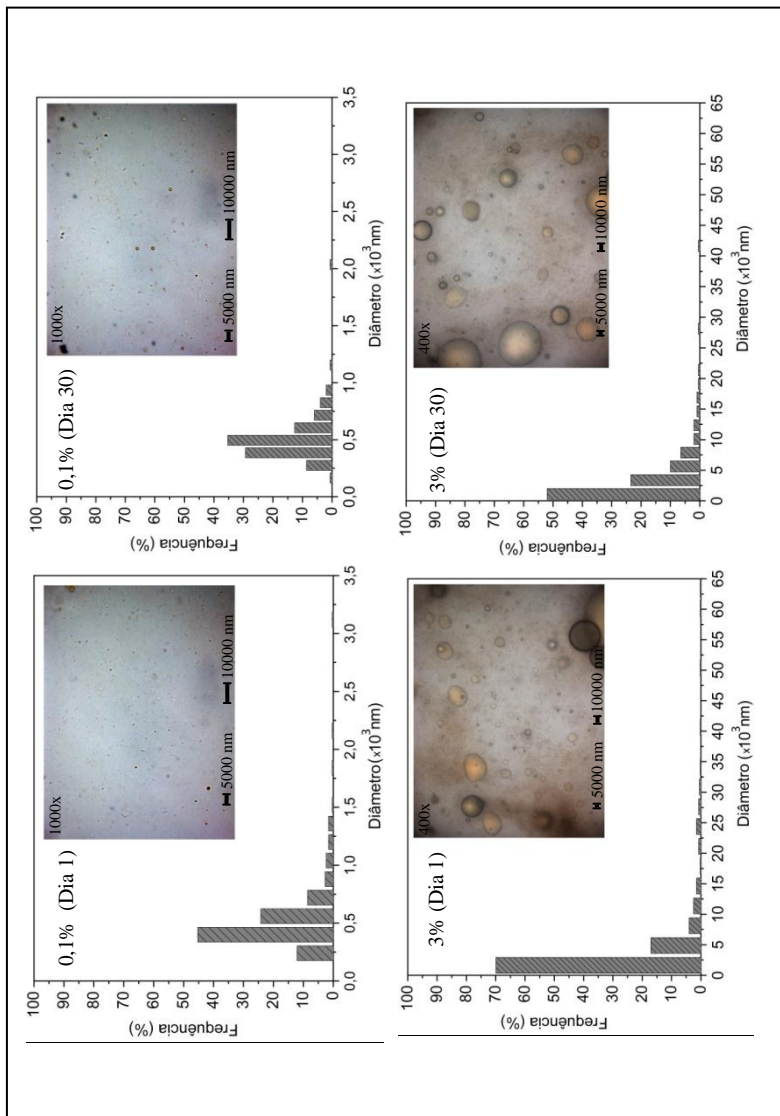
Componente	Tempo de retenção (min)	OEOR (Área %)	OECA (Área %)	OEOR (Área %)
Eugenol	26,83	93,3	-	-
Cariofileno	29,33	4,40	-	1,70
Humuleno	30,73	0,90	-	-
Isocariofileno	35,74	1,40	-	-
Cinamaldeído	23,03	-	98,29	-
p-cimeno	12,01	-	-	4,10
Terpineno	13,54	-	-	3,70
Carvacrol	29,41	-	-	90,5
Benzaldeído	9,34	-	0,51	-
Acetato de Cinamilo	30,54	-	0,46	-

#### 4.3 DISTRIBUIÇÃO MÉDIA DO TAMANHO DAS GOTAS E ESTABILIDADE

Na Tabela 5 estão apresentados os valores do diâmetro médio das SFE. Os resultados demonstraram gotas na faixa de nanômetros com diâmetro médio de 439 a 2323 nm para as SFE com OEOR. Para as SFE contendo OECA e OEOR os valores foram de 375 a 1592 e 418 a 2414 nm respectivamente.

A variação da concentração do óleo essencial demonstrou influência na distribuição do tamanho das gotas nas soluções filmogênicas (Apêndice A, B e C). As SFE com concentrações de óleo de 0,1 a 0,5% tiveram um  $D_p$  menor quando comparado com as concentrações acima de 1%. Além disso, nas concentrações menores foi visualizada uma homogeneidade na distribuição das gotas de óleo, enquanto que nas concentrações acima de 1% as gotas não estavam uniformemente distribuídas, ou seja, havia a presença de gotas pequenas até gotas grandes (Fig. 7).

Figura 7 - Histograma da distribuição média das gotas de óleo essencial de cravo incorporado nas SFE em concentrações de 0,1% e 3% no dia 1 e dia 30.



Esta diferença de  $D_p$  pode estar associada à função estabilizadora da goma xantana. Seu mecanismo de controle reológico é mais eficiente em baixas concentrações de óleo, enquanto em emulsões oleosas concentradas a eficiência estabilizante diminui (DICKINSON, 2009).

Após 30 dias de armazenamento, as SFE apresentaram boa estabilidade em relação à coalescência e a cremeação, pois não foi visualizado grande aumento no  $D_p$  das gotas e nenhuma separação visual de fases. Esta estabilidade pode ser atribuída ao comportamento pseudoplástico da goma e sua característica em aumentar a viscosidade, pois ao dispersar na água cria uma rede emaranhada e alta viscosidade na fase contínua, que imobiliza individualmente as gotas de óleo, o que retarda os fenômenos de instabilidade. Além disso, a presença de um polissacarídeo negativamente carregado como a goma xantana resulta num aumento da repulsão das forças eletrostáticas e estéricas entre as gotas na emulsão, o que reduz a tensão interfacial em torno das gotas de óleo (MIRHOSSEINI *et al.*, 2008; MAKRI; DOXASTAKIS, 2006).

Tabela 8 - Diâmetro médio ( $D_p$ ) das gotas de óleo incorporadas nas SFE no dia 1 e dia 30 para os óleos essenciais de cravo (OECR), canela (OECA) e orégano (OEOR).

		Dia 1		Dia 30	
Amostra		$D_p \pm S.D.$ (nm)	$D_p \pm S.D.$ (nm)	$D_p \pm S.D.$ (nm)	$D_p \pm S.D.$ (nm)
OECR	0,1%	439 ± 3	467 ± 6		
	0,3%	587 ± 2	629 ± 4		
	0,5%	618 ± 8	723 ± 9		
	1,0%	1245 ± 79	1721 ± 76		
	2,0%	1553 ± 49	1926 ± 38		
	3,0%	2323 ± 86	2527 ± 49		
SFE	OECA	0,1%	375 ± 4	441 ± 7	
		0,3%	416 ± 2	601 ± 7	
		0,5%	456 ± 20	693 ± 6	
		1,0%	1125 ± 11	1367 ± 12	
		2,0%	1396 ± 40	1484 ± 37	
		3,0%	1592 ± 93	2000 ± 16	
OEOR	0,1%	418 ± 4	506 ± 21		
	0,3%	532 ± 3	611 ± 7		
	0,5%	777 ± 15	705 ± 10		
	1,0%	1944 ± 44	2020 ± 23		
	2,0%	2085 ± 10	2587 ± 104		
	3,0%	2414 ± 85	2848 ± 63		

O diâmetro médio das gotas de óleo e o índice de polidispersão das SFN estão apresentados nas Tabelas 6 e 7. As nanoemulsões dos óleos essenciais tiveram resultados muito semelhantes de  $D_p$  mesmo variando o tipo de óleo essencial. O  $D_p$  das nanoemulsões antes de serem incorporadas na solução filmogênica foram 164 nm, 154 nm e 184 nm, respectivamente para o OECR, OECA e OEOR, enquanto que o PdI foi de 0,13; 0,13 e 0,14. Os resultados mostraram diâmetro das gotas e uma boa homogeneidade na distribuição das gotas com o comportamento monomodal.

Após a incorporação das nanoemulsões nas soluções filmogênicas houve um leve aumento no  $D_p$  e um largo PdI com comportamento trimodal. Conforme foi diminuída a concentração de óleo, maior foi o diâmetro médio das gotas e consequentemente o PdI. Para as SFN contendo OECR ficou entre 166 a 185 nm, OECA entre 156 a 186 nm e OEOR entre 184 a 208 nm, com PdI entre 0,23 a 0,28; 0,22 a 0,32 e 0,27 a 0,48 respectivamente. Essa variação no diâmetro e distribuição das gotas provavelmente ocorreu ao misturar a nanoemulsão com a solução formadora de filme sob agitação mecânica, o que desestabilizou a nanoemulsão e favoreceu a agregação das gotas. Para a concentração de 0,1% não foi possível obter resultados confiáveis no equipamento o que provavelmente ocorreu devido à concentração estar abaixo da concentração de solubilidade (25°C), sendo para o eugenol 2,46 g/L, carvacrol 1,25 g/L e o cinamaldeído 1,85 g/L, principais constituintes dos óleos essenciais em estudo (YALKOWSKY; HE; JAIN, 2010).

Após 30 dias de armazenamento houve uma pequena variação no  $D_p$  e PdI para as soluções de nanoemulsão, o que indica boa estabilidade (Tabela 7). Já em relação às SFN contendo a nanoemulsão dos óleos essenciais, houve um pequeno aumento no  $D_p$  e PdI nas concentrações de óleo mais altas. Para as concentrações mais baixas o aumento do  $D_p$  foi maior, o que indica que as SFN são mais instáveis nas concentrações mais baixas em relação as concentrações mais alta, mas ainda assim as SFN não perderam sua estabilidade, pois nenhuma separação de fases ou cremação foi observada nos 30 dias de armazenamento. Esses resultados indicam que os óleos essenciais foram bem incorporados na matriz da formulação contendo goma xantada para os dois métodos utilizados.

Tabela 9 - Diâmetro médio ( $D_p$ ) das gotas de óleo das nanoemulsões antes e após a incorporação nas SFN no dia 1.

		Dia 1	
	Amostra	$D_p \pm S.D.$ (nm)	$PdI \pm S.D.$
Nanoemulsão	OECR	$163,9 \pm 0,4$	$0,13 \pm 0,00$
	OECA	$154,6 \pm 2,7$	$0,13 \pm 0,03$
	OEOR	$184,0 \pm 1,3$	$0,14 \pm 0,00$
SFN	OECR	0,1%	-
		0,3%	$185,0 \pm 1,3$
		0,5%	$184,8 \pm 3,9$
		1,0%	$172,7 \pm 0,8$
		2,0%	$166,5 \pm 0,6$
		3,0%	$166,4 \pm 1,1$
	OECA	0,1%	-
		0,3%	$186,0 \pm 0,6$
		0,5%	$174,7 \pm 0,5$
		1,0%	$165,5 \pm 1,1$
		2,0%	$159,1 \pm 0,8$
		3,0%	$156,3 \pm 1,3$
	OEOR	0,1%	-
		0,3%	$208,7 \pm 3,8$
		0,5%	$196,3 \pm 5,9$
		1,0%	$192,1 \pm 7,4$
		2,0%	$190,2 \pm 2,5$
		3,0%	$184,4 \pm 0,6$

Tabela 10 - Diâmetro médio ( $D_p$ ) das gotas de óleo das nanoemulsões antes e após a incorporação nas SFN no dia 30.

Dia 30				
	Amostra	$D_p \pm S.D.$ (nm)	$PdI \pm S.D.$	
Nanoemulsão	OECR	$165,3 \pm 1,5$	$0,14 \pm 0,03$	
	OECA	$160,4 \pm 2,8$	$0,11 \pm 0,01$	
	OEOR	$185,1 \pm 0,6$	$0,13 \pm 0,03$	
SFN	0,1%	-	-	
	0,3%	$197,1 \pm 1,6$	$0,47 \pm 0,00$	
	0,5%	$186,4 \pm 1,8$	$0,41 \pm 0,00$	
	1,0%	$183,1 \pm 1,2$	$0,31 \pm 0,00$	
	2,0%	$175,7 \pm 3,5$	$0,26 \pm 0,01$	
	3,0%	$173,2 \pm 0,4$	$0,27 \pm 0,01$	
	OECA	0,1%	-	-
		0,3%	$193,9 \pm 0,1$	$0,46 \pm 0,00$
		0,5%	$187,3 \pm 0,9$	$0,32 \pm 0,01$
		1,0%	$168,5 \pm 0,8$	$0,28 \pm 0,01$
		2,0%	$159,7 \pm 0,4$	$0,24 \pm 0,00$
		3,0%	$158,5 \pm 0,4$	$0,22 \pm 0,03$
	OEOR	0,1%	-	-
		0,3%	$220,2 \pm 0,9$	$0,48 \pm 0,00$
		0,5%	$207,7 \pm 2,8$	$0,48 \pm 0,02$
		1,0%	$198,3 \pm 1,6$	$0,27 \pm 0,00$
		2,0%	$194,4 \pm 1,7$	$0,27 \pm 0,01$
		3,0%	$187,4 \pm 3,6$	$0,27 \pm 0,01$

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana dos produtos testados contra cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* foi avaliada qualitativamente por meio da medida do diâmetro do halo de inibição formado e quantitativamente através de uma adaptação da CIM em placa. Nenhum dos controles negativos apresentou efeito antimicrobiano, portanto a matriz utilizada (goma xantana), bem como o LSS e o crodamol utilizados na nanoemulsão não afetaram a atividade do princípio ativo.

Na Tabela 8 estão apresentados os valores do diâmetro dos halos de inibição. De acordo com os resultados, todos os produtos apresentaram efeito inibitório, porém com variação conforme o microrganismo testado. Como esperado, a inibição microbiana pelo produto foi dose-dependente, ou seja, quanto maior foi a concentração de óleo essencial utilizada, maior foi o tamanho do halo de inibição.

Analisando as SFE com OEOR e OECA, as que continham OEOR foram as que apresentaram a atividade mais fraca contra todos os microrganismos com valores das zonas de inibição entre 6 a 13 mm para *S. aureus*, 5,3 a 10 mm para *E. coli* e 6,3 a 12,8 mm para *C. albicans*. As medidas dos halos das SFE com OEOR apresentaram valores muito próximos entre 7,5 a 24,5 mm para *S. aureus*, 7,3 a 23,5 mm para *E. coli* e 6,3 a 25 mm para *C. albicans* com pouca diferença.

Nos ensaios por difusão (Tabela 8), a *E. coli* apresentou menor sensibilidade aos óleos essenciais quando comparada aos outros microrganismos, principalmente em relação as SFE contendo OECA. Para *S. aureus*, o valor do halo de inibição ficou entre 13 a 32 mm, 13 a 25 mm para *C. albicans* e para *E. coli* foi 3 a 19 mm. Isto pode ter ocorrido devido à diferença que há nas estruturas da parede celular dos microrganismos. Os microrganismos Gram-negativos possuem uma membrana externa de fosfolípidos contendo lipopolissacarídeos que cobre a parede celular. Quando comparada com os microrganismos Gram-positivos, que não possuem esta membrana externa, os Gram-negativos podem se mostrar mais resistentes a substâncias hidrofóbicas, o que poderia estar dificultando a difusão do óleo (HSOUNA *et al.*, 2011; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). As SFE incorporadas com OEOR e OECA tiveram menor inibição em algumas concentrações, mas não tão acentuada quanto às contendo OECA. Isto pode ter acontecido pelo fato do OEOR e OECA serem menos hidrofóbicos que o OECA, dessa forma houve menos resistência, e os compostos tiveram o acesso facilitado à parede celular dos microrganismos.

Tabela 11 - Ensaio da atividade antimicrobiana das SFE e SFN incorporadas com óleos essenciais de cravo (OECR), canela (OECA) e orégano (OEOR) contra o crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* pela técnica de difusão em poços.

		Halo de inibição (mm)							
Concentração do óleo		0,1%	0,3%	0,5%	1%	2%	3%	C <sup>+</sup>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	OECR	0	0,0	0	6,0 ± 0,5	10,0 ± 0,8	13,0 ± 1,0	20,0 ± 0,5	
	OECA	0	0,0	13,0 ± 1,0	20,0 ± 1,9	26,5 ± 1,9	32,0 ± 2,8	20,5 ± 1,0	
	OEOR	0	0,0	7,5 ± 0,6	9,8 ± 0,5	22,0 ± 0,0	24,5 ± 1,0	20,0 ± 1,0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	OECR	0	0,0	3,0 ± 0,5	6,0 ± 1,0	10,0 ± 0,6	12,0 ± 0,6	19,0 ± 0,8	
	OECA	0	0,0	7,8 ± 0,8	14,0 ± 1,0	20,0 ± 0,9	23,0 ± 0,6	20,0 ± 1,8	
	OEOR	0	0,0	5,0 ± 0,8	8,0 ± 1,3	11,0 ± 0,9	14,0 ± 1,3	19,0 ± 0,9	
<i>Escherichia coli</i>	OECR	0	0,0	5,3 ± 1,9	6,0 ± 1,2	7,0 ± 1,2	10,0 ± 0,0	21,9 ± 1,5	
	OECA	0	3,0 ± 1,2	5,3 ± 1,0	8,0 ± 0,5	17,0 ± 1,0	19,0 ± 0,9	19,5 ± 1,0	
	OEOR	0	7,3 ± 1,0	9,5 ± 0,6	13,8 ± 0,5	19,3 ± 1,5	23,5 ± 1,7	20,0 ± 0,5	
<i>Escherichia coli</i>	OECR	0	0,0	3,0 ± 0,8	4,0 ± 0,5	7,0 ± 1,0	9,0 ± 0,8	19,0 ± 0,8	
	OECA	0	0,0	7,0 ± 1,0	12,0 ± 2,1	19,0 ± 2,4	24,0 ± 1,5	20,0 ± 1,7	
	OEOR	0	3,0 ± 0,6	4,0 ± 0,5	6,0 ± 1,0	9,0 ± 0,9	12,0 ± 1,7	19,0 ± 0,8	
<i>Candida albicans</i>	OECR	0	0,0	0,0	6,3 ± 0,5	9,5 ± 0,6	12,8 ± 1,0	25,0 ± 0,9	
	OECA	0	0,0	0,0	13,0 ± 0,9	23,5 ± 1,0	25,0 ± 0,9	23,0 ± 1,2	
	OEOR	0	6,3 ± 0,5	9,0 ± 0,8	12,0 ± 0,5	23,0 ± 1,7	25,0 ± 1,2	25,0 ± 0,9	
<i>Candida albicans</i>	OECR	0	0,0	4,0 ± 0,5	6,0 ± 0,6	9,0 ± 0,6	11,0 ± 0,8	24,0 ± 1,6	
	OECA	0	0,0	5,0 ± 1,2	10,0 ± 0,9	17,0 ± 2,6	20,0 ± 2,8	21,0 ± 1,0	
	OEOR	0	3,0 ± 0,5	4,0 ± 0,9	8,0 ± 1,3	10,0 ± 0,5	12,0 ± 0,5	20,0 ± 1,4	



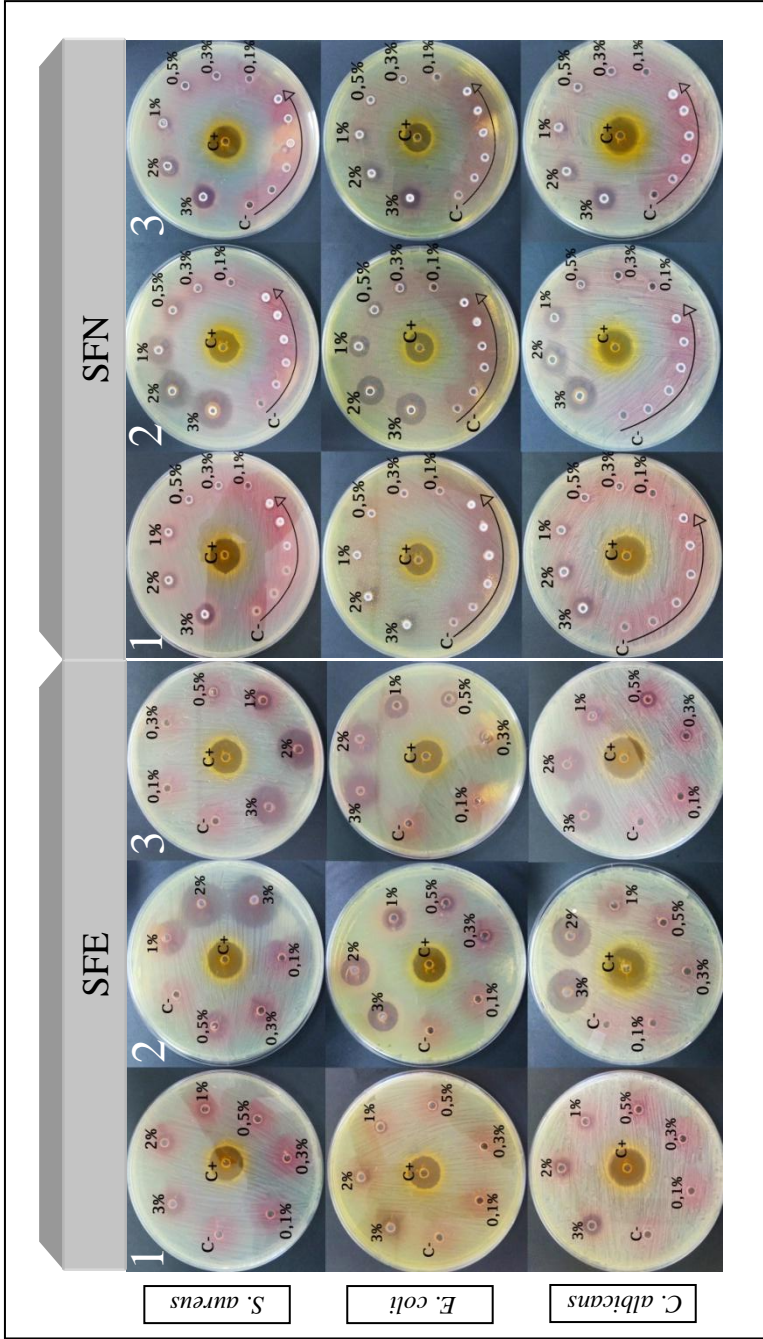
Em determinadas concentrações de óleo, houve o aparecimento de resistência intermediária microbiana, ou seja, o óleo inibiu o crescimento de uma parte da população que é suscetível, enquanto que a outra parte apresentou-se resistente, para *S. aureus* e *C. albicans* para concentrações abaixo de 1% das SFE contendo OECR e OECA.

Em contrapartida, a atividade antimicrobiana das SFN mostrou o mesmo comportamento em relação a explicação anterior das SFE, porém com redução da atividade antimicrobiana, como pode ser observado na Fig. 8. A possível explicação é que a redução da atividade antimicrobiana possa ter ocorrido em razão do surfactante utilizado, a atividade pode ter sido reduzida devido às possíveis barreiras como a formação de micelas que prendem o óleo essencial. Dessa forma há liberação prolongada do óleo e isto impede o contato imediato entre o composto ativo e o microrganismo (CUI *et al.*, 2008; CHALOVA; CRANDALL; RICKE, 2010). Outra hipótese que pode ser levantada é a interação eletrostática das gotas da nanoemulsão carregadas negativamente com a parede celular dos microrganismos carregada negativamente, o que causa repulsão e dificulta a migração da substância ativa até o local de ação (CHANG; McLANDSBOROUGH; McCLEMENTS, 2015; LU *et al.*, 2018; HWANG *et al.*, 2013).

Por meio de outros trabalhos na literatura é observado que os óleos essenciais também apresentaram atividade antimicrobiana, o que reforça os dados aqui apresentados. O estudo de Zhu *et al.* (2016), avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de canela contra patógenos isolados diretamente da masite bovina. Por meio da metodologia de difusão em discos utilizaram 5, 10 e 20 µL de soluções contendo 2% de óleo de canela, obtendo halos de inibição para solução de 20 µL de 29,6 e 30,7 mm contra *S. aureus* e *E. coli* ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) respectivamente.

Pelo método de difusão em disco Mohamed e Abdhussain (2014) obtiveram halos de inibição entre 9 a 23 mm utilizando extratos aquosos e alcoólicos de óleo de canela contra *C. albicans* inoculada a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Da mesma forma Santos *et al.* (2011) confirmaram a ação antimicrobiana do óleo de cravo obtendo halos de 15,7 e 11 mm para cepas padrões de *S. aureus* e *E. coli* respectivamente, e para o óleo de orégano houve formação de halo de 29,3 e 27,7 mm contra *S. aureus* e *E. coli* respectivamente.

Figura 8 - Ensaio de difusão em placa de ágar utilizando a técnica do poço para determinar a atividade antimicrobiana das SFE e SFN contendo óleo essencial de cravo (1 - OECA), canela (2 - OECA) e orégano (3 - OEOR).



Na Fig. 9 estão apresentados os resultados da atividade antimicrobiana dos testes da adaptação da CIM em placas. Conforme observado, para todos os produtos com concentrações acima de 1% de óleo essencial houve inibição total (100%) no crescimento dos microrganismos. No entanto, em concentrações inferiores, as formulações que continham OEOR foram as que apresentaram maior atividade. Para as SFE contendo 0,5% de OEOR, observou-se a inibição total no crescimento para todos os microrganismos, porém para 0,3% somente a *C. albicans* teve inibição total, enquanto para o *S. aureus* e a *E. coli* houve 99 e 94% de inibição respectivamente.

Para as SFE com concentrações inferiores a 1% de OECA e OECR também foi obtido bons resultados, mas de forma particular em determinado microrganismo. As SFE com OECA apresentaram melhor resultado em concentrações de 0,5% contra *S. aureus* e *E. coli*, com inibição de 99,41 e 83,4% respectivamente. Para as que continham OECR, os melhores resultados foram nas concentrações de 0,3 e 0,5% contra a *E. coli* com inibição de 91 e 95% respectivamente.

Tabela 12 - Ensaio da concentração inibitória mínima (CIM) em placa adaptado das SFE e SFN contendo óleo essencial de cravo (OECR), canela (OECA) e orégano (OEOR) nas concentrações de 0,1; 0,3 e 0,5%.

		Inibição de crescimento (%)			
		Concentração do óleo	0,1%	0,3%	0,5%
<i>S. aureus</i>	SFE	OECR	18,7 ± 0,7	34,7 ± 9,0	79,1 ± 3,2
		OECA	8,2 ± 6,0	82,6 ± 9,6	99,4 ± 1,2
		OEOR	35,5 ± 15,5	99,3 ± 1,2	100,0 ± 0,0
	SFN	OECR	18,9 ± 3,9	26,5 ± 7,5	21,8 ± 4,5
		OECA	21,8 ± 7,5	56,4 ± 11,4	97,3 ± 3,3
		OEOR	26,5 ± 9,1	96,2 ± 2,9	100,0 ± 0,0
<i>E. coli</i>	SFE	OECR	13,8 ± 4,8	90,9 ± 2,0	94,8 ± 3,0
		OECA	4,1 ± 1,7	24,0 ± 5,4	83,4 ± 3,8
		OEOR	80,2 ± 9,6	94,2 ± 2,5	100,0 ± 0,0
	SFN	OECR	9,3 ± 4,2	46,0 ± 9,7	89,8 ± 3,3
		OECA	5,6 ± 2,2	10,8 ± 4,4	96,1 ± 5,7
		OEOR	61,9 ± 5,0	93,9 ± 2,9	96,8 ± 1,8
<i>C. albicans</i>	SFE	OECR	21,6 ± 8,9	37,7 ± 4,3	44,1 ± 8,7
		OECA	6,2 ± 3,8	24,8 ± 4,3	58,0 ± 6,2
		OEOR	36,9 ± 12,3	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	SFN	OECR	15,1 ± 6,1	28,5 ± 7,5	54,7 ± 9,1
		OECA	16,0 ± 6,8	19,4 ± 4,0	89,7 ± 11,7
		OEOR	14,0 ± 5,5	85,2 ± 3,4	96,6 ± 6,8

Quando comparados os resultados das SFE com as SFN, nos testes da adaptação da CIM é observada pouca variação da atividade antimicrobiana para as concentrações de 0,1; 0,3 e 0,5% Tabela 9, o que não acontece nos testes por difusão em ágar, onde a atividade antimicrobiana entre as SFE e as SFN é muito diferente. Comparando a técnica adaptada da CIM com a técnica da difusão é possível visualizar que na CIM as soluções filmogênicas estão diretamente em contato com os microorganismos e neste caso não há limitação de migração e/ou difusão do óleo essencial.

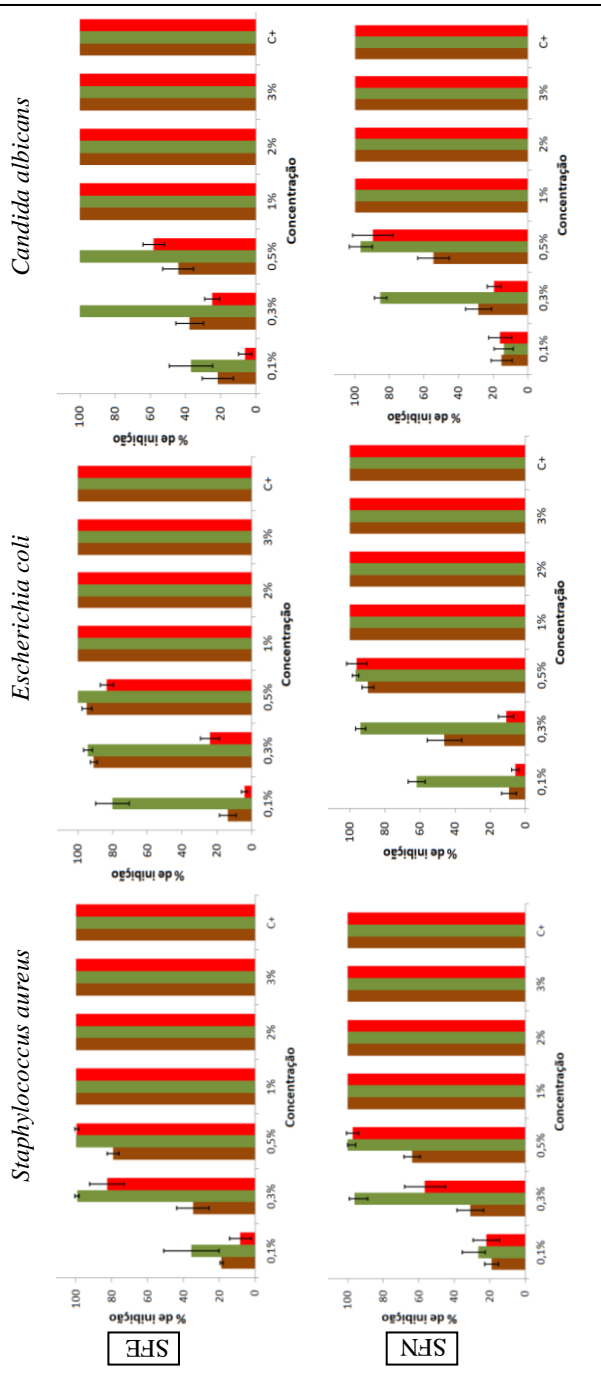
Vale ainda ressaltar que os resultados da CIM não indicam a atividade absoluta dos produtos testados. Os resultados obtidos não representam um valor exato, pois o verdadeiro valor da CIM está entre a concentração que inibiu o crescimento e a próxima concentração mais baixa dos testes, ou seja, 0,3 e 1%.

É bom lembrar que o inóculo microbiano utilizado nesta metodologia da CIM foi menor ( $1,5 \times 10^4$  UFC/mL) quando comparado com o inóculo utilizado no teste de difusão em ágar, justamente para permitir a contagem de UFC nas placas e para ter uma estimativa quantitativa. Porém, a concentração menor do inóculo pode afetar diretamente os resultados de inibição, tornando a ação do produto mais efetiva, já que há menor quantidade de células microbianas.

Pesquisas encontradas na literatura ressaltam a efetividade dos óleos estudados pela metodologia da concentração inibitória mínima (CIM). Conforme estudo realizado por Ksouri *et al.* (2017), o óleo essencial de orégano revelou atividade altamente eficiente contra *C. albicans* ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). A atividade foi investigada pelo método de microdiluição em tubos, na qual resultaram valores da CIM de aproximadamente 80% variando a concentração de 15,02 a 31,08 µg/mL. Utilizando o mesmo método Silva *et al.* (2009) relatou a atividade antimicrobiana do óleo de cravo e canela com concentrações de 0,025% a 3% contra *S. aureus* e *E. coli* ( $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  UFC/mL) isoladas de humanos. De acordo com seus resultados o óleo de canela foi o que apresentou mais eficiência com valores da CIM<sub>90%</sub> de 0,047 e 0,09% para *S. aureus* e *E. coli* respectivamente.

No trabalho de Santurio *et al.* (2011) foi avaliado a atividade antimicrobiana do óleo de orégano e canela frente a espécie *E. coli* ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) isolado das fezes de aves e bovinos. Os testes foram feitos através da técnica de microdiluição em caldo onde foi observado que o óleo mais efetivo quanto à atividade antimicrobiana foi o orégano com CIM de 831,4 µg/mL, sendo que o menos efetivo foi o óleo de canela com CIM 4354,5 µg/mL.

Figura 9 - Ensaio da concentração inibitória mínima (CIM) em placa adaptado das SFE e SFN contendo óleo essencial de cravo (■), canela (■) e orégano (■) nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1; 2 e 3%.





## 5 CONCLUSÃO

As soluções filmogênicas preparadas mostraram ter boa eficiência contra o crescimento de cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Os resultados indicaram que tanto as SFE como as SFN têm potencial antimicrobiano quando comparadas com o controle positivo. De acordo com os dados obtidos nos testes por difusão em ágar, as SFD com concentrações de 2 e 3% de OECA e OEOR foram as que apresentaram melhores resultados, com halos entre 22-32, 17-23,5 e 23-25 mm contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* respectivamente, valores próximos e até maiores dos halos do controle positivo (19,5-25 mm), o que indica boa eficiência da solução filmogênica. É observado que nos testes por difusão as SFE foram mais eficientes do que as SFN o que possivelmente ocorreu devido à presença do surfactante ânionico utilizado para preparar as SFN. A migração do óleo pode ter sido impedida devido à interação eletrostática entre as nanogotas de óleo e a parede celular do microrganismo, ambas carregadas negativamente. Outra possível explicação da redução da atividade antimicrobiana pode ser que a formação de micelas possa ter limitado a dispersão do óleo essencial, o que dificultou seu deslocamento até o microrganismo. Em relação aos testes da CIM, os resultados das SFD ficaram semelhantes com os da SFN, mas ainda assim os resultados das SFD foram melhores, as que continham OEOR a CIM foi 0,3% contra a *C. albicans*, e 0,5% contra *E. coli* e *S. aureus*, seguido das que continham OECA, onde a CIM foi de 1% contra todos os microrganismos. Já para as SFN, a CIM foi contendo 1% de OECA e OEOR contra todos os microrganismos. Ao comparar as metodologias, no caso dos testes da CIM não teve tanta diferença entre as SFD e as SFN pelo fato do produto estar diretamente em contato com o microrganismo, o que não ocorre no método por difusão. Os microrganismos Gram-positivos foram mais sensíveis ao produto do que os Gram-negativos devido à diferente estrutura de sua parede celular. Observou-se que as SFE e as SFN apresentaram boa estabilidade em longo prazo frente ao crescimento das gotas de óleo. Em relação ao diâmetro médio, houve pouca variação nos 30 dias de armazenamento, o que indica boa estabilidade. Dessa forma, as soluções filmogênicas incorporadas com óleos essenciais podem ser consideradas uma alternativa ambientalmente amigável e segura, na qual podem substituir os produtos comercialmente disponíveis utilizados para a prevenção da mastite bovina. Apesar dos resultados promissores, para que estas soluções filmogênicas se tornem um produto de mercado de fato, mais testes devem ser realizados. Sendo assim ficam algumas

sugestões para trabalhos futuros, como avaliar as propriedades do filme em relação à adesão, solubilidade em água, ângulo de contato, resistência mecânica e, além disso, fazer testes de citotoxicidade em células de bovinos, migração do óleo essencial para o ar, tempo de degradação do filme na pele e testes utilizando cepas de microrganismos isoladas diretamente da mastite bovina.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; HAYAT, K.; KARANGWA, E. *et al.* **An overview of ultrasoundassisted food-grade nanoemulsions.** Food Eng. Rev. Vol. 5(3), p. 139–157, 2013.
- ABEBE, R; HATIYA, H.; ABERA, M. *et al.* **Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia.** BMC – Veterinary Research. Vol. 12, 2016.
- AGUILAR-GONZÁLEZ, A. E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. **Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against grey mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries.** Innovative Food Science & Emerging Technologies. Vol. 32, p. 181–185, 2015.
- AGUIRRE, A.; BORNEO, R.; LEÓN, A. E. **Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with orégano essential oil.** Food Bioscience. Vol. 1, p. 2-9, 2013.
- AITKEN, S. L.; CORL, C. M.; SORDILLO, L. M. **Immunopathology of Mastitis: Insights into Disease Recognition and Resolution.** Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. Vol. 16(4), p. 291-204, 2011.
- ALEMU, S.; FIRAOL, T.; ALMAW, G.; TSEGA, A. **Study on bovine mastitis and its effect on chemical composition of milk in and around Gondar Town, Ethiopia.** Journal of Veterinary Medicine and Animal Health. Vol. 5(8), p. 215-221, 2013.
- ALLORE, H. G.; ERB H. N. **Partial budget of the discounted annual benefits of mastitis control strategies.** Journal of Dairy Science. Vol. 81(8), p. 2280-2292, 1998.
- AMATISTE, S.; SAGRAFOLI, D.; GIACINTI, G. *et al.* **Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* in fresh sheep cheese.** Italian Journal of Food Safety. Vol. 3(3), p. 148-150, 2014.

ANANDA, B. S.; KAZMER, G. W.; HINCKLEY, L. *et al.* **Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro.** Journal of Dairy Science. Vol. 92(4), p. 1423–1429, 2009.

ANDREWS, J. F.; MULLIN, T. A.; SENKUS, R. **Prophylactic treatment of mastitis.** Estados Unidos, patente US4113854A, 1977.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V. *et al.* **Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and Flowers.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 54(12), p. 4364–4370, 2006.

BAÂTOUR, O. **Effect of growth stages on phenolic content and antioxidant activities of shoots in sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) varieties under salt stress.** African Journal of Biotechnology. Vol. 11(99), p. 16486–16493, 2012.

BABY, A. J.; SUNDARI, A. R.; INDUNMATHI, J. *et al.* **Study on the antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration of essential oils of spices.** Veterinary World. Vol. 4(7), p. 311–316, 2011.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. **Biological effects of essential oil – A review.** Food and Chemical Toxicology. Vol. 46(2), p. 446–475, 2008.

BANSAL, B. K.; HAMANN, J.; GRABOWSKI, T. N.; SINGH, K. B. **Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis.** Journal of Dairy Research, 72(2): 144–152, 2005.

BARICEVIC, D.; BARTOL, T. **The biological/pharmacological activity of the oregano genus.** In: KINTZIOS, S. E. *Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia*.* Nova York: Taylor and Francis, 2002.

BASDEW, I. H.; LAING, M. D. **Stress sensitivity assays of bacteriophages associated with *Staphylococcus aureus*, causal organism of bovine mastitis.** Afr. J. Microbiol. Res. Vol. 8(2), p. 200–210, 2014.

BATAVANI, R. A.; ASRI, S.; NAEBZADEH, H. **The effect of subclinical mastitis on milk composition in dairy cows.** Iranian Journal of Veterinary Research. Vol. 8(3), p. 205-211, 2007.

BECKER, A.; KATZAN, F.; PUHLER, A.; IELPI, L. **Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective.** Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 50(2), p. 145–152, 1998.

BELOTI, V. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade.** 1ª edição. São Paulo: Planta, 2014.

BeMILLER, J.; WHISTLER, R. **Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives.** 3ª Edição. Nova York: Academic Press, 2012.

BHATT, P.; MADHAV, S. **A Detailed Review on Nanoemulsion Drug Delivery System.** International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. Vol. 2(10), p. 2482-2489, 2011.

BIDDLE, M. K.; FOX, L. K.; EVANS, M. A.; GAY, C. C. **Pulsed-field gel electrophoresis patterns of mycoplasma isolates from various body sites in dairy cattle with mycoplasma mastitis.** J. Am. Vet. Med. Assoc. Vol. 227(3), p. 455–459, 2005.

BLOWEY, R. W.; EDMONDSON, P. **Mastitis Control in Dairy Herds.** 2ª Edição. Wallingford: CABI International, 2010.

BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. **Control de la mastitis em granjas de vacuno de leche: guia ilustrada y práctica.** Zaragoza: Acricibia, 1995.

BOSKOVIC, M.; ZDRAVKOVIC, N.; IVANOVIC, J. *et al.* **Antimicrobial activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms.** Procedia Food Science. Vol. 5, p. 18-21, 2015.

BOUCHEMAL, K.; BRIANCON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. **Nanoemulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization.** Int. J. Pharm. Vol. 280(1-2), p. 241-251, 2004.

BRADLEY, A. **Bovine Mastitis: An Evolving Disease.** The Veterinary Journal. Vol. 164(2), p. 116-128, 2002.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. **Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland.** Journal of Clinical Microbiological. Vol. 39(5), 1845-1849, 2001.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. **The importance of chronic infection and adaptation of *Escherichia coli* to the mammary environment – preliminary UK data.** Cattle Practice. Vol. 8, p. 233-237, 2000.

BRADLEY, A. J.; LEACH, K. A.; BREEN, J. E. *et al.* **Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales.** Veterinary Record. Vol. 160(8), p. 253–257, 2007.

BRADLEY, A.; GREEN, M. **A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period.** Journal of Dairy Science. Vol. 83(9), p. 1957–1965, 2000a.

BRUM, A.; PEREIRA, S. A.; OWATARI, M. S. *et al.* **Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*.** Aquaculture. Vol. 468(1), p. 235–243, 2017.

BUDRI, P. E.; SILVA, N. C.; BONSAGLIA, E. C. *et al.* **Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis.** Journal of Dairy Science. Vol. 98(9), p. 5899-5904, 2015.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. **Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7.** Letters in Applied Microbiology. Vol. 36(3), p. 162–167, 2003.

BURT, S. **Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review.** International Journal of Food Microbiology. Vol. 94(3), p. 223-253, 2004.

BURVENICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, J. *et al.* **Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors.** Veterinary Research. Vol. 34(5), p. 521–564, 2003.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. **Experiments and modeling of the *Cymbopogon winterianus* essential oil extraction by steam distillation.** Journal of the Mexican Chemical Society. Vol. 50(3), p. 126–129, 2006.

CASSOLI, L. D. **Situação atual da mastite: estamos no controle?** Milkpoint, 2016. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/clinica-do-leite/situacao-atual-da-mastite-estamos-no-controle-205967n.aspx>>. Acesso em: 11 out. 2018.

CHALOVA, V. I.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. **Microbial inhibitory and radical scavenging activities of cold-pressed terpeneless Valencia orange (*Citrus sinensis*) oil in different dispersing agents.** Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol. 90(5), p. 870-876, 2010.

CHAMI, F.; CHAMI, N.; BENNIS, S. *et al.* **Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae*.** Phytotherapy Research. Vol. 19(5), p. 405–408, 2005.

CHANG, Y. ; McLANDSBOROUGH, L.; McCLEMENTS, D. J. **Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate).** Food Chemistry. Vol. 172, p. 298-304, 2015.

CHARMAN, N.; DYSON, R.; HODGE, A. *et al.* **A survey of mastitis pathogens in South-Eastern Australian dairy industry.** Countdown Symposium, Melbourne, Australia, 2012.

CHIME, S. A.; KENECHUKWU, F. C.; ATTAMA, A. A. **Nanoemulsions-Advances in Formulation, Characterization and Applications in Drug Delivery.** Application of Nanotechnology in Drug Delivery, Croatia: InTech. p. 77-111, 2014.

CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N. *et al.* **Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species:**

**chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 52(26), p. 8261–8267, 2004.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L. *et al.* **Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic republic of Congo.** Journal. of Ethnopharmacology. Vol. 79(2), p. 213-220, 2002.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** CLSI/NCCLS.

COFFEY, T. J.; PULLINGER, G. D.; URWIN, R. *et al.* **First insights into the evolution of *Streptococcus uberis*: a multilocus sequence typing scheme that enables investigation of its population biology.** Applied and environmental microbiology. Vol. 72(2), p. 1420–1428, 2006.

CONSTABLE, P. D.; HINCHCLIFF, K. W.; DONE, S. H.; GRUNBERG, W. **Veterinary medicine: a text book of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats.** Vol. 1, 11<sup>a</sup> Edição. Missouri: Elsevier, 2017.

CORDOVA, U. A. **Produção de leite à base de pasto em Santa Catarina.** Florianópolis: Epagri, 2012.

CUI, H.; BAI, M.; RASHED, M. M. A.; LIN, R. L. **The antibacterial activity of clove oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers against *Escherichia coli* O157:H7 biofilms on cucumber.** International Journal of Food Microbiology. Vol. 266, p. 69-78, 2018.

CUI, X.; MAO, S.; LIU, M.; YUAN, H.; DU, Y. **Mechanism of surfactant micelle formation.** Langmuir. Vol. 24(19), p. 10771–10775, 2008.

DAHMEN, S.; MÉTAYER, V.; GAY, E. *et al.* **Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- carrying plasmids and clones of *Enterobacteriaceae* causing cattle mastitis in France.** Veterinary Microbiology. Vol. 162(2-4), p. 793–799, 2013.

De VLIEGHER, S.; FOX, L. K.; PIEPERS, S. *et al.* **Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control.** Journal of Dairy Science. Vol. 95(3), p. 1025-1040, 2012.

DEGO, O. K. *et al.* **Bovine intramammary infection associated immunogenic surface proteins of *Streptococcus uberis*.** Microbial Pathogenesis. Vol. 115, p. 304-311, 2018.

DEHKORDI, S. H.; HOSSEINPOUR, F.; KAHRIZANGI, A. E. **An in vitro evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis.** Afr.

DELMAS, T.; PIRAUX, H.; COUFFIN, A.-C. *et al.* **How to prepare and stabilize very small nanoemulsions.** Langmuir. Vol. 27(5), p. 1683-1692, 2011.

Di LEO LIRA, P.; RETTA, D.; TKACIK, E. *et al.* **Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurusnobilis L.*) from Argentina.** Industrial Crops and Products. Vol. 30(2), p. 259–64, 2009.

DICKINSON, D. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. Food Hydrocolloids. Vol. 23(6), p. 1473-1482, 2009.

DINGWELL, R. T.; LESLIE, K. E.; DUFFIELD, T. F. *et al.* **Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for cure of *Staphylococcus aureus* infection in the dry period.** Journal of Dairy Science. Vol. 86(1), p. 159-168, 2003.

DOPFER, D.; BARKEMA, H. W.; LAM, T. J. *et al.* **Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows.** Journal of Dairy Science. Vol. 82(1), p. 80-85, 1999.

DUFOUR, S.; DOHOO, I. R.; BARKEMA, H. W. *et al.* **Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows.** Journal of Dairy Science. Vol. 95(3), p. 1283–1300, 2012.

EDMONDSON, P. **Blitz therapy for the eradication of *Streptococcus agalactiae* infections in dairy cattle.** In Practice. Vol. 33(1), p. 33–37, 2011.

FDA – Food and Drug Administration. **Code of Federal Regulations Title 21- FOOD AND DRUGS, Chapter I - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Subchapter E - ANIMAL DRUGS, FEEDS, AND RELATED PRODUCTS, Part 582 - SUBSTANCES GENERALLY RECOGNIZED AS SAFE.** 2017.

FISCHER, C. L.; WALTERS, K. S.; DRAKE, D. R. *et al.* **Oral mucosal lipids are antibacterial against *Porphyromonas gingivalis*, induce ultrastructural damage, and alter bacterial lipid and protein compositions.** Int. J. Oral. Sci. Vol. 5(3), p. 130–140, 2013.

FITZPATRICK, S.; GARVEY, M.; GLEESON, D. **A review of test protocols for the evaluation of teat disinfectants.** International Journal of Dairy Technology. Vol. 70, 2018.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite.** São Paulo: Lemos Editorial, 2001.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite.** 1ª Ed. Barueri: Manole, 2007.

FOURICHON, C.; SEEGER, H.; BEAUDEU, F. *et al.* **Health-control costs in dairy farming systems in western France.** Livestock Production Science Vol. 68(2-3), p. 141–156, 2001.

FOX, L. K.; KIRK, J. H.; BRITTEN, A. **Mycoplasma mastitis: A review of transmission and control.** J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health. Vol. 52(4), p. 153–160, 2005.

FOX, L.K. **Mycoplasma mastitis: Causes, transmission, and control.** Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. Vol. 28(2), p. 225–237, 2012.

FRATINI, F.; CASELLA, S.; LEONARDI, M. *et al.* **Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis.** Fitoterapia. Vol. 96, p. 1-7, 2014.



FREY, Y.; RODRIGUEZ, J. P. THOMANN, A. *et al.* **Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative Staphylococci from bovine mastitis milk.** Journal of Dairy Science. Vol. 96(4), p. 2247–2257, 2013.

GARCIA-OCHOA, F.; , V. E.; CASAS, J. A. *et al.* **Xanthan gum: production, recovery, and properties.** Biotechnology Advances. Vol. 18(7), p. 549-579, 2000.

GAYSINSKY, S.; TAYLOR, T. M.; DAVIDSON, P. M. *et al.* **Antimicrobial efficacy of eugenol microemulsions in milk against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7.** Journal of Food Protection. Vol. 70(11), p. 2631-2637, 2007.

GILLESPIE, B. E.; HEADRICK, S. I.; BOONYAYATRA, S.; OLIVER, S. P. **Prevalence and persistence of coagulase-negative Staphylococcus species in three dairy research herds.** Veterinary Microbiology. Vol. 134(1-2), p.65-72, 2009.

GLICKSMAN, M. **Food Hydrocolloids.** 1ª Edição, Vol. 1. Flórida: CRC Press, 1982.

GODDEN, S. M.; ROYSTER, E.; KNAUER, W. *et al.* **Randomized noninferiority study evaluating the efficacy of a postmilking teat disinfectant for the prevention of naturally occurring intramammary infections.** Journal of Dairy Science. Vol. 99(5), p. 3675-3697, 2016.

GOMES, F.; HENRIQUES, M. **Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches.** Current Microbiology. Vol. 72(4), p. 377-382, 2016.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C. *et al.* **Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils.** Food Chemistry. Vol. 116(4), p. 982-989, 2009.

GUAN, W.; LI, S.; YAN, R. *et al.* **Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three extraction methods.** Food Chemistry. Vol. 101(4), p. 1575-1581, 2007.

GUO, J.; IWATA, H. **Risk assessment of triclosan in the global environment using a probabilistic approach.** Vol. 143, p. 111-119, 2017.

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. **Nanoemulsions: formation, properties and applications.** Vol. 12(11), p. 2826-2841, 2016.

HAFEZ, S. M.; ISMAEL, A. B.; MAHMOUD, M. B.; ELARABY, A. A. **Development of new strategy for non-antibiotic therapy: bovine lactoferrin has a potent antimicrobial and immunomodulator effects.** Advances in Infectious Diseases. Vol. 3(3), p. 185–192, 2013.

HAJIMONFAREDNEJAD, M.; NIMROUZI, M. HEYDARI, M. *et al.* **Insulin resistance improvement by cinnamon powder in polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind placebo controlled clinical trial.** Phytother Res. Vol. 32(2), p. 276-283, 2017.

HAJIMONFAREDNEJAD, M.; OSTOVAR, M.; RAEI, M. J. *et al.* **Cinnamon: A systematic review of adverse events.** Clinical Nutrition. 2018.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; OSTERAS, O.; HOGEVEEN, H. **Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review.** Veterinary Quarterly. Vol. 29(1), p. 18-31, 2007.

HAMEDI, H.; RAZAVI-ROHANI, S. M.; GANDOMI, H. **Combination effect of essential oils of some herbs with monolaurin on growth and survival of *Listeria monocytogenes* in culture media and cheese.** Journal of Food Processing and Preservation. Vol. 38(1), p. 304-310, 2014.

HEMLING, T. C.; HENDERSON, M. A.; STAPLEY, C. B. **Film-forming skin protectant compositions.** Reino Unido, patente GB2337521A, 1998.

HEREDIA-GUERRERO, J. A.; CESERACCIU, L.; GUZMAN-PUYOL, S. *et al.* **Antimicrobial, antioxidant, and waterproof RTV silicone-ethyl cellulose composites containing clove essential oil.** Carbohydrate Polymers. Vol. 192(15), p. 150-158, 2018.

HILLERTON, J. E. **Balancing mastitis and quality.** Proceedings of the British Mastitis Conference. Stonelerg, UK, p. 31-36, 1999.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

HOGAN, J. S.; GALTON, D. M.; HARMON, R. J. *et al.* **Protocols for evaluating efficacy of post-milking teat dips.** Journal of Dairy Science. Vol. 73(9), p. 2580–2585, 1990.

HOLMOY, I. H.; TOFT, N.; JORGENSEN, H. J. *et al.* **Latent class analysis of real time qPCR and bacteriological culturing for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* in cow composite milk samples.** Preventive Veterinary Medicine. Vol. 154, p. 119-123, 2018.

HOSSAIN, M. A.; AL-HASHMI, R. A.; WELI, A. M. *et al.* **Constituents of the essential oil from different brands of *Syzygium caryophyllatum* L. by gas chromatography-mass spectrometry.** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Vol. 2(3), p. S1446-S1449, 2012.

HSOUNA, A. B.; TRIGUI, M.; MANSOUR, R. B. *et al.* **Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat.** International Journal of Food Microbiology. Vol. 148(1), p. 66-72, 2011.

HUANG, Z.; LIU, X.; JIA, S. **Antimicrobial effects of cinnamon bark oil on microbial composition and quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during chilled storage.** Food Control. Vol. 82, p. 316-324, 2017.

HWANG, Y. Y.; RAMALINGAM, K.; BIENEK, D. R. *et al.* **Antimicrobial Activity of Nanoemulsion in Combination with Cetylpyridinium Chloride in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 57(8), p. 3568-3575, 2013.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. **Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with**

**food matrix components.** *Frontiers in Microbiology*. Vol. 3(12), p. 1-24, 2012. *J. Biotechnol.* Vol. 10(52), p. 10795–10797, 2011.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. **Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system.** *3 Biotech.* Vol. 5(2), p. 123–127, 2015.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J. M. **Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* Vol. 51(6), p. 547–562, 2011.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I. *et al.* **Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 54(17), p. 6303-6307, 2006.

JOSEPH, B.; SUJATHA, S. **Bioactive compounds and its autochthonous microbial activities of extract and clove oil (*Syzygium aromaticum* L.) on some food borne pathogens.** *Asian Journal of Biological Sciences*. Vo. 4(1), p. 35–43, 2011.

JU, J.; XU, X.; XIE, Y. *et al.* **Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods.** *Food Chemistry*. Vol. 240, p. 850-855, 2018.

KEEFE, G. P. ***Streptococcus agalactiae* mastitis: A review.** *Canadian Veterinary Journal*. Vol. 38(7), p. 429–437, 1997.

KEEFE, G. **Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis.** *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*. Vol. 28(2), p. 203–216, 2012.

KENNEDY, J. F.; BRADSHAW, I. J. **Production, properties and applications of xanthan.** *Progress in Industrial Microbiology*. Vol. 19, p. 319-371, 1984.

KHALEQUE, M. A.; KEYA, C. A.; HASAN, K. N. *et al.* **Use of cloves and cinnamon essential oil to inactivate *Listeria monocytogenes* in ground beef at freezing and refrigeration temperatures.** *LWT-Food Science and Technology*. Vol. 74, p. 219–223, 2016.

KINTZIOS, S. E. **Oregano**. In: PETER, K. V. **Handbook of herbs and spice**. Vol. 3. Noth America: Woodhead Publishing Ltd, 2004.

KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; DARDIOTI, A. *et al.* **Autumn essential oils of Greek oregano**. *Phytochemistry*. Vol. 44(5), p. 883–886, 1997.

KSOURI, S.; DJEBIR, S.; BENTORKI, A. A. *et al.* **Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. Against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis**. *Journal de Mycologie Médicale*. Vol. 27(2), p. 245-249, 2017.

KULKARNI, A. G.; KALIWAL, B. B. **Bovine mastitis: a review**. *International Journal of Recent Scientific Research*, Vol. 4(5), p. 543-548, 2013.

LEFÈVRE, P.-C.; JEAN, J.; RENÉ, C.; GERRIT, U. **Infectious and Parasitic Diseases of Livestock**. Lavoisier, 2010.

LEONG, T. S. H.; WOOSTER, T. J.; KENTISH, S. E.; ASHOKKUMAR, M. **Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification**, *Ultrasonics Sonochemistry*. Vol. 16(6), p. 721-727, 2009.

LI, Y.; KUAN, Y.; LEE, T. *et al.* **Assessment of the cytotoxicity of chlorhexidine by employing an in vitro mammalian test system**. *Journal of Dental Sciences*. Vol. 9(2), p. 130-135, 2014.

LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems**. Vol. 2. Nova York: M. Dekker, 1998

LINDEMAN, C. J.; PORTIS, E.; JOHANSEN, L. *et al.* **Susceptibility to antimicrobial agents among bovine mastitis pathogens isolated from North American dairy cattle, 2002–2010**. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Vol. 25(5), p. 581–591, 2013.

LONGO, F.; SALAT, O.; VAN GOOL, F. **Incidence of clinical mastitis in French dairy herds, epidemiological data and economic costs**. *Folia Vet*. Vol. 45, p. 45–46, 2001.

- LOOSEMORE, M. J. **Germicidal teat dip composition**. Estados Unidos, patente US5641498A, 1995.
- LU, W.; HUANG, D.; WANG, C. R. *et al.* **Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil**. Journal of Food and Drug Analysis. Vol. 26(1), p. 82-89, 2018.
- LU, Z.; JIA, Q.; WANG, R. *et al.* **Hypoglycemic activities of A- and B-type procyanidin oligomer-rich extracts from different Cinnamon barks**. Phytomedicine. Vol. 18(4), p. 298-302, 2011.
- LYSNYANSKY, I.; FREED, M.; ROSALES, R. S. *et al.* **An overview of *Mycoplasma bovis* mastitis in Israel (2004–2014)**. Veterinary Journal. Vol. 207, p. 180-183, 2016.
- MAA, Y. F.; HSU, C. C. **Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification**. Pharmaceutical Development and Technology. Vol. 4(2), p. 233–240, 1999.
- MAGALDI, S.; MATA-ESSAYAG, S.; DE CAPRILES, C. H. *et al.* **Well diffusion for antifungal susceptibility testing**. International Journal of Infectious Diseases. Vol. 8(1), p. 39-45, 2004.
- MAKRI, E. A.; DOXASTAKIS, G. I. **Study of emulsions stabilized with *Phaseolus vulgaris* or *Phaseolus coccineus* with the addition of Arabic gum, locust bean gum and xanthan gum**. Food Hydrocolloids. Vol. 20(8), p. 1141-1152, 2006.
- MANSO, S.; CACHO-NERIN, F.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. **Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging**. Food Control. Vol. 30(2), p. 370-378, 2013.
- MARGATHO, L. F. F.; PEDRINI, S. C. B.; CURCI, V. C. M. **Mastite bovina e o uso de antissépticos**. Pesquisa e Tecnologia. Vol. 11(1), 2014.
- MASON, T. G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. **Nanoemulsions: Formation, structure, and physical**

**properties.** Journal of Physics Condensed Matter. Vol. 18(41), 2006.

MASOTTI, V.; JUTEAU, F.; BESSIÈRE, J. M.; VIANO, J. **Seasonal and Phenological Variations of the Essential Oil from the Narrow Endemic Species *Artemisia molinieri* and Its Biological Activities.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 51(24), p. 7115-7121, 2003.

McCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques.** 3ª Edição. CRC Press, 2015.

McCLEMENTS, D. J. **Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance.** Soft Matter. Vol. 7, p. 2297–2316, 2011.

McCLEMENTS, D. J.; RAO, J. **Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Vol. 51(4), p. 285–330, 2011.

McDOUGALL, S.; PARKER, K. I.; HEUER, C.; COMPTON, C. W. R. **A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies.** Veterinary Microbiology. Vol. 134(1-2), p. 177-185, 2009.

McDOUGALL, S.; PARKINSON, T. J.; LEYLAND, M. *et al.* **Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cows' milk.** Journal of Dairy Science. Vol. 87(7), p. 2062–2072, 2004.

MEIN, G. A.; FRANCESCA, N.; MORGAN, W. F. *et al.* **Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors.** Artigo escrito para AABP-NMC International Symposium on Mastitis and Milk Quality em Vancouver, Canadá, 2001.

MENON, K. V.; GARG, S. R. **Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese.** Food Microbiology. Vol. 18(6), p. 647–650, 2001.

MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P.; HAMID, N. S. A.; YUSOF, S. **Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on  $\zeta$ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage**

**emulsion.** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. Vol. 315(1-3), p. 47-56, 2008.

MIYAZAWA, M.; HASHIMOTO, Y.; TANIGUCHI, Y.; KUBOTA, K. **Headspace constituents of the tree remain of *Cinnamomum camphora*.** Nat. Prod. Lett. Vol. 15(1), p. 63-9, 2001.

MIYAZAWA, M.; HISAMA, M. **Suppression of chemical mutagen induced SOS response by alkylphenols from clove (*Syzygium aromaticum*) in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 umu test.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 49(8), p. 4019–4025, 2001.

MOHAMED, B. J.; ABDLHUSSAIN, R. **Inhibitory effect of Cinnamon cassia against *Candida albicans* growth in vitro and in vivo.** Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences. Vol. 22(9), 2014.

MORAES-LOVISON, M.; MAROSTEGAN, L. F. P.; PERES, M. S. *et al.* **Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté.** LWT- Food Science and Technology. Vol. 77, p. 233-240, 2017.

MULLA, M.; AHMED, J.; AL-ATTAR, H. *et al.* **Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging.** Food Control. Vol. 73(Part B), p. 663-671, 2017.

MULLER, E. E. **Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite.** In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2., 2002, Maringá. Anais... Maringá: UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002. p.206-217.

MYTLE, N.; ANDERSON, G. L.; DOYLE, M. P.; SMITH, M. A. **Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters.** Food Control. Vol. 17(2), p. 102–107, 2006.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D. ***Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis and control.** Res. Vet. Sci. Vol. 74(2), p. 105–112, 2003.



NICHOLAS, R. A. J.; FOX, L. K.; LYSNYANSKY, I. **Mycoplasma mastitis in cattle: to cull or not to cull**. The Veterinary Journal. Vol. 216, p. 147-147, 2016.

NIELSEN, C. **Economic impact of mastitis in dairy cow**. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Sueca de Ciências Agrárias, Upsália, 2009.

NISHINARI, K.; DOI, E. **Food Hydrocolloids: structures, properties and functions**. New York: Plenum Press, 1993.

NMC - National Mastitis Council. **Current Concepts of Bovine Mastitis**. 4ª Edição. Madison: NMC, 1996.

NMC - National Mastitis Council. **Recommended Mastitis Control Program**. North American version, p. 2. Disponível em: <<http://www.dairysolutions.nl/documenten/NMC%20mastitis%20program.pdf>>. Acesso: 29/08/2018.

NOWAK, K.; OGONOWSKI, J.; JAWORSKA, M.; GRZESIK, K. **Clove oil – properties and applications**. CHEMIK. Vol. 66(2), p. 145-152, 2012.

OLDE RIEKERINK, R. G. M.; BARKEMA, H. W.; SCHOLL, D. T. *et al.* **Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms**. Preventive Veterinary Medicine. Vol. 97(1), p. 20–28, 2010.

OLIVEIRA, C. S. F.; HOGEVEEN, H.; BOTELHO, A. M. *et al.* **Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle**. Preventive Veterinary Medicine. Vol. 121(3-4), p. 297-305, 2015.

OLIVER, S. P. **Frequency of isolation of environmental mastitis-causing pathogen and incidence of new intramammary infections during the nonlactating period**. American Journal of Veterinary Research. Vol. 49(11), p. 1789–1793, 1988.

OSTERÁS, O.; HOGEVEEN, H.; SINGH, D. K.; LESLIE, K. E. **Economic consequences of mastitis**. **Bulletin of the International Dairy Federation 394/2005**. Bélgica: IDF, 2005.

PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, V. **Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris***. Journal of Food Engineering. Vol. 106(1), p. 1-12, 2011.

PALLOS, F. M.; HEMLING, T. C.; WONG, D. W. S.; PAVLATH, A. E. **Stable, germicidal film-forming teat-dip solutions**. Estados Unidos, patente US5776479A, 1996.

PANKEY, J. W.; EBERHART, R. J.; CUMMING, A. L. *et al.* **Uptake on postmilking teat antisepsis**. Journal of Dairy Science. Vol. 67(6), p. 1336- 1353, 1984.

PASSCHYN, P.; PIEPERS, S.; De MEULEMEESTER, L. *et al.* **Between herd prevalence of *Mycoplasma bovis* in bulk milk in Flanders, Belgium**. Research in Veterinary Science. Vol. 92(2), p. 219-220, 2012.

PENRY, J.; MALMO, J.; MEIN, G.; MORTON, J. **Molecular testing of milk: Interpretation and application in Australian dairy herds**. National Mastitis Council Inc., Madison, WI, 2014.

PIEPERS, S.; De MEULEMEESTER, L.; De KRUIF, A. *et al.* **Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium**. Journal of Dairy Research. Vol. 74(4), p. 478–483, 2007.

PODLEWSKI, J. K.; CHALIBOGOWSKA-PODLEWSKA, A. **Leki współczesnej terapii**. Medical Tribune Polska, Warszawa, 2010.

POTHMANN, H.; SPERGSER, J.; ELMER, J. *et al.* **Severe *Mycoplasma bovis* outbreak in an Austrian dairy herd**. J. Vet. Diagn. Invest. Vol. 27(6), p. 777–783, 2015.

POURGHOLAMI, M. H.; KAMALINEJAD, M.; JAVADI, M. *et al.* **Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice**. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 64(2), p. 167–171, 1999.

PUGLIESE, P. T. **Bovine teat dip**. Estados Unidos, patente US4049830A, 1974.

QADIR, A.; FAIYAZUDDIN, M. D.; HUSSAIN, M. D. T. **Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion.** Journal of Molecular Liquids. Vol. 214, p. 7-18, 2016.

QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Porto Alegre: Artmed, 2005.

QUIRK, T. E. **Coagulase-negative Staphylococci mastitis management.** Dissertação de Mestrado em Ciência dos Animais – Departamento de Ciência dos animais – Universidade do Estado de Washington, Washington, 2010.

RADAELLI, M.; DA SILVA, B. P.; WEIDLICH, L. **Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*.** Brazilian Journal of Microbiology. Vol. 47(2), p. 424-430, 2016.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. *et al.* **Clínica Veterinária Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos.** 9ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RAINARD, P. **Tackling mastitis in dairy cows.** Nature Biotechnology. Vol. 23(4), p. 430–432, 2005.

RAO, P. V.; GAN, S. H. **Cinnamon: A multifaceted medicinal plant.** Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2014.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. **Doença de ruminantes e equinos.** Vol. 1, 2ª Edição. São Paulo: Varela, 2001.

ROCKS, J. K. **Xanthan gum.** Food Technology. Vol. 25(5), p. 476-483, 1971.

ROYSTER, E.; WAGNER, S. **Treatment of mastitis in cattle.** Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. Vol. 31(1), p. 17–46, 2015.

RUEGG, P. L. **New perspectives in udder health management.** Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. Vol. 28(2), p. 149–163, 2012.

RUEGG, P. L.; ERSKINE, R. J. **Mastitis caused by other organisms.** In: SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine: Diseases of Horses, Cattle, Sheep and Goats.** 5ª Ed., St. Louis, MO, 2015.

SAINI, V.; McCLURE, J. T.; LÉGER, D.; *et al.* **Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms.** Journal of Dairy Science. Vol. 95(8), p. 4319–4332, 2012.

SAKAI, T.; KAMOGAWA, K.; NISHIYAMA, K. *et al.* **Molecular Diffusion of Oil/Water Emulsions in Surfactant-Free Conditions.** *Lagmuir.* Vol. 18, p. 1985-1990, 2002.

SANKAR, P. **New Therapeutic Strategies to Control and Treatment of Bovine Mastitis.** Veterinary Medicine. Vol. 1(2), p. 1-2, 2016.

SANTOS, J. C.; FILHO, C. D. C.; BARROS, T. F.; GUIMARÃES, A. G. **Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole.** Semina: Ciências Agrárias. Vol. 32(4), p. 1557-1564, 2011.

SANTOS, M. V. dos. **Ferramenta para diagnóstico da mastite.** Inforleite, 2013.

SANTURIO, D. F.; DA COSTA, M. M.; MABONI, G. *et al.* **Antimicrobial activity of spice essential oils against Escherichia coli strains isolated from poultry and cattle.** Ciência Rural. Vol. 41(6), 2011.

SARKER, D. K. **Engineering of nanoemulsions for drug delivery.** Curr. Drug Deliv. Vol. 2(4), p. 297-210, 2005.

SARTORI, L. C. A.; SANTOS, R. C.; MARIN, J. M. **Identificação de espécies de Candida isoladas de vacas com mastite em quatro estados Brasileiros.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária. Vol. 66(5), 2014.

SAVARDEKAR, P.; BAJAJ, A. **Nanoemulsion – a review.** International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry. Vol. 6(2), p. 312-322, 2016.

SCARTAZZINI, L. **Estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de menta incorporado em coberturas comestíveis à base de gelatina para aplicação em morangos.** Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

SCHROEDER, J. W. **Bovine mastitis and milking management. Mastitis Control Program – AS1129.** North Dakota State University, Fargo, 2012.

SCHUKKEN, Y. H.; GONZÁLEZ, R. N.; TIKOFSKY, L. L. *et al.* **CNS mastitis: Nothing to worry about?** Veterinary Microbiology. Vol. 134(1-2), p. 9-14, 2009.

SENANAYAKE, U. M.; LEE, T. H.; WILLS, R. B. H. **Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils.** J. Agric. Food Chem. Vol. 26(4), p. 822–824, 1978.

SETYA, S.; TALEGAONKAR, S.; RAZDAN, B. K. **Nanoemulsions: Formulation Methods and Stability Aspects.** World Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 3(2), p. 2214-2228, 2014.

SHAMSARA, O.; MUHIDINOV, Z. K.; JAFARI, S. M. *et al.* **Effect of ultrasonication, pH and heating on stability of apricot gum-lactoglobuline two layer nanoemulsions.** Int. J. Biol. Macromol. Vol. 81, p. 1019–1025, 2015.

SHARIF, A.; MUHAMMAD, G. **Mastitis control in dairy animals.** Pakistan Vet. J. Vol. 29(3), p. 145-148, 2009.

SHARMA, B.R.; NARESH, L.; DHULDHOYA, N. C. **Xanthan Gum - A Boon to Food Industry.** Food Promotion Chronicle. Vol. 1(5), p. 27-30, 2006.

SHEN, Y.; JIA, L. N.; HONMA, N. *et al.* **Beneficial effects of cinnamon on the metabolic syndrome, inflammation, and pain, and mechanisms underlying these effects: a review.** J. Trad. Complement. Med. Vol. 2(1), p. 27-32, 2012.

SHPIGEL, N.; WINKLER, M.; ZIV, G.; SARAN, A. **Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in**

**Israeli dairy herds.** Preventive Veterinary Medicine. 35(1), p. 1–9, 1998.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. Â.; VICENTE, A. A. **Nanoemulsions for food applications: development and characterization.** Food and Bioprocess Technology. Vol. 5(3), p. 854-867, 2012.

SILVA, M. T. N.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N. *et al.* **Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de Staphylococcus aureus e Escherichia coli isoladas de casos clínicos humanos.** Rev. bras. plantas med. Vol. 11(3), 2009.

SIMIC, A.; SOKOVIC, M. D.; RISTIC, M. *et al.* **The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities.** Phytother Res. Vol. 18(9), p. 713-7, 2004.

SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K. *et al.* **Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery.** Journal of Controlled Release. Vol. 252, p. 28-49, 2017.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J-T.; L'ALLORET, F. **Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products.** Adv. Colloid Interface Sci. Vol. 108-109, p. 145-149, 2004.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E. M. C.; SANTURIO, J. M. **Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras.** Ciência Rural. Vol. 39(1), p. 282-290, 2009.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L. BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

STEENEVELD, W.; VAN WERVEN, T.; BARKEMA, H. W.; HOGEVEEN, H. **Cow-specific treatment of clinical mastitis: an economic approach.** Journal of Dairy Science. Vol. 94(1), p. 174–188, 2011.

STOKKE, B. T.; CHRISTENSEN, B. E. **Release of disordered xanthan oligomers upon partial acid hydrolysis of double-stranded xanthan.** Food Hydrocolloids. Vol. 10(1), p. 83-89, 1996.

SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. **The bioactivity and toxicological actions of carvacrol.** Crit. Rev. Food Sci. Nutr. Vol. 55(3), p. 304-318, 2015.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos.** 11ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SWORN, G. **Xanthan Gum.** In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of Hydrocolloids.** 2ª Edição. Woodhead Publishing, 2009.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. **Formation and stability of nano-emulsions.** Advances in Colloid and Interface Science. Vol. 108, p. 303–318, 2004.

THAKUR, N.; GARG, G.; SHARMA, P. K.; KUMAR, N. **Nanoemulsions: A Review on Various Pharmaceutical Application.** Global Journal of Pharmacology. Vol. 6(3), p. 222-225, 2012.

THOMAS, J.; DUETHI, P. P. **Cinnamon.** In: PETER, K. V. **Handbook of herbs and spice.** Vol. 2. Noth America: Woodhead Publishing Ltd, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. J. E. **Behaviour of Listeria monocytogenes and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5° C.** Journal of Applied Microbiology. Vol. 89(6), p. 901–909, 2000.

TUNG, Y. T.; CHUA, M. T.; WANG, S. Y.; CHANG, S. T. **Antiinflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs.** Bioresource Tech. Vol. 99(9), p. 3908–3913, 2008.

TUNG, Y. T.; YEN, P. L.; LIN, C. Y.; CHANG, S. T. **Antiinflammatory activities of essential oils and their constituents from different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves.** Pharma Biol. Vol. 48(10), p. 1130–1136, 2010.

TZORTZAKIS, N. G. **Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce.** Innovative Food Science and Emerging Technologies. Vol. 10(1), p. 97-102, 2009.

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

United State Department of Agriculture (USDA); Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS). **Prevalence of contagious mastitis pathogens on U.S. dairy operations, 2007.** Vet. Serv.: Center Epidemiol. Anim. Health, Fort Collins, CO, 2008.

VANGALAPATI, M.; SATYA, N. S.; PRAKASH, D. S.; AVANIGADDA, S. **A review on pharmacological activities and clinical effects of cinnamon species.** Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. Vol. 3(1), p. 653–663, 2012.

VIVAR-QUINTANA, A. M.; De La MANO, E. B.; REVILLA, I. **Relationship between somatic cell count and the properties yoghurt made from ewes' milk.** International Dairy Journal. Vol. 16(3), p. 262-267, 2006.

WANG, Y.; ZHANG, Y.; SHI, Y. **Antibacterial effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil on *Porphyromonas gingivalis*.** Microbial Pathogenesis. Vol. 116, p. 26-32, 2018.

WATTS, J. L. **Etiological agents of bovine mastitis.** Veterinary Microbiology. Vol. 16(1), p. 41-66, 1988.

WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F. B. *et al.* **Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows.** J. Am. Vet. Med. Assoc. Vol. 219(7), p. 976–981, 2001.

WHITE, D. G.; McDERMOTT, P. F. **Emergence and transfer of antibiotic resistance.** Journal of Dairy Science. Vol. 84, p. 151–155, 2001.

WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; HERTL, J. *et al.* **Effect of clinical mastitis on the lactation curve: a mixed model estimation using**



**daily milk weights.** Journal of Dairy Science. Vol. 87(7), p. 2073–2084, 2004.

WHO - World Health Organization. **WHO monographs on selected medicinal plants.** Vol. 1. Geneva: World Health Organization, 1999.

WOOSTER, T. J.; GOLDING, M.; SANGUANSRI, P. **Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability.** Lagmuir. Vol. 24, p. 12758-12765, 2008.

WU, D.; LU, R.; CHEN, Y. *et al.* **Study of cross-resistance mediated by antibiotics, chlorhexidine and Rhizoma coptidis in *Staphylococcus aureus*.** Journal of Global Antimicrobial Resistance. Vol. 7, p. 61-66, 2016.

YALKOWSKY, S. H.; HE, Y.; JAIND, P. **Handbook of Aqueous Solubility Data.** 2ª Edição. Boca Raton: CRC Press, 2010.

YANG, X. Q.; ZHENG, H.; YE, Q. *et al.* **Essential oil of cinnamon exerts anticancer activity against head and neck squamous cell carcinoma via attenuating epidermal growth factor receptor – tyrosine kinase.** J. Buon. Vol. 20(6), p. 1518–1525, 2015.

YILDIRIM, S. T.; OZTOP, M. H.; SOYER, Y. **Cinnamon oil nanoemulsions by spontaneous emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity.** LWT - Food Science and Technology. Vol. 84, p. 122-128, 2017.

YOUSEFI ASLI, M.; KHORSHIDIAN, N.; MORTAZAVIAM, A. M.; HOSSEINI, H. **A review on the impact of herbal extracts and essential oils on viability of probiotics in fermented milks.** Current Nutrition and Food Science. Vol. 13(1), p. 6-15, 2017.

ZARAGOZA, C. S.; OLIVARES, R. A.; WATTY, A. E. *et al.* **Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau.** Revista Iberoamericana de Micología. Vol. 28(2), p. 79-82, 2011.

ZHANG, S.; MIN, Z.; FANG, Z.; LIU, Y. **Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil**

**nanoemulsions.** LWT - Food Science and Technology. Vol. 75, p. 316-322, 2017.

ZHANG, Y.; LIU, X.; WANG, Y. *et al.* **Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.** Food Control. Vol. 59, p. 282-289, 2016.

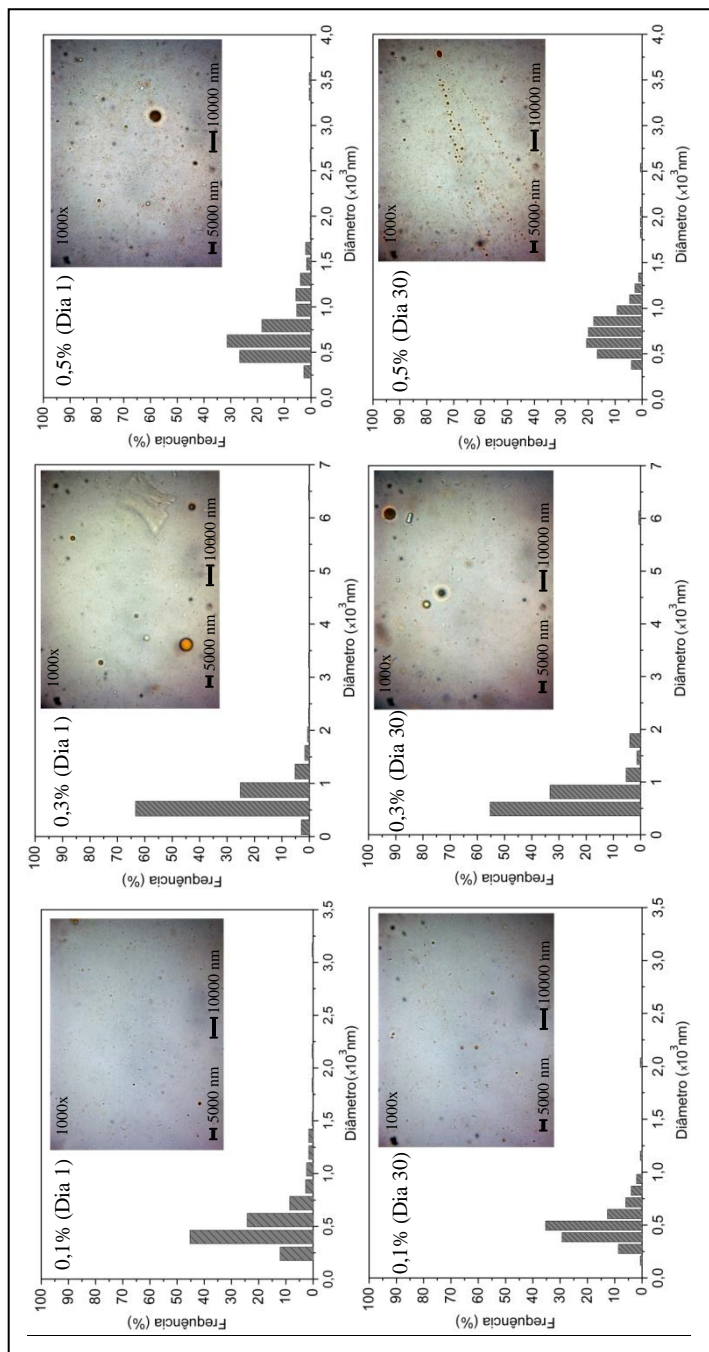
ZHANG, Z.; McCLEMENTS, D. J. Overview of Nanoemulsion Properties: Stability, Rheology, and Appearance. In: JAFARI; McCLEMENTS. **Nanoemulsion: Formulation, Applications, and Characterization.** p. 21-49; 2018.

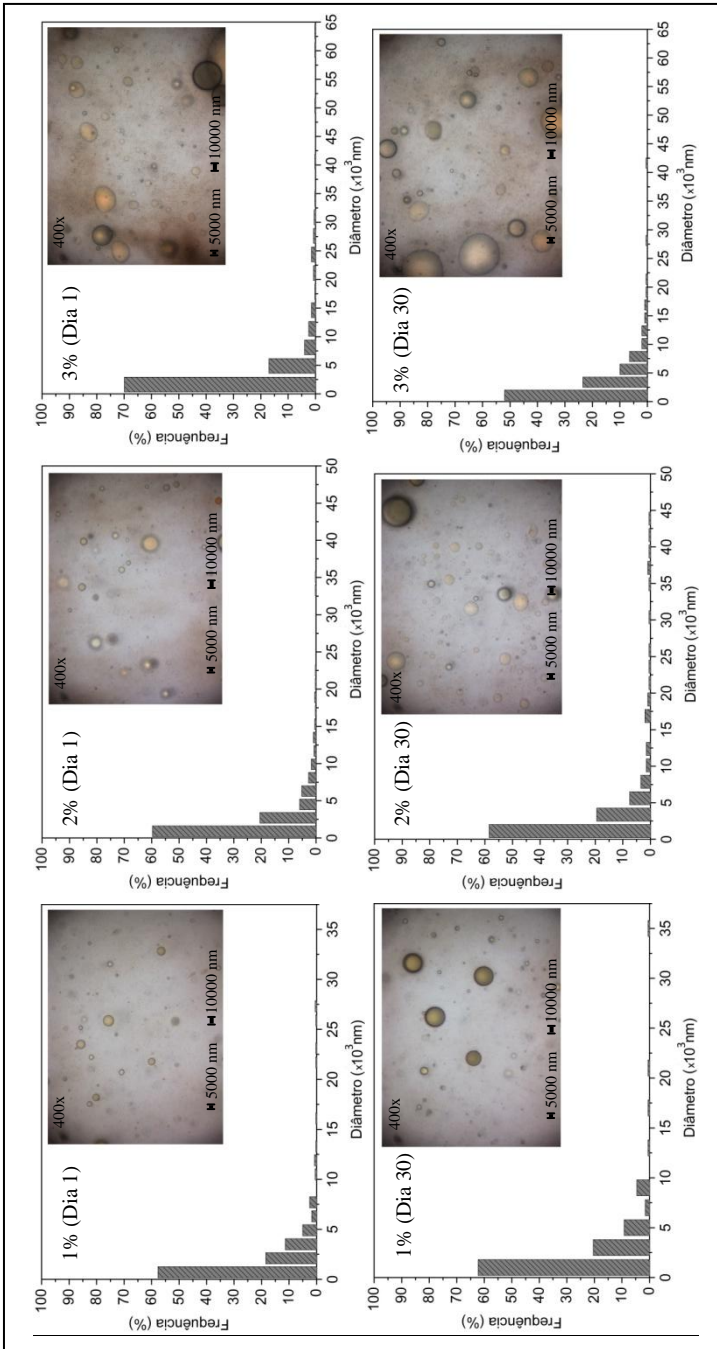
ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. **Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents.** Journal of Natural Products. Vol. 55(7), p. 999–1003, 1992.

ZHOU, Y.; SUN, S.; BEI, W. *et al.* **Preparation and antimicrobial activity of oregano essential oil Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals.** International Journal of Biological Macromolecules. Vol. 112, p. 7-13, 2018.

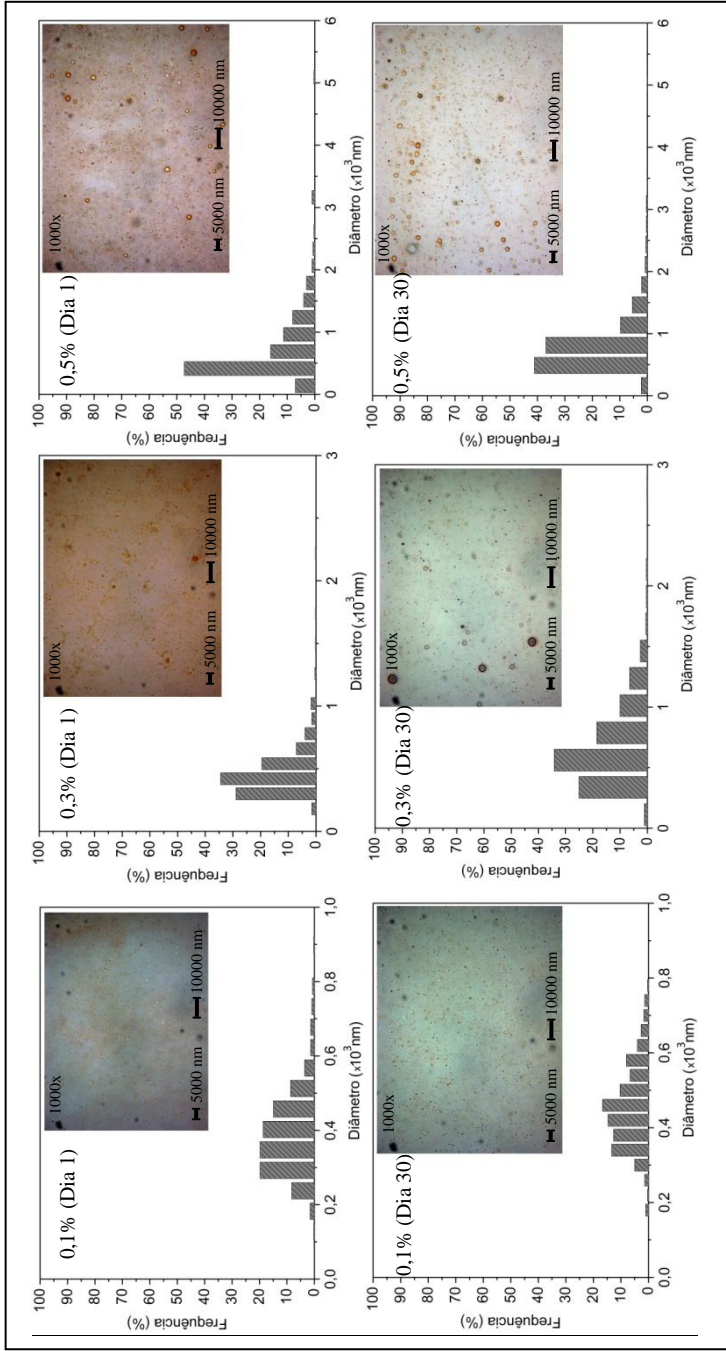
ZHU, H.; DU, M.; FOX, L.; ZHU, M. **Bactericidal effects of Cinnamon cassia oil against bovine mastitis bacterial pathogens.** Food Control. Vol. 66, p. 291-299, 2016.

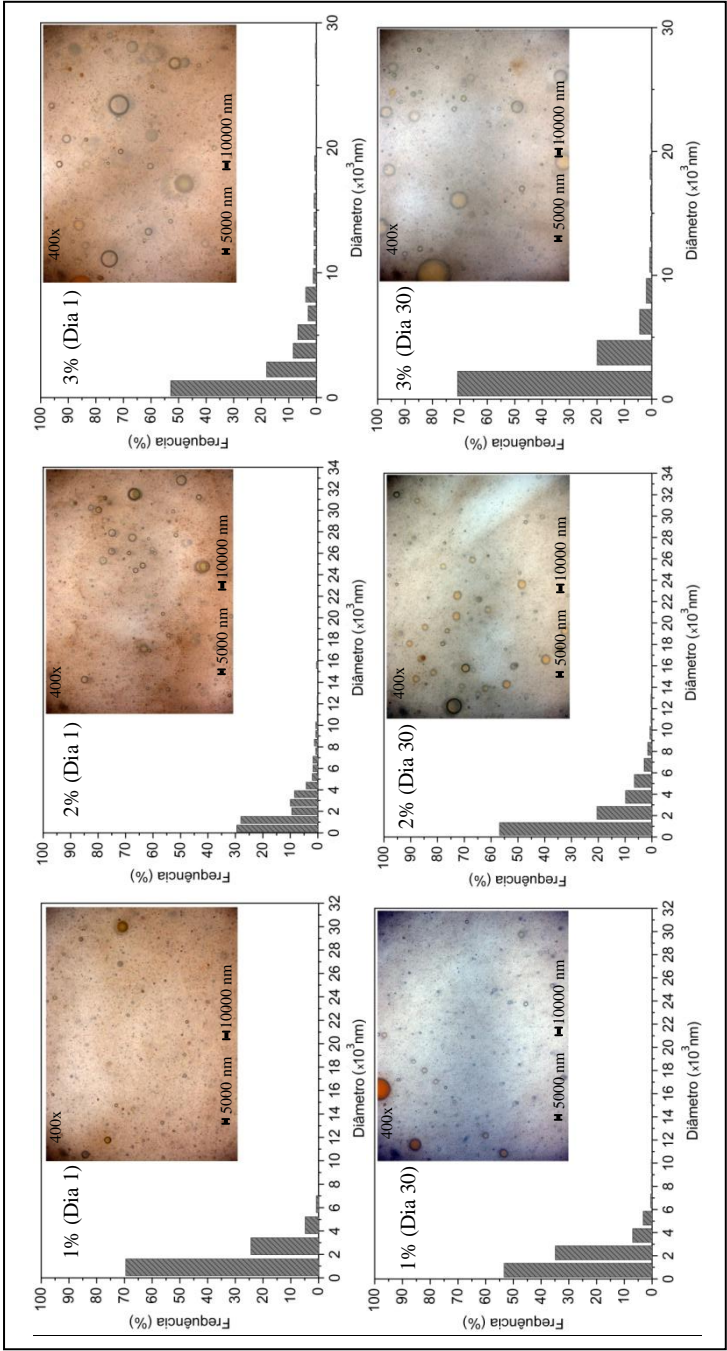
**APÊNDICE A - Distribuição das gotas de óleo essencial de cravo incorporado nas SFE no dia 1 e após 30 dias.**



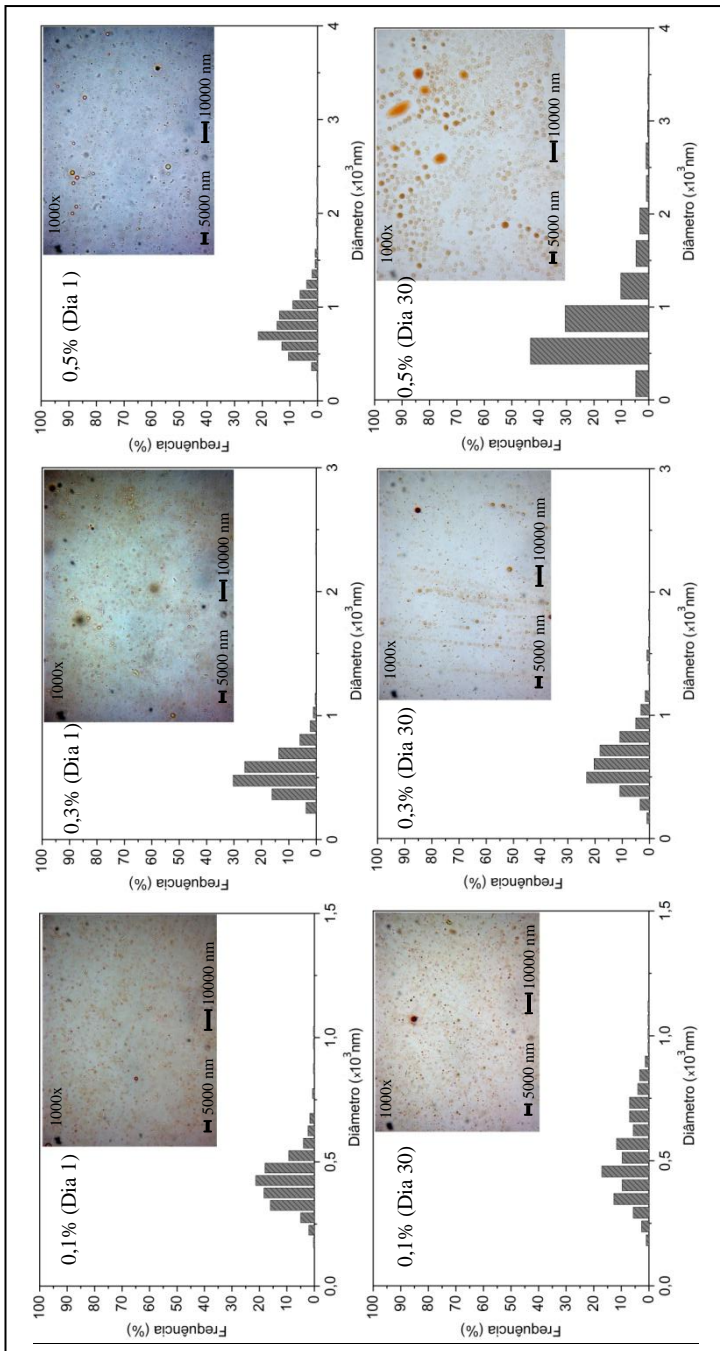


**APÊNDICE B - Distribuição das gotas de óleo essencial de canela incorporado nas SFE no dia 1 e após 30 dias.**

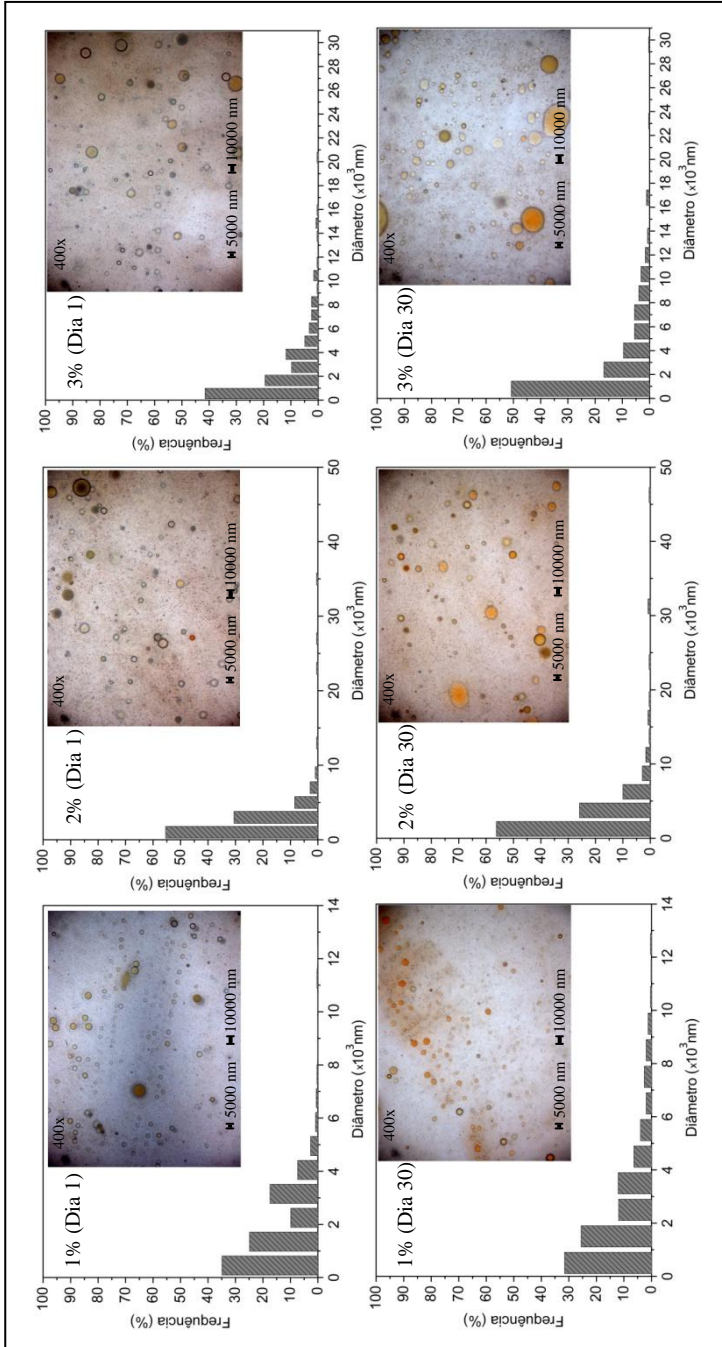




**APÊNDICE C - Distribuição das gotas de óleo essencial incorporado nas SFE no dia 1 e após 30 dias.**

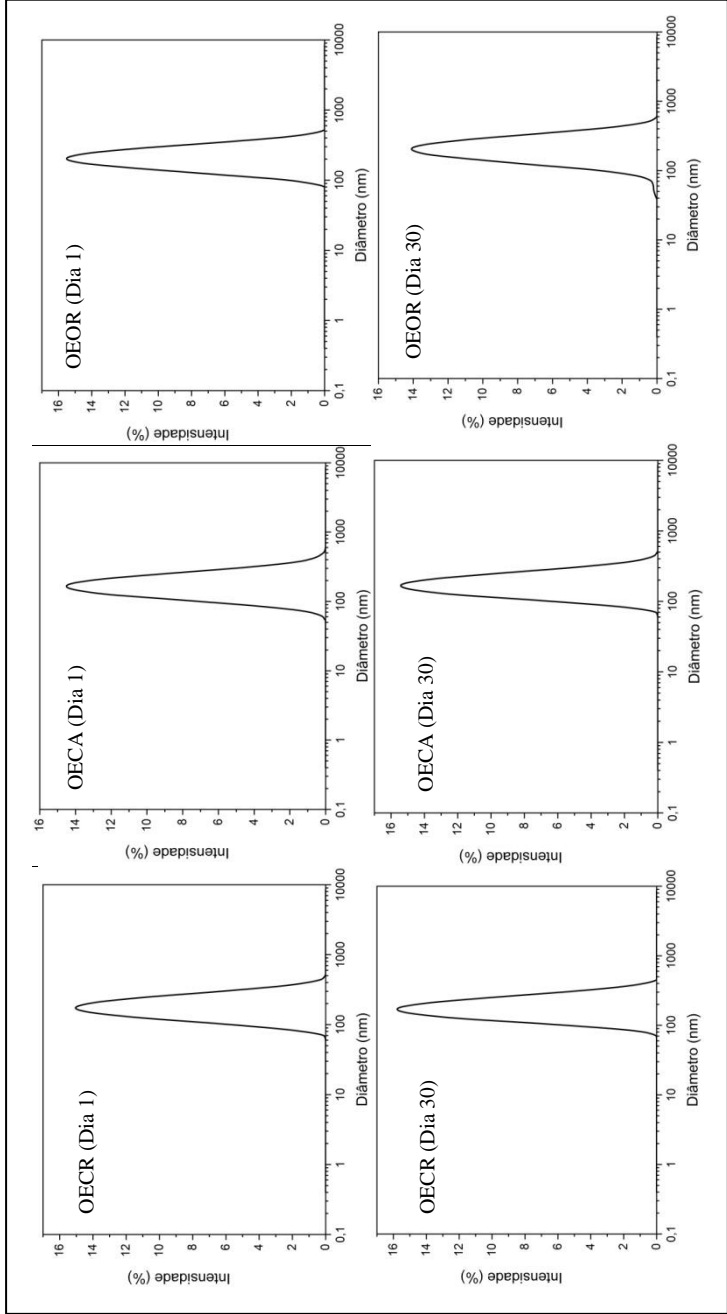




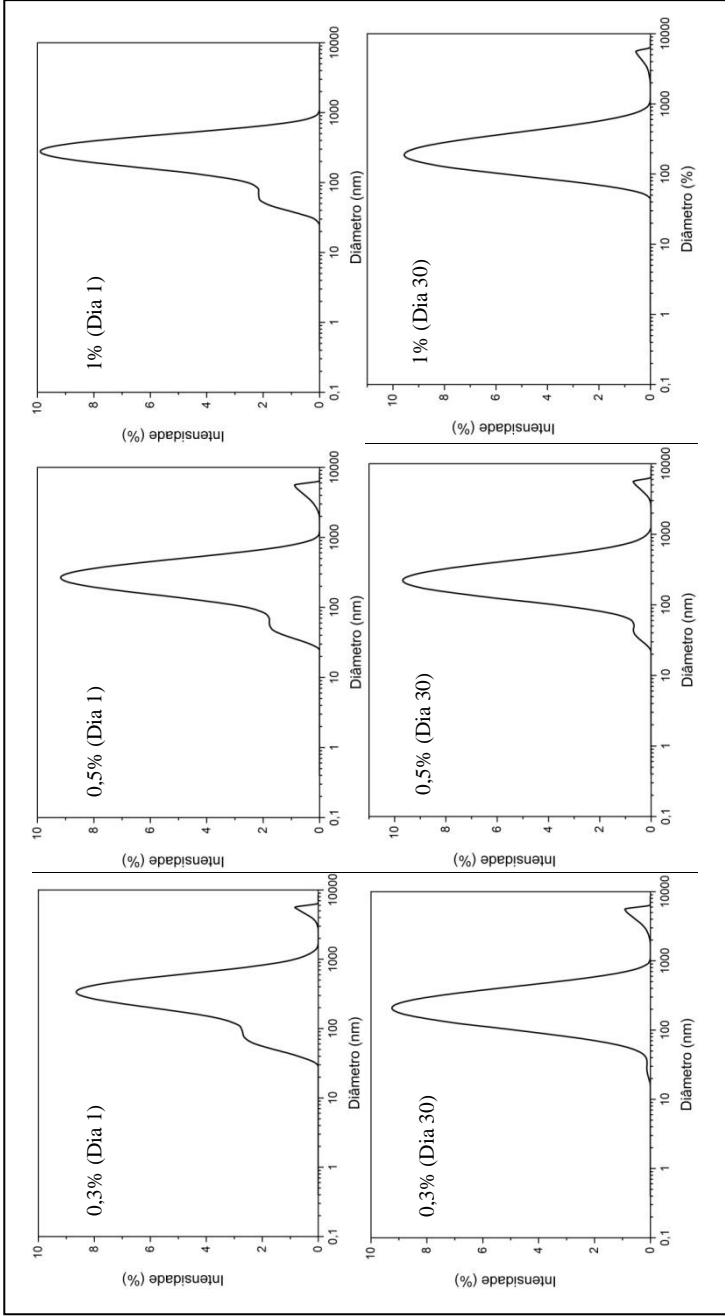


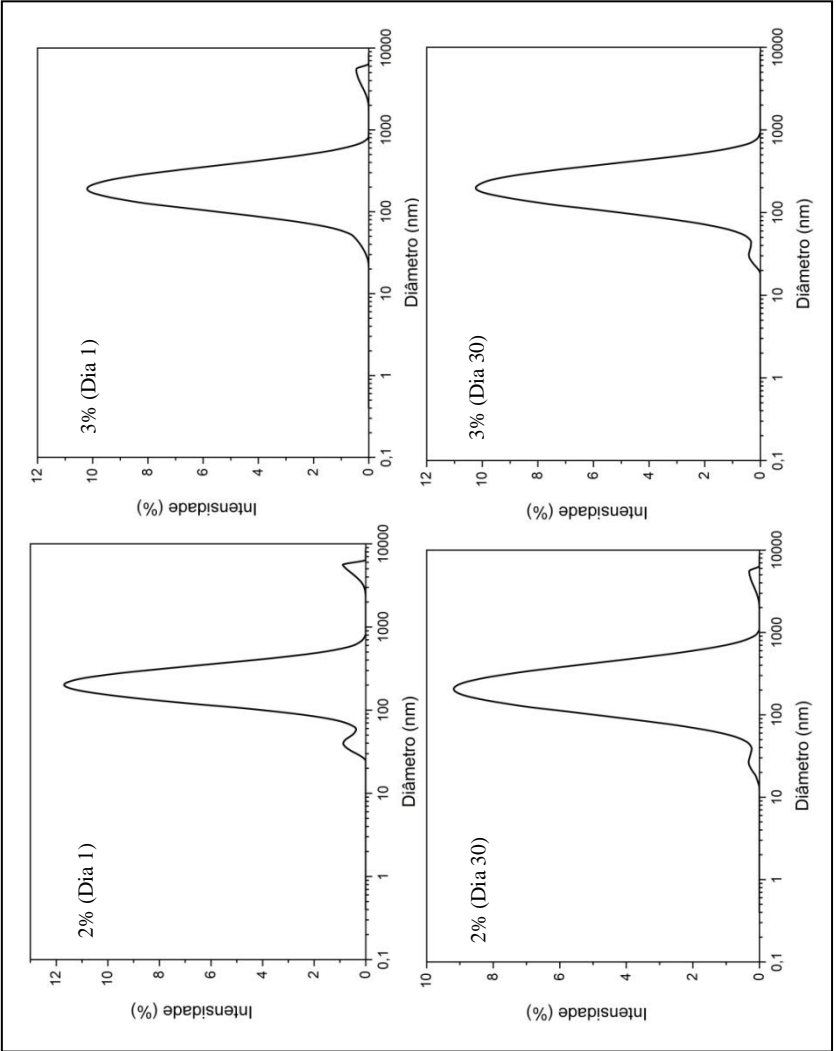


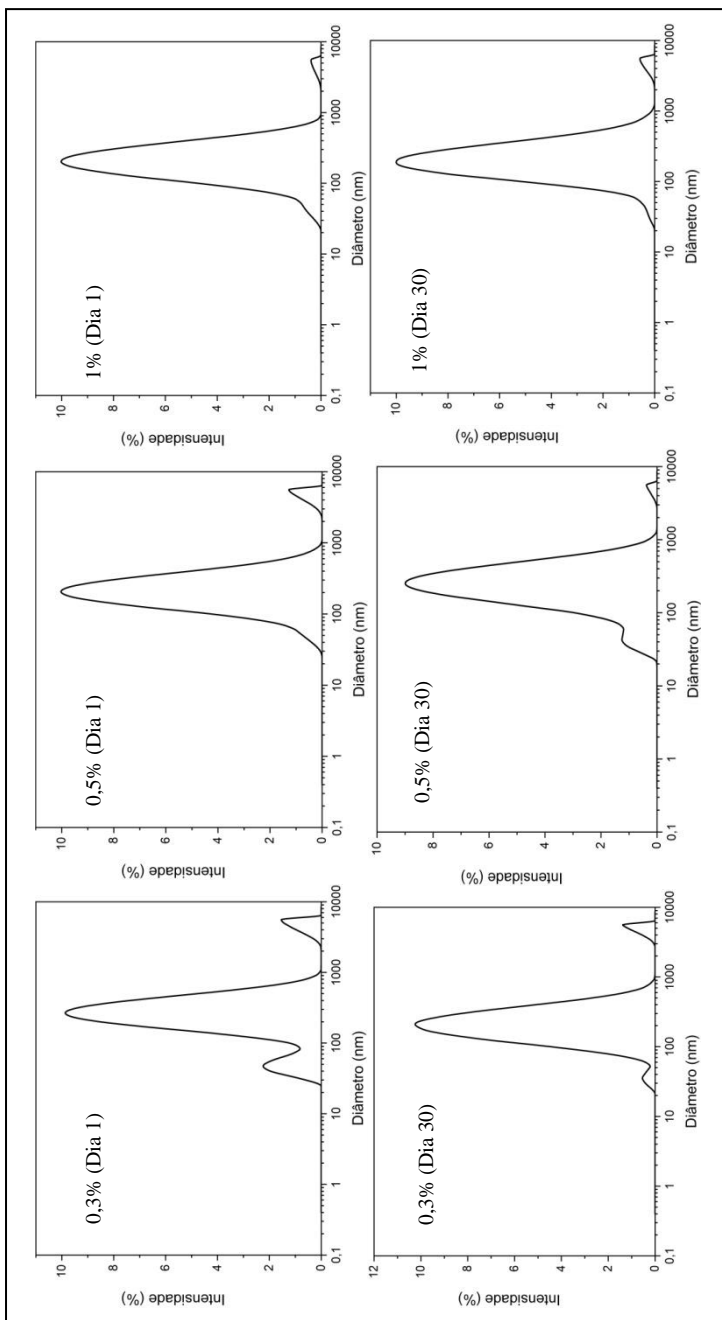
**APÊNDICE D - Distribuição das gotas de óleo essencial da nanoemulsão no dia 1 e após 30 dias.**

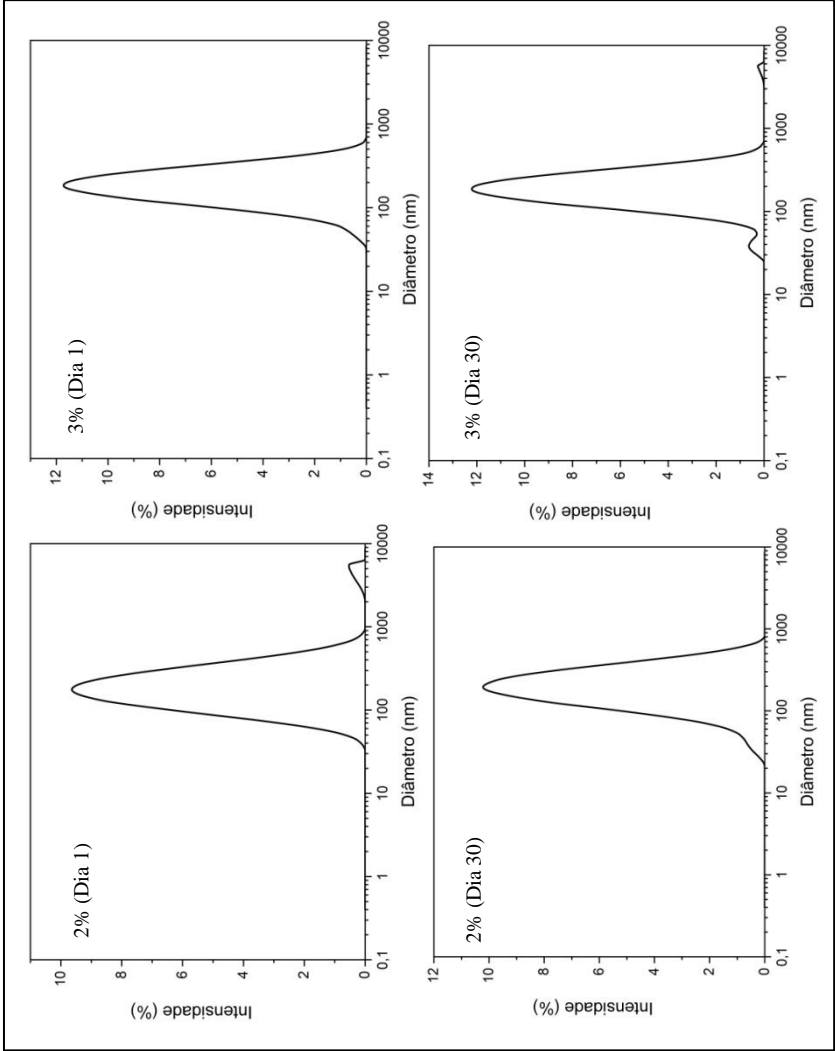


**APÊNDICE E - Distribuição das gotas de óleo essencial de cravo incorporado nas SFN no dia 1 e após 30 dias.**





**APÊNDICE F - Distribuição das gotas de óleo essencial de canela incorporado nas SFN no dia 1 e após 30 dias.**



**APÊNDICE G - Distribuição das gotas de óleo essencial de orégano incorporado nas SFN no dia 1 e após 30 dias.**

