

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO ORÉGANO (*Origanum vulgare*) NO  
TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA E PRESENÇA DE FUNGOS NO LEITE  
BOVINO *IN NATURA***

**MARTA ELAINE BASTOS OYARZABAL**

**PORTO ALEGRE**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO ORÉGANO (*Origanum vulgare*) NO  
TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA E PRESENÇA DE FUNGOS NO LEITE  
BOVINO *IN NATURA***

Autor: Marta Elaine Bastos Oyarzabal

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, junto a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na área de Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal, especialidade em Farmacologia e Terapêutica Animal.

Orientador: João Roberto Braga de Mello

Co-orientador: Luiz Filipe Damé Schuch

**PORTO ALEGRE**

**2011**

**MARTA ELAINE BASTOS OYARZABAL**

Aplicação do óleo essencial de orégano (*Origanum Vulgare*) no tratamento da mastite bovina e presença de fungos no leite bovino *in natura*

APROVADA POR:

---

Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helenice Gonzales  
Membro da Comissão

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia da Silva Nascente  
Membro da Comissão

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Bastos de Mello  
Membro da Comissão

## **DEDICATÓRIA**

**A minha filha LUARA, meu  
maior amor**

*Cruzei por noites escuras  
-Enluarada por dentro-  
E guardei luzes de estrelas  
Que me guiaram o andar!  
(Eron Mattos)*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu pai Gelson Oyarzabal, uma pessoa especial, que sempre esteve presente me apoiando e auxiliando em tudo que precisei.

A minha mãe Elaine Oyarzabal, que não está mais neste plano, mas que foi um exemplo de mãe, de mulher e de profissional.

A minha filha Luara, que veio a esse mundo no início do doutorado para iluminar minha vida.

Ao meu orientador Prof. João Roberto Braga de Mello, pela oportunidade, liberdade e confiança na execução do trabalho.

Ao meu amigo e Co-orientador Prof. Luiz Filipe Schuch pelo exemplo profissional e de vida, pela paciência, auxílio e incentivo em todos os momentos.

As amigas do laboratório de bacteriologia. “Sentirei falta dos nossos cafezinhos acompanhados de desabafos, choros e risos”. As Veterinárias: Sílvia Ladeira e Renata Schramm pela ajuda, conversas e incentivo. As laboratoristas: Carla Hartwig e Beatriz Mendes, por prepararem sempre o material com carinho e cuidado. As colegas do pós da UFPel: Helen Coimbra, pela ajuda na pesquisa, nas aulas, pelo apoio constante e principalmente por ter cuidado da Luara em um momento tão difícil; Luciana Prestes e Diane Almeida pela grande ajuda na pesquisa e pelo companheirismo nos congressos e no dia a dia; Juliana Silva, pelos bons momentos de convívio e pelo apoio. As estagiárias, principalmente Amanda Gruppelli, Carolina Iang e Fernanda Mota, pela boa vontade e disposição em ajudar.

Aos amigos do laboratório de micologia. As colegas de doutorado da UFRGS: Marlete Cleff pelo incentivo e auxílio, além de ser um exemplo a seguir; Renata Osório, Anelise Martins e Luisa Osório, pelo apoio e ajuda, principalmente com as aulas de Farmacologia e Rosema Santin, além das aulas pela grande ajuda no experimento. As colegas de pós da UFPel: Isabel Madrid, Antonella Mattei e Tatiana Antunes, pelo auxílio. Ao Prof. Mário Meirelles pelo incentivo e colaboração. As demais colegas, funcionários e estagiários que de alguma forma contribuíram.

Aos amigos e professores: João Luiz Zani, Patrícia Nascente e Helenice Gonzales, pelas contribuições na banca de qualificação, pelo auxílio com os experimentos e pela atenção que sempre tiveram comigo nas diferentes situações.

A Prof.<sup>a</sup> Maria Regina Alves, por disponibilizar o laboratório de fitoquímica e pela análise cromatográfica. A Gabriela Hörnke Alves, pela extração do óleo, sempre com muito boa vontade. Ao Marco Aurélio dos Santos, pela análise cromatográfica.

A Prof.<sup>a</sup> Fabiane Grecco pelo auxílio com a análise histológica e a Prof.<sup>a</sup> Fernanda Bastos de Mello pela ajuda com os testes de toxicidade em coelhos.

Ao Laboratório LEIVAS LEITE, pela colaboração.

Aos produtores de Piratini e Pelotas onde foram realizadas as coletas de leite, pela atenção.

A Cooperativa de Produção Agropecuária Vista Alegre (COOPAVA) e ao produtor Jorge Alfredo Cassana, por disponibilizarem seus animais para os testes *in vivo*, pelo auxílio e confiança.

A CAPES e ao Programa REUNI pela bolsa concedida.

As Faculdades de Veterinária da UFRGS e UFPel.

Aos meus queridos amigos “extra-curriculares”: Cristiane Vergara, Marcelo Beskow, Janete Costa, Ivana Rodrigues, Graça Oliveira, Magali Bastos e Sinara Oyarzabal por estarem sempre perto de mim nas horas mais difíceis, pelo apoio e principalmente por cuidarem tão bem da Luara em todos os momentos em que foi preciso me ausentar.

Aos meus irmãos (Zico e Veto), tia Carmen, Dada, Ana Lúcia, Naila e demais familiares e amigos que de alguma forma me auxiliaram nesse período.

Á Deus, pela vida e por ter me dado o título máximo de uma mulher: “o de ser mãe”.

*Agradeço todas as dificuldades que enfrentei, não fosse por elas, eu não teria saído do lugar (Chico Xavier)*

## RESUMO

Oyarzabal, Marta Elaine Bastos. Aplicação do óleo essencial de orégano (*Origanum Vulgare*) no tratamento da mastite bovina e presença de fungos no leite bovino *in natura*

Orientador: João Roberto Braga de Mello

Co-orientador: Luiz Filipe Damé Schuch

O estudo objetivou identificar a presença de fungos no leite mastítico; avaliar a ação *in vitro* do óleo essencial de *O. vulgare* frente a microrganismos isolados de leite; estudar a toxicidade deste óleo e realizar ensaio clínico de preparado fitoterápico a base de óleo essencial de orégano à 3% em vacas com mastite. O levantamento fúngico foi realizado em 1499 amostras de leite de quartos mamários reagentes ao *California Mastitis Test* (CMT). A extração do orégano foi realizada por hidrodestilação e o óleo essencial foi analisado por cromatografia gasosa. Os testes *in vitro* seguiram as normas do documento CLSI M7-A6 (2005) e CLSI-M27A3 (2008) adaptadas a fitofármaco. A avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada frente a 71 bactérias isoladas de leite, dos gêneros *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. e três cepas padrões. Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) foram realizados testes frente a 35 leveduras, sendo um *Trichosporon asahii*, *Cryptococcus laurentii* e *Kodamaea ohmeri* e 32 do gênero *Candida* spp. Foi realizada análise histológica de úberes de duas vacas tratadas com produto fitoterápico e como controle gentamicina a 1,35% para avaliação da toxicidade e testes de irritação dérmica e de mucosa ocular em coelhos de acordo com OECD 404 e OECD 405, respectivamente. Seis coelhos foram testados com veículo utilizado na formulação fitoterápica e seis com veículo acrescido de 3% de óleo de orégano. Essa formulação fitoterápica foi testada em 15 quartos mamários que apresentaram reação ao CMT. O grupo controle foi tratado com gentamicina a 1,35%, constituído de 14 quartos mamários com avaliação de CMT, Contagem de Células Somáticas (CCS) e cura microbiológica através de isolamento bacteriano. Foram isolados fungos em 116 (7,74%) amostras de leite com total de 121 fungos isolados. Destes, 94 eram leveduras e 27 fungos filamentosos. Dentre as leveduras, a maioria foi do gênero *Candida* spp. (64). O óleo essencial de orégano apresentou como principais constituintes  $\alpha$ -terpineno, 4-terpineol e timol. A CBM média variou de 0,23% a 2% frente a cepas isoladas de leite e de 3,17% e 0,35% frente aos padrões *S. aureus* e *Escherichia coli* e não apresentou efeito para *Pseudomonas aeruginosas*. Todas as amostras de leveduras foram sensíveis ao óleo de orégano nas concentrações testadas, onde a CIM e a CFM variaram de 0,0625% a 1%. As alterações encontradas na histologia dos úberes foram compatíveis com mastite. Nos testes de irritação dérmica e ocular em coelhos, houve reversão das lesões em no máximo 72h. Não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos de tratamento com relação ao CMT e CCS nos dias 7, 14 e 21 após tratamento. Entretanto, houve diferença estatística para a cura microbiológica em todos os dias analisados ( $p<0,05$ ), em favor do grupo controle. Pode-se concluir que os fungos estão presentes no leite mastítico, que o óleo essencial de orégano testado apresentou atividade antibacteriana e antifúngica em testes *in vitro* e não produziu efeito toxicológico persistente, porém não foi eficiente no tratamento da mastite subclínica.

**Palavras-chave:** leite, mastite, *Origanum vulgare*, fungos

## ABSTRACT

**Oyarzabal, Marta Elaine Bastos. Application of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare*) in the treatment of bovine mastitis and fungi in fresh cow milk**

**Advisor: João Roberto Braga de Mello**

**Co-advisor: Luiz Filipe Damé Schuch**

The study aimed to identify the presence of fungi in mastitic milk and to evaluate the in vitro action of essential oil of *O. vulgare* against microorganisms isolated from milk and to study the toxicity of the oil and perform clinical trial of prepared herbal of essential oil of oregano to 3% in cows with mastitis. The survey was conducted in 1499 samples from milk reacting to the California Mastitis Test (CMT). The extraction of oregano was performed by hydrodistillation and the essential oil was analyzed by gas chromatography. In vitro tests followed the CLSI document M7-A6 (2005) and CLSI-M27A3 (2008) adapted for fitoterapic. The evaluation of the minimum bactericidal concentration (MBC) was carried out against 71 bacteria isolated from milk of the genera *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. and *Corynebacterium* sp. and three strains standards. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) tests were performed against 35 yeasts, and one *Trichosporon asahii*, *Cryptococcus laurentii* and *Kodamaea ohmeri* and 32 of *Candida* spp. We performed histological analysis of two udders of cows treated with herbal medicine and control to gentamicin 1,35%, toxicity evaluation and tests of dermal irritation and ocular mucosa in rabbits according to OECD 404 and OECD 405, respectively. Six rabbits were tested with vehicle used in herbal formulation and six with vehicle plus 3% oil of oregano. This herbal formulation was tested in 15 mammary quarters that had reactions to CMT. The control group was treated with gentamicin at 1.35%, consisting of 14 quarters with breast assessment of CMT, Somatic Cell Count (SCC) and microbiological cure by bacterial isolation. Fungi were isolated in 116 (7.74%) milk samples with total of 121 fungal isolates. Of these, 94 were yeasts and 27 filamentous fungi. Among the yeasts, the majority was of the genus *Candida* spp.(64). The essential oil of oregano presented as main constituent  $\alpha$ -terpinene, 4-terpineol and thymol. CBM average ranged from 0.23% to 2% to strains isolated from milk and 3.17% and 0.35% to the standards *S. aureus* and *Escherichia coli* and showed no effect for *Pseudomonas aeruginosa*. All yeast strains were sensitive to oil of oregano in concentrations, where the MIC and MFC ranged from 0.0625% to 1%. The changes found in the histology were compatible udders with mastitis. In tests of skin and eye irritation in rabbits, there was reversal of the lesions in up to 72 hours. There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) between treatment groups with respect to the CMT and SCC on days 7, 14 and 21 after treatment. However, there was statistical difference for the microbiological cure in all days analyzed ( $p < 0.05$ ) better for the control group. It can be concluded that the fungi are present in mastitic milk, the essential oil of oregano tested showed antibacterial and antifungal activity in vitro tests and produced no persistent toxic effects, but was not effective in the treatment of subclinical mastitis.

**Keywords:** milk, mastitis, *Origanum vulgare*, fungi



## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO II

- FIGURA I** Cromatografia del aceite esencial de orégano obtenido por hidrodestilación en Clevenger. Picos de los patrones: 1)  $\alpha$ -pineno; 2) canfeno; 3)  $\beta$ -pineno; 4) mirceno; 5)  $\alpha$ -terpineno; 6) *p*-cimeno; 7) limoneno; 8) 1,8-cineol; 9) terpinoleno; 10) linalol; 11) 4-terpineol; 12)  $\alpha$ -terpineol; 13) timol; 14) carvacrol..... **31**

### ARTIGO III

- FIGURA I** Microplaca demonstrando crescimento e ausência de crescimento fúngico frente ao óleo essencial, através da técnica de microdiluição em caldo..... **43**

- FIGURA II** Reisolamento de levedura observado através do teste de avaliação da CFM..... **43**

- FIGURA III** Cromatografia do óleo essencial de orégano obtido por hidrodestilação em Clevenger. Picos dos padrões: 1)  $\alpha$ -pineno; 2) canfeno; 3)  $\beta$ -pineno; 4) mirceno; 5)  $\alpha$ -terpineno; 6) *p*-cimeno; 7) limoneno; 8) 1,8-cineol; 9) terpinoleno; 10) linalol; 11) 4-terpineol; 12)  $\alpha$ -terpineol; 13) timol; 14) carvacrol..... **44**

### ARTIGO IV

- FIGURA I** Teste de irritação dérmica em coelho, demonstrando o "Patch"..... **55**

- FIGURA II** Teste de irritação ocular em coelho 24h após aplicação do tratamento (veículo acrescido de óleo de orégano a 3%). Observa-se secreção ocular e opacidade..... **55**

- FIGURA III** Teste de irritação ocular em coelho 48h após aplicação do tratamento (veículo acrescido de óleo de orégano a 3%). Observa-se ausência de secreção ocular e de opacidade..... **55**

- FIGURA IV** Análise histológica do quarto AD da vaca 1, demonstrando a hiperplasia e dilatação de ductos e a corporea amylacea..... **56**

- FIGURA V** Análise histológica do quarto AD da vaca 2, demonstrando a fibrose intersticial (+++) e infiltrado inflamatório de células mononucleares e polimorfonucleares no interstício (++)..... **56**

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO I

TABELA I	Espécies de fungos isolados de amostras de leite reagentes ao <i>California Mastitis Test</i> .....	22
----------	---	----

### ARTIGO II

TABELA I	Concentración Bactericida Mínima (CBM)- media, máxima y mínima- del aceite de orégano frente a microorganismos aislados de leche bovino.....	31
----------	--	----

### ARTIGO III

TABELA I	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo de <i>Origanum vulgare</i> frente a espécies de leveduras isoladas de leite bovino.....	40
----------	--	----

TABELA II	Média logarítmica, CIM e CIM 50% e 90% para todas as leveduras avaliadas.....	40
-----------	---	----

### ARTIGO IV

TABELA I	Grau de irritação cutânea em coelhos após aplicação de veículo e formulação de óleo de orégano a 3% em diferentes tempos de observação.....	50
----------	---	----

TABELA II	Reações oculares observadas em coelhos tratados com veículo e veículo acrescido de óleo de orégano a 3% em diferentes períodos de avaliação.....	51
-----------	--	----

TABELA III	Avaliação histológica de quartos mamários de duas vacas tratadas com antibiótico e formulação fitoterápica com óleo de orégano a 3%.....	52
------------	--	----

### ARTIGO V

TABELA I	Média de CCS e CMT nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 após tratamento com óleo de orégano a 3% (1) e controle com antibiótico (2).....	63
----------	---	----

TABELA II	Frequência de cura microbiológica de quartos com mastite subclínica, após tratamento com fitoterápico (1) e controle com antibiótico (2).....	64
-----------	---	----

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
Mastite bovina.....	<b>13</b>
Fungos e a mastite bovina.....	<b>14</b>
Qualidade do leite.....	<b>15</b>
Plantas medicinais como antimicrobianos.....	<b>15</b>
<i>Origanum vulgare</i> .....	<b>16</b>
<b>ARTIGO I</b> AGENTES FÚNGICOS EM LEITE BOVINO COM MASTITE SUB CLÍNICA.....	<b>18</b>
RESUMO.....	<b>19</b>
ABSTRACT.....	<b>20</b>
INTRODUÇÃO.....	<b>20</b>
MATERIAL E MÉTODOS.....	<b>21</b>
RESULTADO.....	<b>21</b>
DISCUSSÃO.....	<b>23</b>
CONCLUSÃO.....	<b>24</b>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	<b>24</b>
<b>ARTIGO II</b> ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITE ESENCIAL DE <i>ORIGANUM VULGARE</i> ANTE BACTÉRIAS AISLADAS DE LECHE BOVINO.....	<b>26</b>
RESUMEN.....	<b>27</b>
ABSTRACT.....	<b>28</b>
INTRODUCCIÓN.....	<b>28</b>
MÉTODOS.....	<b>29</b>
Aceite esencial de orégano.....	<b>29</b>
Aislados bacterianos.....	<b>29</b>
Actividad antimicrobiana.....	<b>30</b>
RESULTADOS.....	<b>30</b>
DISCUSIÓN.....	<b>31</b>
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	<b>32</b>
<b>ARTIGO III</b> ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>ORIGANUM VULGARE</i> SOBRE LEVEDURAS ISOLADAS DE LEITE BOVINO.....	<b>35</b>
RESUMO.....	<b>36</b>
ABSTRACT.....	<b>36</b>

	INTRODUÇÃO.....	37
	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
	RESULTADOS.....	39
	DISCUSSÃO.....	40
	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
<b>ARTIGO IV</b>	<b>AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (<i>Origanum vulgare</i>) NA GLÂNDULA MAMÁRIA DE VACA E NA MUCOSA OCULAR E DERME DE COELHO.....</b>	<b>45</b>
	RESUMO.....	46
	ABSTRACT.....	46
	INTRODUÇÃO.....	47
	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
<b>ARTIGO V</b>	<b>APLICAÇÃO INTRAMAMÁRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (<i>ORIGANUM VULGARE</i>) NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA.....</b>	<b>57</b>
	RESUMO.....	58
	ABSTRACT.....	59
	INTRODUÇÃO.....	59
	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
	<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>67</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>70</b>

## INTRODUÇÃO

### Mastite bovina

Mastite é compreendida como a reação inflamatória da glândula mamária causada por agentes de natureza infecciosa, tóxica ou traumática. Ela se caracteriza pela alteração física, química e em grande parte dos casos, microbiológica do leite, e por alterações patológicas na glândula mamária, típica de uma resposta inflamatória (SCHALM et al., 1971). É a enfermidade mais prevalente dos bovinos leiteiros. As perdas econômicas mundiais estão estimadas em trinta e cinco bilhões de dólares por ano (WELLENBERG et al., 2002). Entre os componentes deste custo estão o tratamento, descarte do leite alterado, redução na produção, mortes, perda definitiva de produção, descarte precoce de animais, custo do trabalho do agricultor e do veterinário, além das consequências econômicas para a indústria pelo ingresso de leite de qualidade alterada (DEGRAVES & FETROW, 1993; HILLERTON & BERRY, 2005).

A mastite pode ser classificada em clínica e subclínica. A mastite clínica apresenta sinais evidentes, como edema, aumento de temperatura, endurecimento, dor na glândula mamária, grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite. O diagnóstico é realizado pelo uso da caneca de fundo preto ou telada, onde visualizam-se as alterações macroscópicas do leite (FONSECA & SANTOS, 2000; RIBEIRO et al, 2003). A forma subclínica se caracteriza por alterações na composição do leite, porém não evidentes, entre as principais alterações destaca-se o aumento da contagem de células somáticas (CCS), o aumento dos teores de cloreto de sódio (CINa+), proteínas séricas e diminuição do percentual de caseína, gordura, sólido total e lactose do leite (TOZZETTI et al 2008). O diagnóstico mais utilizado para mastite subclínica é o *California Mastitis Test* (CMT), de acordo com a intensidade da reação classifica-se em: negativa (0), reação leve (+), moderada (++) e intensa (+++). O teste CMT é um indicador indireto da CCS no leite, sendo estas compostas, basicamente, pelas células de descamação do epitélio secretor e leucócitos de origem do sangue, que se apresentam com elevadas concentrações nos casos de mastite (FONSECA & SANTOS, 2000; RIBEIRO et al 2003).

De uma forma geral, a mastite bovina possui caráter infeccioso, comumente determinada por bactérias e também por fungos, algas ou clamídias. Esses patógenos alcançam a glândula mamária via ducto do teto e migram até o parênquima da glândula mamária causando inflamação (SCHALM, 1971). Dentre as bactérias, as mais frequentes são pertencentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e

*Corynebacterium*. Em casos esporádicos de microrganismos de origem ambiental, se destacam os fungos leveduriformes, principalmente do gênero *Candida* e os fungos filamentosos (CHENGAPPA et al., 1984; LADEIRA, 1998).

Os principais agentes bacterianos encontrados associados à mastite bovina são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp* coagulase negativos, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *Streptococcus sp.* de origem fecal, *Corynebacterium bovis*, enterobactérias e outras bactérias Gram negativas (SCHALM, 1971). A produção da enzima coagulase é utilizada para dividir os *Staphylococcus* em dois grupos: Coagulase positivo formado pelo *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, rotineiramente agrupados como *S. aureus*, e coagulase negativo (SEARS et al., 1993). A mastite por *S. aureus* facilmente persiste, e os *Staphylococcus* coagulase negativa também podem persistir na glândula mamária e causar moderado aumento na CCS do leite (TAPONEN & PYÖRÄLÄ, 2009).

O tratamento da mastite é um dos fatores de impacto econômico na produção leiteira, representado pelo custo de medicamentos, mão de obra e descarte do leite. Na prática, é realizado por via sistêmica ou por via intramamária, ou ainda, pelas duas vias concomitantemente. A via intramamária é a mais utilizada por apresentar menores efeitos colaterais, maior facilidade de aplicação e menor custo (RAIA-JÚNIOR, 2006).

#### **Fungos e a mastite bovina**

Os fungos são comuns na natureza, estando presentes em ambientes aquáticos, terrestres e no ar. O desenvolvimento destes microrganismos pode determinar doenças infecciosas ou tóxicas, em vegetais e animais, incluindo o homem (LACAZ et al., 2002).

A prevalência da mastite micótica é de aproximadamente 1% a 12% do total de mastites de origem infecciosa. Em alguns rebanhos esse número pode aumentar em surtos, em geral por problemas de manejo, podendo afetar a maioria das vacas em lactação (KRUKOWSKI & SABA, 2003).

As leveduras são os agentes fúngicos mais frequentemente relacionados às infecções da glândula mamária em bovinos de leite, sendo que a mastite por fungos filamentosos também pode ocorrer, porém em menor frequência (KELLER et al., 2000).

Dentre as leveduras as mais isoladas são pertencentes ao gênero *Candida*, como tem sido relatada por vários autores (SANTOS & MARIN, 2005; WUNDER JÚNIOR, 2007). Em levantamento microbiológico de leite com mastite realizado por Santos & Marin (2005) em 240 amostras de leite, o percentual de fungos isolados foi de 25,4% do total de microrganismos, o gênero *Candida sp.* foi o mais isolado com 17,3% e as

principais espécies foram *C. krusei* (44,5%), *C. rugosa* (24,5%), *C. albicans* (8,9%) e *C. Guilliermondii* (8,9%), seguidas de *C. parapsilosis*, *C. zeilanoide*, *C. vini*, *C. famata*, *C. tropicalis* e *C. rugosa*, totalizando 13,2%.

### **Qualidade do leite**

O controle da mastite bovina e a cura dos animais infectados constituem um dos maiores problemas enfrentados pela pecuária leiteira (DEGRAVES & FETROW, 1993) e é a principal causa de tratamento das vacas em lactação, além disso, o uso de antimicrobianos pode trazer riscos ao consumidor (COELHO, 2003; COSTA et al., 1995).

A mastite sob o ponto de vista de saúde pública tem grande importância, uma vez que são frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite ou derivados lácteos contaminados com microrganismos patogênicos, além de problemas relacionados a presença de antimicrobianos no leite. É de fundamental importância prevenir a presença de resíduos antimicrobianos no leite, para reduzir problemas técnicos no processamento de produtos lácteos e a possibilidade de transmissão desses resíduos ao consumidor (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004; RAIÁ-JÚNIOR, 2006).

A presença de alta CCS no leite cru determina redução da vida de prateleira do leite pasteurizado, pelo aparecimento de sabores indesejáveis, os quais são detectados pelos consumidores. A redução da vida de prateleira é determinada pela ação de enzimas derivadas das células somáticas ou que passam do sangue para dentro do leite, mantendo sua ação enzimática mesmo após a pasteurização (SANTOS, 2003).

O crescimento do mercado consumidor que está preocupado com resíduos em alimentos, além da expansão dos sistemas de produção de pecuária orgânica, aumenta a necessidade de desenvolvimento e utilização de métodos alternativos para o controle de mastite daqueles conhecidos convencionalmente (FONSECA, 2001; MITIDIERO, 2002).

### **Plantas medicinais como antimicrobianos**

A busca por novos princípios ativos que atuem nos principais microrganismos causadores de enfermidades tanto no homem quanto em animais é crescente, devido a inúmeros fatores, entre eles principalmente a resistência destes frente à maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda mais a procura por produtos originários de fontes naturais, como as plantas medicinais. Vários grupos de pesquisadores têm estudado a atividade biológica das plantas originárias de diversas regiões do mundo, orientados pelo uso popular das espécies nativas. As pesquisas sobre

investigação de produtos naturais ativos contra microrganismos aumentaram significativamente nos últimos anos em diversas partes do mundo. No Brasil, a investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana também aumentou significativamente (DUARTE, 2006).

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Esses produtos apresentam uma gama de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (PINTO et al., 1997).

Segundo Miguel & Miguel (1999) os produtos naturais podem ser tão eficientes quanto os produzidos pela síntese química, porém a transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, sempre valorizando seu potencial terapêutico.

Diversas plantas têm sido utilizadas para o tratamento de enfermidades de importância em medicina veterinária e muitas delas investigadas cientificamente quanto a sua ação antifúngica como as pertencentes as famílias Asteraceae, Myrtaceae e Lamiaceae (CLEFF et al, 2009).

Embora, desde a antiguidade os povos utilizem plantas na conservação de alimentos, o estudo sistemático das plantas como antibióticos é relativamente recente. Diversos condimentos como alho, orégano, tomilho e muitos outros, têm demonstrado atividade antimicrobiana, explicando a sua utilização histórica (BEDIN et al., 1998; OGARA et al., 2000; LAMBERT et al., 2001, CARVALHO et al., 2004).

### ***Origanum vulgare***

O orégano (*Origanum vulgare* Linneus) é uma planta perene, pertencente à família Lamiaceae que se adapta bem em solos secos e calcários. A grande maioria das espécies de *Origanum* é nativa das regiões do Mediterrâneo (Grécia, Irã, Turquia), mas também são cultivadas por toda Europa, ao leste e centro da Ásia e Taiwan. Também é encontrada nas Américas, onde foi introduzida pelo homem como tempero, na América do Sul o principal produtor é o Chile, seguido pela Bolívia e Peru (CLEFF et al, 2009)

O orégano é uma planta conhecida pelo seu valor medicinal, suas flores e folhas são usadas extensivamente pela homeopatia e, seu óleo essencial é usado na tradicional medicina indiana, principalmente devido as suas propriedades antibacteriana, antifúngica e antioxidante (BARATTA et al., 1998, DORMAN et al., 2000, VICHI et al., 2001). Tem sido descrito que o óleo essencial de *Origanum vulgare* apresenta em torno de 34 compostos ativos, sendo os principais o carvacrol, timol, gama terpeno e p-



cimeno que podem alcançar entre 80,2% e 98% da composição total do óleo (CLEFF et al, 2009)

Albado et al. (2001), avaliaram atividade antibacteriana do óleo essencial de *Origanum vulgare*, onde comprovaram seu efeito antimicrobiano frente a bactérias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* e sobre bactérias Gram negativas, justificando seu uso popular na preparação e conservação de alimentos.

A atividade antifúngica de óleos essenciais de condimentos, dentre eles o orégano, foi testada por Pereira et al. (2006), seus resultados confirmaram a eficiência fungicida e/ou fungistática do óleo essencial de orégano.

Outros autores (CLEFF et al. 2005; MEINERZ et al. 2006; CLEFF et al. 2006) também tem pesquisado a ação antifúngica do óleo de orégano e comprovado seu efeito frente ao gênero *Candida*, a outras leveduras e também a fungos filamentosos.

Baseado nesses aspectos os objetivos do trabalho foram: 1. Identificar a presença de fungos no leite mastítico; 2. Determinar a Concentração Bactericida Mínima(CBM) de óleos essenciais obtidos de *O. vulgare* frente aos microrganismos isolados; 3. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) de óleos essenciais obtidos de *O. vulgare* frente aos fungos isolados; 4. Estudar a toxicidade do óleo essencial de *O. vulgare* à glândula mamária de bovinos e a mucosa ocular e derme de coelhos; 5. Realizar ensaio clínico de preparado fitoterápico a base de óleo essencial de *O. vulgare* em vacas com mastite.

**ARTIGO I**

**AGENTES FÚNGICOS EM LEITE BOVINO COM MASTITE  
SUBCLÍNICA**

Artigo enviado para publicação em 24/05/2011  
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

## AGENTES FÚNGICOS EM LEITE BOVINO COM MASTITE SUBCLÍNICA

*(Fungal agents in dairy cattle with mastitis sub clinical)*

M.E.B. Oyarzabal<sup>1</sup>, L.F.D. Schuch<sup>2</sup>, D.B. Schiavon<sup>2</sup>, P.S. Nascente<sup>2</sup>, J.L. Zani<sup>2</sup>, M.C.A.

*Meireles<sup>2</sup>, J.R.B. Mello<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias-UFRGS- Porto Alegre,RS

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas-UFPel-Pelotas, RS

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo realizar um levantamento fúngico em amostras de leite bovino reagentes ao *California Mastitis Test* (CMT). Foram coletadas 1499 amostras de leite, em 13 Unidades de Produção Leiteira, com dez coletas em cada propriedade. Houve isolamento fúngico em 116 (7,74%) amostras com total de 121 fungos isolados. Destes 94 eram leveduras e 27 fungos filamentosos. As leveduras isoladas foram: *Candida guilliermondii* (20), *C. parapsilosis* (12), *C. famata* (12), *C. spp.* (8), *C. pulcherrima* (7), *C. krusei* (2), *C. intermedia* (1), *C. rugosa* (1), *C. pelliculosa* (1), *Rodotorula spp.* (5), *Trichosporon asahii* (2), *Cryptococcus laurentii* (2), *Kodamaea ohmerri* (1) e *Malassesia furfur* (1), além de 19 leveduras não identificadas. Dentre os fungos filamentosos foram isolados seis gêneros, *Penicillium spp.* (6), *Aspergillus spp.* (6), *Alternaria spp.* (3), *Clodosporium spp.*(3), *Rhizopus sp.*(1) e *Curvularia sp.* (1), além de um *Zigomiceto sp.* e seis micélio estéril. Concluiu-se que os fungos filamentosos e principalmente as leveduras estão presentes no leite, associados ou não a etiologia da mastite.

**Palavras-chave:** Leite, mastite, fungos.

## ABSTRACT

This study aimed to survey fungi in bovine milk samples reactive to California mastitis test (CMT). We collected 1499 samples of milk, in a period of 17 months in 13 properties, with 10 samples in each property. There fungal isolation in 116 (7.74%) samples with a total of 121 fungal isolates. Of these 94 were yeasts and 27 filamentous fungi. The yeasts were: *Candida guilliermondii* (20), *C. parapsilosis* (12), *C. famata* (12), *C. spp.* (8), *C. pulcherrima* (7), *C. krusei* (2), *C. intermedia* (1), *C. rugosa* (1), *C. pelliculosa* (1), *Rodotorula spp.* (5), *Trichosporon asahii* (2), *Cryptococcus laurentii* (2), *Kodamaea ohmerri* (1) and *Mallassesia furfur* (1) and 19 unidentified yeast. Among the filamentous fungi were isolated from six genera, *Penicillium spp.* (6), *Aspergillus spp.* (6), *Alternaria spp.* (3), *Clodosporium spp.*(3), *Rhizopus sp.*(1), *Curvularia sp.* (1), and also am *Zigomiceto sp.* and six identified as sterile mycelium. It was concluded that the filamentous fungi and yeasts are present mainly in milk, associated or not the etiology of mastitis.

**Keywords:** milk, mastitis, fungi.

## INTRODUÇÃO

O leite é um alimento nutritivo e completo, mas para ser aproveitado pelo organismo, deve ser de ótima qualidade, assegurando assim sua eficiência (Mendonça et al.,1999). Os microrganismos encontrados no leite originam-se dos úberes infectados e da superfície dos mesmos, ou de outras fontes do ambiente da propriedade (Godkin e Leslie,1993).

Mastite é a reação inflamatória da glândula mamária, de forma geral possui caráter infeccioso, comumente determinada por bactérias, fungos, algas ou clamídias. Esses patógenos alcançam a glândula mamária via ducto do teto e migram até o parênquima causando inflamação (Schalm et al., 1971). As leveduras são os fungos mais frequentemente relacionados às infecções da glândula mamária em bovinos de leite (Keller et al., 2000).

Os fungos são comuns na natureza, estando presentes em ambientes aquáticos, terrestres e no ar. O desenvolvimento destes microrganismos pode determinar doenças infecciosas ou tóxicas, em vegetais e animais, incluindo o homem (Lacaz et al.,2002).

Com relação à produção de derivados lácteos, a contaminação do leite por leveduras pode afetar o produto final por meio de alterações organolépticas que ocorrem

pela produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas, além de outros derivados metabólicos produzidos pelas leveduras (Spanamberg et al 2009).

O objetivo do trabalho foi realizar o isolamento e identificação de fungos em amostras de leite obtidas de quartos mamários bovinos com mastite subclínica.

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa da presença de agentes fúngicos foi realizada em 13 Unidades de Produção Leiteira (UPL) de base familiar nos municípios de Pelotas e Piratini no estado do RS, totalizando dez coletas de leite dos animais em ordenha de cada propriedade, com intervalo médio de um mês entre as coletas. Em cada visita, foram coletadas amostras de leite dos quartos mamários que apresentaram reação ao *California Mastitis Test* (CMT)<sup>®</sup>. A coleta foi realizada no início da ordenha com prévia assepsia, logo após a realização do CMT, em tubos de vidro estéreis individuais para cada quarto mamário e mantidos sob refrigeração. As análises foram realizadas no Laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Veterinária da UFPel.

As amostras de leite foram semeadas em placas de Petri contendo agar Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol e incubadas em estufa de 36°C por até dez dias com observação diária. A identificação das colônias filamentosas foi realizada através da macro e micromorfologia, na última, utilizando lactofenol azul de algodão entre lâmina e lamínula. Quando não foi possível identificar as estruturas, foi realizado microcultivo entre lâminas (Sidrim e Rocha, 2004). As leveduras foram assim classificadas através de visualização macroscópica da colônia e microscópica pela coloração de Gram e posteriormente identificadas através de assimilação de carboidratos pelo sistema vitek 2 (Biomérieux).

As mesmas amostras foram semeadas em agar base com 5-8% de sangue ovino para isolamento e caracterização (Quinn et al., 1998) de possíveis bactérias associadas a presença de fungos.

## RESULTADOS

Durante o trabalho foram analisadas 1499 amostras de leite, e destas, 116 (7,74%) foram positivas, com 121 fungos isolados (em cinco amostras foram isolados dois fungos de espécies diferentes), sendo 94 (77,69%) leveduras e 27 (22,31%) filamentosos. Dentre as leveduras a maioria -64 (68,09%)- pertencia a diferentes espécies do gênero *Candida*: *C. guilliermondii* (20), *C. parapsilosis* (12), *C. famata*

(12), *C. spp.* (8), *C. pulcherrima* (7), *C. krusei* (2), *C. rugosa* (1), *C. intermédia* (1) e *C. pelliculosa* (1). As demais leveduras encontradas foram: *Rodotorula spp.* (5), *Trichosporon asahii* (2), *Cryptococcus laurentii* (2), *Kodamaea ohmerri* (1) e *Malassesia furfur* (1), além de 19 leveduras não identificadas. Dentre os fungos filamentosos, foram isolados seis gêneros, *Penicillium spp.* (6), *Aspergillus spp.* (6), *Alternaria spp.* (3), *Clodosporium spp.*(3), *Curvularia sp.* (1), *Rhizopus sp.*(1), além de um *Zigomiceto* e seis identificados apenas como micélio estéril (Tab. 1). Em nenhum dos quartos analisados obteve-se dois isolados consecutivos ou alternados do mesmo fungo.

Com relação à associação com outros agentes, das 116 amostras com isolamento fúngico, em 33 o fungo foi o único isolamento, em 67 foi associado à bactéria (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* ou *Corynebacterium spp.*), e 16 foram identificadas como poliflora na cultura em agar sangue.

Tabela 1: Espécies de fungos isolados de amostras de leite reagentes ao *California Mastitis Test*

LEVEDURAS	N	FILAMENTOSOS	N
<i>Candida guilliermondii</i>	20	<i>Penicillium spp.</i>	6
<i>Candida parapsilosis</i>	12	<i>Aspergillus spp.</i>	6
<i>Candida famata</i>	12	Micélio estéril	6
<i>Candida spp.</i>	8	<i>Alternaria spp.</i>	3
<i>Candida pulcherrima</i>	7	<i>Clodosporium spp.</i>	3
<i>Candida krusei</i>	2	<i>Rhizopus sp.</i>	1
<i>Candida intermédia</i>	1	<i>Zigomiceto</i>	1
<i>Candida rugosa</i>	1	<i>Curvularia sp.</i>	1
<i>Candida pelliculosa</i>	1		
<i>Rodotorula spp.</i>	5		
<i>Trichosporon asahii</i>	2		
<i>Cryptococcus laurentii</i>	2		
<i>Malassesia furfur</i>	1		
<i>Kodamaea ohmerri</i>	1		
Leveduras não identificadas	19		
TOTAL	94		27

## DISCUSSÃO

O percentual de fungos isolados (7,74%) foi inferior ao encontrado por Wunder Júnior (2007) que em 194 amostras de leite com mastite subclínica isolou em 13,4%. As leveduras foram os fungos mais isolados, sendo o maior percentual do gênero *Candida* spp. concordando com Melville et al. (2006) que em análise de 50 amostras de leite cru provenientes de tanques de refrigeração, obtiveram *Candida* spp. seguido de *Rhodotorula* spp. como os mais frequentes. As leveduras do gênero *Candida* também foram os fungos mais isolados por Wunder Júnior (2007) e Santos e Marin (2005) com 38,5% e 17,3% respectivamente, dos isolados fúngicos provenientes de leite mastítico. O primeiro autor isolou 24 espécies diferentes de leveduras, enquanto no presente estudo isolou-se 13 espécies diferentes, sendo nove espécies de *Candida* e oito amostras que foram identificadas apenas nesse gênero. Resultado semelhante ao de Santos e Marin (2005) que isolaram 10 espécies de *Candida* spp, sendo as mais frequentes *C. krusei* (44,5%), *C. rugosa* (24, 5%), *C. albicans* (8,9%) e *C. guilliermondii* (8,9%), semelhantes as espécies encontradas nessa pesquisa.

Torkar e Vengus (2008) avaliaram o nível de contaminação microbiológica por bolores e leveduras em 60 amostras de leite cru e 40 amostras de derivados lácteos produzidos por pequenas indústrias de processamento de alimentos. Nas amostras de leite cru, as leveduras e os fungos filamentosos estavam presentes em 95,0% e 63,3% respectivamente, percentuais bem maiores aos encontrados nesse trabalho, que foi de 6,27% e 1,8%. O momento da obtenção da amostra (tanque e ao pé da vaca) pode justificar essa diferença. Também houve diferença em comparação a presente pesquisa com relação aos fungos encontrados, onde apenas dois gêneros de filamentosos foram semelhantes, *Aspergillus* e *Penicillium*, porém o percentual maior isolado por estes autores foi do gênero *Geotrichum* com 51,5% das amostras.

Um dos problemas causados por leveduras em alimentos é a deterioração, podendo ser resolvido pela higiene e saneamento e também pela pasteurização, além de outros tratamentos (Jakobsena e Narvhus, 1996). No entanto, nem todos os tratamentos térmicos são eficientes na eliminação dos agentes fúngicos, como observado em trabalho realizado por Ruz-Perez et al. (2010), que avaliaram a resistência a pasteurização e fervura de fungos isolados de leite cru bovino. Foram avaliados 27 fungos filamentosos, incluindo os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e 275 leveduras, onde a grande maioria foi do gênero *Candida* (189) e as demais dos gêneros

*Rhodotorula* spp., *Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp. e *Aureobasidium*. Obtiveram como resultados que a maior resistência dos fungos se deu pela pasteurização rápida (72,18%) seguida da fervura (15,89%) e pasteurização lenta (0,99%). Melville et al. (2006) concluíram que os fungos representam um problema para o leite, e seus derivados, pois estes agentes podem causar doenças, bem como podem interferir com os procedimentos de elaboração de produtos lácteos. Os fungos isolados por estes autores, e os testados por Ruz-Perez et al. (2010), são semelhantes aos encontrados neste levantamento, demonstrando a ocorrência de diversas espécies fúngicas no leite cru podendo causar problemas de saúde em quem o consome.

A associação entre fungos e bactérias já foi referida por Costa et al. (2008) que verificaram a ocorrência de associações de leveduras com outros patógenos em 29,8% dos casos, sendo as associações com *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus* spp. coagulase positivos, *Staphylococcus* spp. coagulase negativos e *Streptococcus agalactiae* as mais frequentes.

Considerando que a maioria dos isolamentos obtidos (57,76%) foi associada a bactérias e que não houve a persistência do microrganismo até a coleta seguinte (média de um mês de intervalo), não é possível afirmar que a etiologia das mastites subclínicas avaliadas no presente trabalho estão associadas ao agente fúngico.

## CONCLUSÃO

Pode-se concluir que os fungos filamentosos e principalmente as leveduras estão presentes no leite, associados ou não a etiologia da mastite, podendo dessa forma, ser um risco a saúde pública e comprometer o processamento do leite.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COSTA, G.M.; SILVA, N.; ROSA, C.A.; FIGUEIREDO, H.C.P.; PEREIRA, U.P. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.7, p.1938-1942, 2008.
- GODKIN, M. A. & LESLIE, K. E. Culture of bulk tank milk as a mastitis screening test: a brief review. *Canadian Veterinary Journal*, v. 34, p. 601-605, 1993.
- JAKOBSENA, M. & NARVHUS, J. Yeasts and their Possible Beneficial and Negative Effects on the Quality of Dairy Products. ht. *Dairy Journal* v.6, p.755-768, 1996.
- KELLER, B.; SCHEIBL P.; BLECKMANN E.; et al. Differentiation of yeasts in mastitis milk. *Mycoses*, v.1, p.17-19, 2000.



- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. et al. *Tratado de micologia médica*. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.
- MENDONÇA, A.T.; LEAL, D.D.M.; LONDONÔ, M.M.D.; et al. Um microorganismo contaminante de grande importância para o leite e produtos lácteos; Ed. Ufla. Boletim de Extensão. 1999.
- MELVILLE, P.A.; RUZ-PERES, M.; YOKOIS, E.; et al. Ocorrência de fungos em leite cru proveniente de tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor. *Arq. Inst. Biol.*,v.73, n.3, p.295-301, 2006.
- QUINN PJ, CARTES ME, MARKEY B, et al. *Clinical Veterinary Microbiology*. Londres: Wolfè,1998. 648p.
- RUZ-PEREZ, M. Resistência de fungos filamentosos e leveduras isolados de leite cru bovino à pasteurização e fervura. *Veterinária e Zootecnia*, v.17, n.1, p.62-70, 2010.
- SANTOS, R.C. & MARIN, J.M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia*. v.159, p. 251–253, 2005.
- SCHALM, O.W.; CARROLL, E.J.; JAIN, N.C. *Bovine Mastitis*. Lea & Fabiger, Philadelphia. 1971. 360 p.
- SIDRIM, J.J.C. & ROCHA, M.F.G. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.
- SPANAMBERG, A.; SANDES, E.M.; SANTURIO, J.M.; et al. Mastite micótica em ruminantes causadas por leveduras. *Ciência Rural*, v.39, n.1, p.282-290, 2009.
- TORKAR, K.G & VENGUS, T. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw Milk and cheese in Slovenia. *Food Control*, v.19, p.570–577, 2008.
- WUNDER JÚNIOR, E.A. *Mastite Bovina: avaliação microbiológica do leite, com ênfase nas leveduras isoladas de casos de mastite clínica e subclínica, na região do planalto médio-RS, em 2005 e 2006*. 2007. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Programa de Pós Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

**ARTIGO II**

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITE ESENCIAL DE  
*ORIGANUM VULGARE* ANTE BACTÉRIAS AISLADAS DE LECHE BOVINO**

Artigo aceito para publicação em 20/01/2011

Revista Cubana de Plantas Mediciniais

**Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* ante bacterias aisladas de leche bovino**

Marta Elaine Bastos Oyarzabal<sup>I</sup>, Luiz Filipe Damé Schuch<sup>II</sup>, Luciana de Souza Prestes<sup>III</sup>, Diane Bender Almeida<sup>IV</sup>, Maria Regina Alves Rodrigues<sup>V</sup>, João Roberto Braga de Mello<sup>VI</sup>

I- Médica Veterinaria- Programa de Pos Grado en Ciencias Veterinarias/UFRGS

II- Médico Veterinario- Prof. Adjunto- Facultad de Veterinaria/UFPEL

III- Médica Veterinaria- Programa de Pos Grado en Veterinaria/UFPEL

IV- Bióloga- Programa de Pos Grado en Veterinaria/UFPEL

V- Química- Prof. Adjunto Facultad de Química /UFPEL

VI- Médico Veterinário- Prof. Adjunto- ICBS, Dep. de Farmacología/UFRGS

**RESUMEN**

**Introducción:** La mastitis bovina es el mayor problema en la producción lechera, causada principalmente por bacterias Gram positivas. La busca por principios activos que actúen en esos microorganismos es creciente, principalmente por la ocurrencia de multiresistencia bacteriana. **Objetivos:** Evaluar la concentración bactericida mínima (CBM) del aceite esencial de orégano frente a bacterias aisladas de leche mastítico. **Método:** Fue evaluada la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *O. vulgare* frente a 71 bacterias aisladas de leche bovino, de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium* y tres cepas patrón: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. La técnica utilizada fue de dilución en microplaca. **Resultados:** La CBM media varió de 0,23% a 2% frente a las bacterias aisladas de leche bovino, siendo la menor concentración para el género *Streptococcus* y la mayor para *Staphylococcus* coagulasis negativa. En cuanto a las cepas patrones la CBM fue de 3,17% y 0,35% para *S. aureus* y *Escherichia coli* respectivamente e no presentó efecto para *Pseudomonas aeruginosas*. **Conclusión:** Los resultados comprobaron la actividad *in vitro* del aceite de orégano frente a las bacterias relacionadas con la mastitis bovina.

**Palabras clave:** *Origanum vulgare*, mastitis, antimicrobiano

## ABSTRACT

**Introduction:** Bovine mastitis is a major problem in dairy production, mainly caused by Gram positive bacteria. The search for active ingredients that work in these microorganisms is increasing, mainly by the occurrence of multi-resistant bacteria.

**Objectives:** To assess the minimum bactericidal concentration (MBC) of essential oil of oregano against bacteria isolated from mastitic milk. **Methods:** We evaluated the antimicrobial activity of essential oil of *O. vulgare* against 71 bacteria isolated from bovine milk, the genus *Streptococcus*, *Staphylococcus* and *Corynebacterium* and three standard strains: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The technique used was the dilution in microplates. **Results:** The mean MBC ranged from 0.23% to 2% against the bacteria isolated from bovine milk, with the smallest concentration for the genus *Streptococcus* and the highest for coagulase-negative *Staphylococcus*. With respect to the standard strains MBC was 3.17% and 0.35% for *S. aureus* and *Escherichia coli* respectively and showed no effect for *Pseudomonas aeruginosa*. **Conclusion:** The results confirmed the *in vitro* activity of oregano oil on the bacteria related to bovine mastitis.

**Keywords:** *Origanum vulgare*, mastitis, antimicrobial

## INTRODUCCIÓN

Las mastitis bovina es causada principalmente por agentes bacterianos de los cuales son más frecuentes los que pertenecen a los géneros: *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Corynebacterium*. Bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas spp.*, también causan mastitis, pero menos frecuentemente.<sup>1</sup> Además de causar perjuicios por la reducción de la calidad y cantidad de leche, la mastitis también puede aumentar el riesgo de la presencia de residuos antimicrobianos, por el uso de antibióticos en el tratamiento de la mastitis clínica.<sup>2,3</sup>

La búsqueda de nuevos principios activos que actúen en los principales microorganismos causantes de enfermedades tanto en el hombre como en animales es creciente.<sup>4</sup> Los productos naturales pueden ser tan eficientes como los producidos por la síntesis química. Diversos condimentos como ajo, orégano, tomillo y muchos otros, han demostrado actividad antimicrobiana, lo que explica su utilización histórica.<sup>5,6</sup>

*Origanum vulgare* (orégano) es una planta perenne, perteneciente a la familia Lamiaceae. Originario de la región del Mediterráneo, siendo también cultivado en Europa, Asia y Taiwan y en América del Sur. Su principal productor es Chile, siendo

también producido en Bolivia, Peru y en menor escala en Argentina y Uruguay. El orégano presenta como componente principal un aceite esencial, con más de 34 compuestos activos, siendo que los fenoles como carvacrol, timol,  $\gamma$ -terpeno y p-cimeno pueden alcanzar entre 80,2% y 98% de la composición del aceite.<sup>7,8,9</sup>

Existen muchos estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano, siendo indicado como bactericida e insecticida, presentando actividad antimicrobiana comparable, o incluso mayor, que los compuestos típicamente utilizados para estos propósitos.<sup>10</sup>

El objetivo del trabajo fue evaluar la concentración bactericida mínima (CBM) del aceite esencial de orégano frente a bacterias de origen de leche mastítico y cepas patrones.

## MÉTODOS

Aceite esencial de orégano:

Las muestras de orégano (*Origanum vulgare*) de origen peruano fueron adquiridas de distribuidora comercial. Para la obtención del aceite la planta fue sometida a extracción por hidrodestilación en aparato de *Clevenger*, según la Farmacopea Brasileña (1988)<sup>11</sup>. El análisis del aceite esencial fue realizado por cromatografía gaseosa con detector de ionización por llama (CG/DIC). La extracción y análisis fue realizada en el Laboratorio de Fitoquímica de la UFPel. Los demás exámenes fueron realizados en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de la UFPel.

Aislados bacterianos

Las bacterias utilizadas fueron de los géneros *Streptococcus*(18), *Staphylococcus*(36) y *Corynebacterium*(17) aisladas de leche bovino con diagnóstico de mastitis clínica o subclínica, y cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) y *Escherichia coli* (ATCC 8739). Para obtención de los aislados, las muestras de leche fueron sembradas en agar sangre ovino e incubadas en estufa a 36°C por 48 horas y caracterizadas por el método de coloración de Gram y pruebas bioquímicas.<sup>12</sup> Las muestras patrones fueron obtenidas de la Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Actividad antimicrobiana

Para determinar la concentración bactericida mínima (CBM) del aceite esencial de orégano frente a las cepas bacterianas, fue utilizado método de microdilución en

caldo, de acuerdo a lo descrito en el documento CLSI M7-A6 (2005) adaptado para fitoterápicos. Los microorganismos fueron activados a través de cultivo en caldo BHI a 37°C, en agito por 24 horas. Posteriormente, fueron ajustados en escala 2 de *Mac Farland* y diluidos en medio *Muller-Hinton* para alcanzar la concentración bacteriana final de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> UFC/mL. El aceite de *Origanum vulgare* fue diluido en base logarítmica 2, alcanzando las concentraciones de 16% y 0,063%. El experimento fue realizado en triplicado y las diluciones en agua con *Tween* 20 a 1%, así como, realizados controles de crecimiento bacteriano (inóculo/medio) y de esterilidad del aceite (aceite esencial/medio). Las microplacas fueron incubadas a 36°C por 48h en agitación a 100rpm. Tras, 5µL de cada cultivo fue repicado en placas de agar sangre que quedaron en estufa a 36°C por 24h. La CBM fue determinada por la menor concentración del aceite donde no hubo crecimiento bacteriano en las placas de agar sangre.

## RESULTADOS

En relación a los compuestos detectados por el análisis cromatográfico de la muestra de orégano utilizada, se observó mayor concentración de  $\alpha$ -terpineno, 4-terpineol, timol y baja concentración de carvacrol. Dos otros picos aparecen en el análisis cromatográfico, siendo el primero aproximadamente a los 14 minutos de retención, tiempo esperado para el  $\gamma$ -terpineno y el segundo a los 17 minutos, tiempo esperado para el cis-sabineno-hidratado (figura 1).

En este trabajo fueron evaluadas diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano frente a 71 bacterias aisladas de leche con resultado positivo al *California mastitis test* (CMT) y 3 cepas patrones. La CBM media varió de 0,23% a 2% frente a las bacterias aisladas de leche, siendo la menor concentración para el género *Streptococcus* y la mayor para *Staphylococcus coagulans* negativa (tabla 1). En relación a las cepas patrones la CBM fue de 3,17% y 0,35% para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente y no presentó efecto para *Pseudomonas aeruginosa* en las concentraciones examinadas.

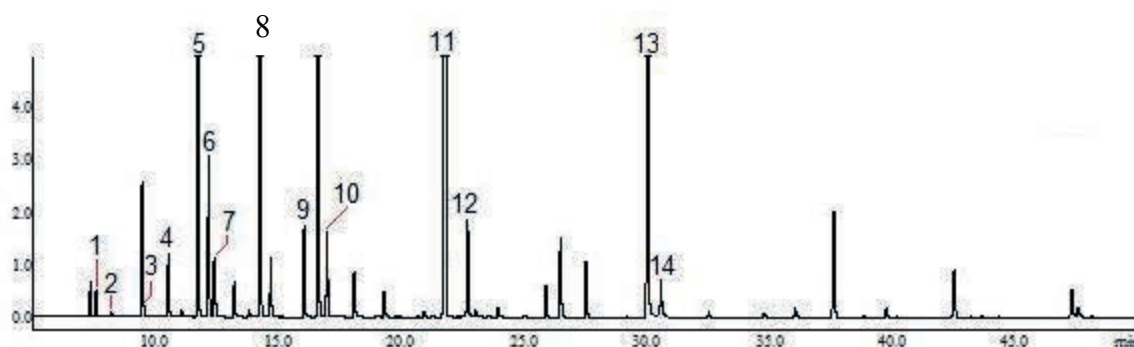


Figura 1: Cromatografía del aceite esencial de orégano obtenido por hidrodestilación en Clevenger. Picos de los patrones: 1)  $\alpha$ -pineno; 2) canfeno; 3)  $\beta$ -pineno; 4) mirceno; 5)  $\alpha$ -terpineno; 6) *p*-cimeno; 7) limoneno; 8) 1,8-cineol; 9) terpinoleno; 10) linalol; 11) 4-terpineol; 12)  $\alpha$ -terpineol; 13) timol; 14) carvacrol.

Tabla 1: Concentración Bactericida Mínima (CBM)- media, máxima y mínima- del aceite de orégano frente a microorganismos aislados de leche bovino

Microorganismos	N	CBM%	
		Média	Min-Max
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	1	3,17	--
<i>Staphylococcus intermedius</i>	9	1,55	1,0 – 2,52
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	0,65	0,31 – 1,26
<i>Staphylococcus coagulasa</i> positivo	8	1,53	0,5 – 8,0
<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo	6	2,00	0,5 – 5.04
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6	0,93	0,16 – 2,52
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	6	0,42	0,13 – 1,26
<i>Streptococcus uberis</i>	3	0,68	0,31 – 2,00
<i>Streptococcus</i> sp.	3	0,23	0,13 – 0,63
<i>Corynebacterium</i> sp.	17	0,60	0,4 – 1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	1	>16,00	--
<i>Escherichia coli</i> ATCC	1	0,35	--

## DISCUSIÓN

La acción antimicrobiana del aceite de orégano ha sido objeto de investigación que justifica su uso popular en el preparo, conservación de alimentos y como medicinal. La variación de sus constituyentes tiene interferencia en esa actividad.<sup>14</sup> Clasificaron muestras indianas analizadas por ellos y las compararon con la de otros autores, basado

en los componentes en mayor cantidad, determinando quimiotipos. Utilizando ésta misma clasificación, podemos definir que el aceite utilizado en ese trabajo posee timol y terpenos en cantidad semejante. En muestras adquiridas en el mercado brasileño, se puede demostrar la presencia de grandes variaciones de constitución, incluso muy semejantes a la que fue encontrada en el presente trabajo.<sup>15</sup>

Otros autores evaluaron actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare*, donde comprobaron su efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias Gram negativas.<sup>16</sup> La acción de extracto sobre *Pseudomonas aeruginosa* ya fue demostrada con concentración de inhibición mínima (CIM) del aceite de orégano de 12%. La CBM fue mayor para cepa patrón de *Staphylococcus aureus* que para los aislados de campo, presentando resultado semejante al citado por otros autores.<sup>17</sup>

El aceite de orégano fue más eficaz para *Escherichia coli* con 0,35% de CBM.<sup>18</sup> Encontraron a través de la técnica de difusión en ágar un halo de inhibición de  $29,5 \pm 3,4$  mm, considerándose el halo de inhibición a partir de 4mm.

Rehder y colaboradores<sup>19</sup> estudiaron el aceite esencial de dos especies de *Origanum* (*Origanum applii* y *Origanum vulgare*) que presentaron actividad contra las bacterias *Salmonella choleraesuis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecium*.

*Origanum vulgare* demostró actividad *in vitro* frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas, con CBM menor para *Streptococcus* sp., justificando nuevos análisis con aceite de orégano en exámenes *in vivo*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ladeira SRL. Mastite Bovina. In: Riet-Correa FA, Schild AL, Méndez, MC. Doenças de ruminantes e equinos. Pelotas: Universitária/UFPel, 1998:248-260
2. Santos MV. Impacto econômico da mastite bovina. A Hora Veterinária 2003; 22:46-50
3. Costa EO, Raia RB, Garino Jr.F, Watanabe ET, Ribeiro AR, Groff MR. Presença de resíduos de antibióticos no leite de pequena mistura de propriedades leiteiras 1999; NAPGAMA; 2:10-13
4. Duarte MCT. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais. Disponível em: [http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_05\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf). Obtido em: 2007-10-04



5. Miguel MD & Miguel GO. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Robe, 1999.
6. Bedin C, Wald V B, Wiest J M. Atividade antibacteriana in vitro do decocto de *Origanum applii* (Domin.) Boros - Labiatae (orégano, manjerona) sobre agentes de interesse em alimentos. Arq. Faculd. Vet. UFRGS.1998; 26:113 – 115
7. Albado PE, Saez FG, Gabriel AS. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano).Rev. Med. Hered. 2001;12:16-19.
8. Rodrigues MRA. Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano. 2002. 143f. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.
9. Castro LO, Chemale VM. Plantas medicinais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo. Guaíba: Agropecuária, 1995
10. Arcila-Lozano CC, Loarca-Piña G, Lecona-Urbe S, Mejía EG. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN).2004;54.
11. Farmacopéia Brasileira.4º ed. São Paulo: Atheneu, v.1, 1988.
12. Quinn PJ, Cartes ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. Londres: Wolfè,1998: 648.
13. CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically: Approved Standard. M7 – A6, 2005.
14. Verma RS, Padalia RC, Chauhan A, Verma RK, Yudav AK, Singh HP. Chemical diversity in indian orégano (*Organum vulgare* L.). Chemistry & Biodiversity. 2010;7: 2054-2064.
- 15.Oliveira DH, Farias AM, Cleff MB, Meireles MCA, Rodrigues MRA. Caracterização química do óleo essencial de *Origanum vulgare*: Análise da relação timol/carvacrol. XVII CIC. Pelotas/ Brasil. 2008.
16. De Martino L, De Feo V, Formisano C, Mignola E, Senatore F. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Three Chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart Growing Wild in Campania (Southern Italy). Molecules. 2009;14: 2735-2746.
17. Prestes LS, Frascolla R, Santin R, Dos Santos MAS, Schramm RC, Rodrigues MRA, Schuch LFD, Meireles MCA. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente

- a microrganismos asociados con otitis externa. Rev. Cubana de Plantas Medicinales (online). v. 13, n.4, 2008. Disponível em: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962008000400003&Ing=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400003&Ing=es&nrm=iso). Acesso em: 2010-08-10.
18. Dorman HJD & Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. *Jornal of Applied Microbiology*. 2000;83:308-316.
19. Rehder VLG, Machado ALM, Delarmelina C, Sartoratto A, Figueira GM, Duarte MCT. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*.2004;6:67-71

**ARTIGO III**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ORIGANUM VULGARE*  
SOBRE LEVEDURAS ISOLADAS DE LEITE BOVINO**

Formatado segundo as normas da revista  
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

**ATIVIDADE *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ORIGANUM VULGARE*  
SOBRE LEVEDURAS ISOLADAS DE LEITE BOVINO**

(*In vitro* activity of the *Origanum vulgare* essential oil on yeast isolated from dairy cattle)

M.E.B. Oyarzabal<sup>1</sup>, L.F.D. Schuch<sup>2</sup>, R. Santin<sup>1</sup>, L.S.Prestes<sup>2</sup>, G.H.Alves<sup>2</sup>, J.R.B. Mello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias-UFRGS- Porto Alegre,RS

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas-UFPel-Pelotas, RS

**RESUMO**

A atividade antifúngica do óleo essencial de uma amostra de *Origanum vulgare* de origem peruana foi testada frente a 35 leveduras isoladas de amostras de leite bovino reagentes ao *California Mastitis Tests*, sendo que 32 pertenciam ao gênero *Candida* spp., além de um isolado de cada umas das espécies: *Trichosporon asahii*, *Cryptococcus laurentii* e *Kodamaea ohmeri*. A extração do óleo foi realizada em aparelho Clevenger segundo a Farmacopeia Brasileira e a análise foi por Cromatografia Gasosa com detector de ionização por chama (CG/DIC). O método utilizado para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi o de microdiluição em caldo, de acordo com o descrito no documento CLSI- M27A3, adaptado para fitoterápicos. Todas as amostras foram sensíveis ao óleo de orégano nas concentrações testadas, onde a CIM e a CFM variaram de 0,0625% a 1%, sendo a *Candida intermedia* a mais sensível e as duas amostras de *C. krusei* mais resistentes. Os principais constituintes evidenciados na cromatografia foram  $\alpha$ -terpineno, 4-terpineol e timol. Com esses resultados concluiu-se que o óleo de *O. vulgare* teve efeito fungistático e fungicida frente as leveduras testadas.

**Palavras-chave:** Leveduras, *Origanum vulgare*, *in vitro*, antifungiograma

**ABSTRACT**

The antifungal activity of essential oil of *Origanum vulgare* of Peruvian origin has been tested against 35 yeasts isolated from bovine milk reacting to the California mastitis test, which 32 belonged to the genus *Candida* spp., and one isolate of each of the species: *Trichosporon asahii*, *Cryptococcus laurentii* and *Kodamaea ohmeri*. The oil

extraction was performed using Clevenger according to the Brazilian Pharmacopoeia and analysis was by gas chromatography with flame ionization detector (GC / FID). The method used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) was the broth microdilution, according to that described in CLSI document-M27A3. All samples were sensitive to oil of *Origanum* in tested concentrations, where the MIC and MFC ranged from 0.0625% to 1%, and *Candida intermedia* the most sensitive and two strains of *C. krusei* more resistant. The major constituents evidenced in the chromatography were:  $\alpha$ -terpinene, 4-terpineol and thymol. According these results concluded that *O. vulgare* essential oil had effect inhibitor and fungicidal against yeasts.

**Keywords:** Yeast, *Origanum vulgare*, in vitro

## INTRODUÇÃO

Infecções oportunistas causadas por leveduras têm sido caracterizadas como doenças emergentes em todo o mundo e este fenômeno tem levado ao desenvolvimento de novos produtos capazes de inibir a sobrevivência de seus agentes etiológicos (Souza, 2010).

Muitos autores têm buscado plantas que apresentem ação antimicrobiana. A maioria dos trabalhos concentra-se em países da África, Ásia e América Latina, onde se encontra o maior número de espécies vegetais (Guerra e Nodari, 2003). Sartoratto et al. (2004) avaliaram óleos essenciais de oito plantas aromáticas utilizadas no Brasil e encontraram atividade antibacteriana e/ou anti-candida em todas elas. A atividade antifúngica foi investigada por Baniyas et al.(1992) que extraíram o óleo essencial de folhas e flores de *O. syriacum* e testaram sua atividade com três tipos de fungos, sendo que esse óleo apresentou forte ação inibitória frente aos três.

A atividade antifúngica de óleos essenciais de condimentos, dentre eles o orégano, foi testada por Pereira et al. (2006). Como culturas de teste foram utilizados os fungos, *Fusarium* sp., *Aspergillus* das espécies *ochareceus*, *niger* e *flavus*. Observaram *in vitro* o desenvolvimento ou inibição dos microrganismos em diferentes concentrações dos óleos (500, 1000, 1500 e 2000 mg/mL). Como resultado verificaram inibição de todos os fungos estudados, a partir da diluição de 500mg/mL, com exceção do *A. niger* o qual sofreu inibição a partir da concentração de 1000 mg/mL. Confirmando a eficiência fungicida e/ou fungistática do óleo essencial de orégano.

O orégano (*Origanum vulgare* Linneus) é uma planta perene, pertencente à família Lamiaceae que se adapta bem em solos secos e calcários. A grande maioria das espécies de *Origanum* é nativa das regiões do Mediterrâneo (Grécia, Irã, Turquia), mas também são cultivadas por toda Europa, ao leste e centro da Ásia e Taiwan. Também é encontrada nas Américas, onde foi introduzida pelo homem como tempero, na América do Sul o principal produtor é o Chile, seguido pela Bolívia e Peru (Cleff et al., 2009)

Baseado nesses dados, o objetivo da pesquisa foi testar a capacidade antifúngica do óleo essencial de orégano frente a leveduras isoladas de amostras de leite bovino reagentes ao *California Mastitis Test*.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de orégano (*Origanum vulgare*) de origem peruana foram adquiridas de distribuidora comercial. Para obtenção do óleo a planta foi submetida à extração por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, segundo a Farmacopéia Brasileira (1988). A análise do óleo essencial foi realizada por Cromatografia Gasosa com detector de ionização por chama (CG/DIC). A extração e análise foi realizada no Laboratório de Fitoquímica da UFPel. Os demais testes foram realizados no Laboratório de Doenças Infeciosas da Faculdade de Veterinária da UFPel.

As leveduras utilizadas foram isoladas de leite bovino reagente ao teste *California Mastitis Test* (CMT), provenientes de vacas de 13 Unidades de Produção Leiteira dos municípios de Pelotas e Piratini. Os leites foram semeados em placas de Petri contendo agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e incubadas em estufa de 36°C por até dez dias com observação diária. As amostras onde houve crescimento fúngico e foram identificadas como leveduras através de caracterização macroscópica da colônia e também pela coloração de Gram, foram posteriormente identificadas através de assimilação de carboidratos pelo sistema vitek 2 (Biomérieux) e então 35 leveduras foram selecionadas para o teste *in vitro*: *Candida parapsilosis* (10), *Candida guilliermondii* (10), *Candida pulcherrima* (5), *Candida famata* (3), *Candida krusei* (2), *Candida intermedia* (1), *Candida pelliculosa* (1), *Cryptococcus laurentii* (1), *Kodamaea ohmeri* (1) e *Trichosporon asahii* (1)

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de orégano frente às leveduras, foi utilizado método de microdiluição em caldo, de acordo com o descrito no documento CLSI-M27A3 adaptado para fitoterápicos. Os inóculos fúngicos foram preparados a partir de

culturas jovens (24-48h), que foram suspensas em tubos contendo solução salina estéril e ajustadas na escala 0,5 de MacFarland e diluídas em solução salina (1:100) e por último em meio RPMI (1:20). O óleo de *Origanum vulgare* foi diluído em base logarítmica 2, alcançando as concentrações de 4% a 0,063%. O experimento foi realizado em duplicata nas colunas da microplaca, e a última linha foi destinada para os controles: de crescimento fúngico (inóculo/meio) e do meio (RPMI). As microplacas foram incubadas a 35°C por 72h em agitação a 100rpm.

A leitura da CIM, determinada pela menor concentração onde houve inibição do agente fúngico, foi realizada de forma visual pela comparação do crescimento fúngico nos poços do controle positivo com as diferentes concentrações do óleo.

Para determinar a CFM, 10µl de cada poço foi semeado em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, bem como 10µl de cada um dos controles. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 72h e posteriormente a CFM determinada pela menor concentração do óleo onde não houve crescimento fúngico.

A média logarítmica de todas as amostras assim como CIM e CFM 50% foram calculadas segundo o método de Reed-Muench.

## RESULTADOS

As médias logarítmicas da CIM e da CFM foram de 0,26% e 0,39%, respectivamente. A amostra de *C. intermedia* foi a mais sensível (CIM e CFM de 0,0625%) enquanto que as duas amostras de *C. Krusei* foram as mais resistentes (CIM e CFM de 1%). Na Tabela 1 estão expressas as amostras utilizadas e suas CIM e CFM.

Na Tabela 2, demonstra-se a CIM e CFM 50% e 90%. Para todas as amostras testadas a CIM 50% foi de 0,34% e a CIM 90% de 0,54%, enquanto que a CFM 50% foi de 0,44% e a CFM 90% de 1,54%. As figuras 1 e 2 ilustram a interpretação para a CIM em microplaca e a CFM em placas de agar sabouraud, respectivamente.

Na análise cromatográfica do óleo de orégano utilizado no experimento, foram identificados 14 constituintes, sendo  $\alpha$ -terpineno, 4-terpineol e timol os que apresentaram as maiores concentrações. Outros dois constituintes também apresentaram picos importantes na cromatografia, porém sua natureza química não foi identificada (Fig.3).

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo de *Origanum vulgare* frente a espécies de leveduras isoladas de leite bovino

ESPÉCIE	CIM%	CFM%	ESPÉCIE	CIM%	CFM%
<i>Candida pelliculosa</i>	0,25	0,25	<i>Candida pulcherrima</i>	0,125	0,25
<i>Candida intermedia</i>	0,0625	0,0625	<i>Candida pulcherrima</i>	0,0625	0,25
<i>Candida famata</i>	0,25	0,25	<i>Candida pulcherrima</i>	0,125	0,5
<i>Candida famata</i>	0,25	0,5	<i>Candida pulcherrima</i>	0,125	0,5
<i>Candida famata</i>	0,25	0,25	<i>Candida guilliermondii</i>	0,5	1
<i>Candida krusei</i>	1	1	<i>Candida guilliermondii</i>	1	1
<i>Candida krusei</i>	1	1	<i>Candida guilliermondii</i>	0,25	0,5
<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	1	<i>Candida guilliermondii</i>	0,125	0,25
<i>Candida parapsilosis</i>	1	1	<i>Candida guilliermondii</i>	0,125	0,125
<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,5	<i>Candida guilliermondii</i>	0,125	0,125
<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,5	<i>Candida guilliermondii</i>	0,125	0,125
<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,5	<i>Candida guilliermondii</i>	0,125	0,125
<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	1	<i>Candida guilliermondii</i>	0,125	0,25
<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,5	<i>Candida guilliermondii</i>	0,125	0,25
<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	1	<i>Kodamaea ohmeri</i>	0,5	0,5
<i>Candida parapsilosis</i>	0,25	0,5	<i>Trichosporon asahii</i>	0,25	0,25
<i>Candida parapsilosis</i>	0,25	0,5	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,125	0,25
<i>Candida pulcherrima</i>	0,25	0,5			

Tabela 2: Média logarítmica, CIM e CIM 50% e 90% para todas as leveduras avaliadas

	CIM	CFM
Média log	0,26	0,39
CIM/CFM50% <sup>1</sup>	0,34	0,44
CIM/CFM90% <sup>1</sup>	0,54	1,54

<sup>1</sup>Calculada segundo método de Reed-Muench

## DISCUSSÃO

A concentração do óleo de orégano capaz de produzir efeito fungistático ou fungicida pode ser variável nas diferentes espécies de leveduras, e também pode variar de acordo com a origem de cada amostra.

Neste trabalho utilizou-se óleo em que os principais constituintes foram  $\alpha$ -terpineno, 4-terpineol e timol, sendo que o carvacrol foi um dos constituintes com menor concentração. A relação de timol/carvacrol foi avaliada por Cleff (2008) que comparando a CIM de oito amostras de orégano frente a *Candida* spp., observou que as



duas amostras em que houve maior razão entre esses dois compostos foram as que apresentaram melhores resultados. A variabilidade de concentração dos constituintes do óleo essencial pode ser um dos fatores das diferenças de CIM e CFM dos óleos essenciais de orégano frente aos microrganismos.

Helal & Stelato (2009) avaliando a CIM e CFM do óleo essencial de dez amostras de orégano frente ao gênero *Candida*, obtiveram como resultado um melhor efeito antimicrobiano em espécies de *Candida albicans* e *C. krusei*, e a *C. parapsilosis* foi a espécie que apresentou maior resistência aos óleos nas concentrações testadas. A atividade do óleo essencial de 10 plantas, todas consideradas com potencial antifúngico, foi avaliada por Souza (2010) que observou que o óleo essencial de *O. vulgare* na CIM de 80µl/mL foi capaz de inibir o crescimento de 80% dos fungos testados, com halos variando de 9 a 27mm de diâmetro. O bom desempenho do óleo foi demonstrado frente a cepas de *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*. Estes resultados foram diferentes do encontrado no presente estudo, em que as espécies de *C. krusei* foram as mais resistentes. Giordani et al. (2004), também comprovaram a ação antifúngica do óleo essencial de *O. vulgare* em *Candida albicans* em testes *in vitro*.

Cleff et al. (2006) avaliaram a suscetibilidade de isolados clínicos de candidíase frente ao óleo essencial de *O. vulgare*. Os isolados da levedura obtidos de fêmeas caninas foram inibidos em uma concentração do óleo que variou 1 a 0,25 %, enquanto que os isolados de mulheres foram inibidos em uma concentração de 1 a 0,5%, esses resultados demonstraram uma boa atividade do óleo essencial de orégano. O presente artigo utilizou fungos isolados de amostras de leite, não diferindo substancialmente nos resultados alcançados.

## CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o óleo essencial de orégano apresentou efeito inibitório e fungicida frente às leveduras testadas, com médias logarítmicas da CIM e da CFM de 0,26% e 0,39%, respectivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANIAS, C.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C.D.; *Journal of American Oil Chemichal Society*, v.69, 520p., 1992.

- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M; SANTOS, et al. Avaliação da Suscetibilidade de isolados clínicos de candidíase frente ao *Origanum vulgare*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS, 2006, Salvador. *Anais*, Salvador, 2006.
- CLEFF, M.B. *Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de Origanum vulgare L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em Candida spp.* 2008. 114f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ A.R.; LUND, R.G. Fitoterapia aplicada a Medicina Veterinária. In: Meireles, M.C.A & Nascente, P.S. *Micologia Veterinária*. Pelotas: Universitária/UFPeL, 2009. p.385-400.
- Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts M27-A2. v.28, n.14, 2008.
- Farmacopéia Brasileira, ed. Atheneu, (São Paulo), 4º ed., v.1, 1988.
- GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; et al. Antifungal effect of various essential oils agaisnt *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phitotherapy Research*. v.18, p.990-995, 2004.
- GUERRA, M.P. & NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª Ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/Ed. da UFSC, 2003. p. 13-29.
- HELAL, L.G. & STELATO, M.M. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare*. In: XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC- 29 e 30 de setembro de 2009. Campinas. *Anais*, Campinas, 2009.
- PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciência Agrotec*, Lavras, v.30, n.4, p.731-738, jul/ago.,2006.
- SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELENA, C.; et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, Rio de Janeiro, v. 35, p. 275-280, 2004.
- SOUZA, N.A.B. *Possíveis mecanismos de atividades antifúngicas de óleos essenciais contra fungos patogênicos*. 2010. 150f. Tese (Doutorado em Produtos naturais e sintéticos bioativos)- PPG Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

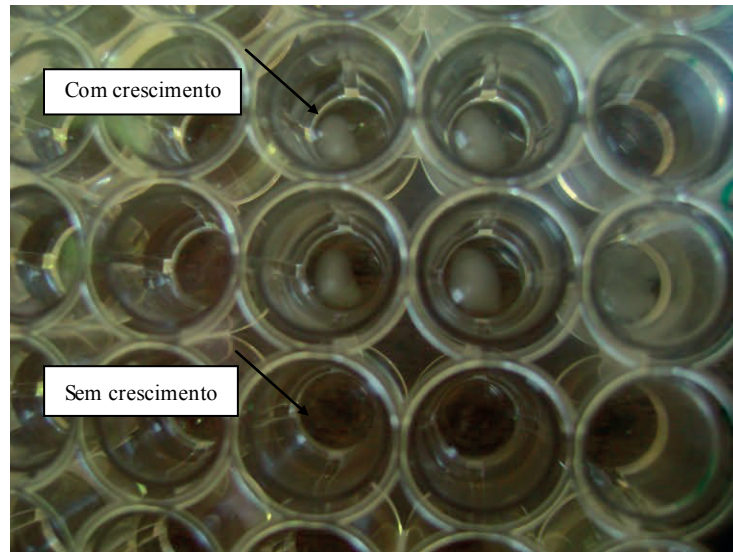


Figura 1: Microplaca demonstrando crescimento e ausência de crescimento fúngico frente ao óleo essencial, através da técnica de microdiluição em caldo.

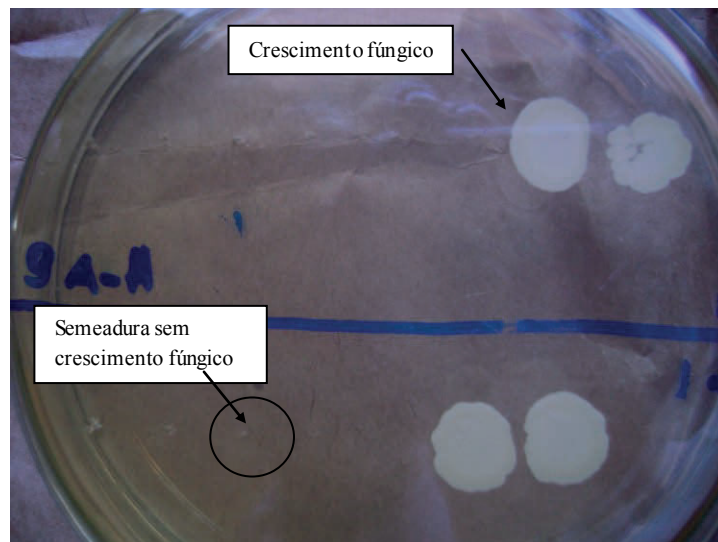


Figura 2: Reisolamento de levedura observado através do teste de avaliação da CFM.

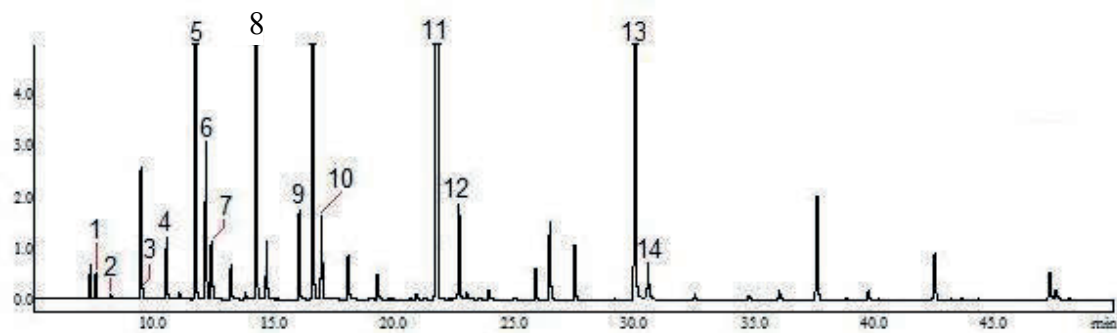


Figura 3: Cromatografia do óleo essencial de orégano obtido por hidrodestilação em Clevenger. Picos dos padrões: 1)  $\alpha$ -pineno; 2) canfeno; 3)  $\beta$ -pineno; 4) mirceno; 5)  $\alpha$ -terpineno; 6) *p*-cimeno; 7) limoneno; 8) 1,8-cineol; 9) terpinoleno; 10) linalol; 11) 4-terpineol; 12)  $\alpha$ -terpineol; 13) timol; 14) carvacrol.

**ARTIGO IV**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO  
(*Origanum vulgare*) NA GLÂNDULA MAMÁRIA DE VACA E NA MUCOSA  
OCULAR E DERME DE COELHO**

Formatado segundo as normas da revista  
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO  
(*Origanum vulgare*) NA GLÂNDULA MAMÁRIA DE VACA E NA MUCOSA  
OCULAR E DERME DE COELHO**

(Toxicological evaluation of essential oil of orégano (*Origanum vulgare*) the mammary gland of cows and the eye mucosa and rabbit dermis)

M.E.B.Oyarzabal<sup>1</sup>, L.F.D.Schuch<sup>2</sup>, F.B.Grecco<sup>2</sup>, F.B.Mello<sup>1</sup>, H.L.Gonzalez<sup>2</sup>,  
J.R.B.Mello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS- Porto Alegre,RS

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas-UFPel-Pelotas, RS

**RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo testar a toxicidade do óleo essencial de orégano a 3% na formulação para aplicação intramamária em vacas. Foram realizados testes de irritação dérmica e de mucosa ocular em coelhos, seis coelhos testados apenas com o veículo utilizado em infusões intramamárias e seis com veículo acrescido de óleo de orégano a 3%. Também foi realizada análise histológica dos úberes de duas vacas tratadas previamente com o produto fitoterápico em dois quartos mamários, sendo estes comparados com a aplicação de antibiótico comercial nos outros dois quartos. Os resultados obtidos não demonstraram atividade tóxica dos produtos testados em coelhos e não houve diferença na avaliação histológica entre tratamento e controle nos quartos mamários analisados.

**Palavras-chave:** Toxicidade, *Origanum vulgare*, coelho

**ABSTRACT**

This study aimed to test the toxicity of essential oil oregano 3% in the formulation for intramammary application in cows. Were tests of dermal irritation and ocular mucosa in rabbits six rabbits were tested only with the vehicle used in infusions intramammary and six with vehicle plus oregano oil to 3%. Was also performed histological analysis of the udders of two cows previously treated with product phytoterapic in two mammary

glands, which are compared with the commercial application of antibiotics in other two quarters. The results showed no activity toxic products tested in rabbits and showed no difference in histological evaluation between treatment and control in the mammary glands analyzed.

**Keywords:** Toxicity, *Origanum vulgare*, rabbits

## INTRODUÇÃO

O efeito antimicrobiano do óleo de orégano tem sido demonstrado em testes *in vitro*, com boa atividade antifúngica e antibacteriana (Arcila-Lozano et al., 2004; Pereira et al. 2006). Isto tem feito com que aumente o interesse dos pesquisadores na avaliação da atuação deste óleo em testes *in vivo*. O uso de medicamentos a base de plantas medicinais deve estar baseado na sua segurança e eficácia por isso estudos de toxicologia destes produtos devem ser conduzidos (Zhang, 2002).

Apesar do grande esforço realizado no desenvolvimento de métodos alternativos, são poucos os totalmente aceitos pelas autoridades reguladoras, portanto os testes de irritabilidade ocular e dérmica clássicos em coelhos, embora criticados com relação ao bem-estar animal ainda são muito utilizados em ensaios toxicológicos obrigatórios antes de novos produtos serem colocados no mercado (Martinez-Hidalgo, 2007).

Em vista do efeito antimicrobiano do óleo de orégano e vislumbrando sua utilização em animais, o objetivo do trabalho foi avaliar seu efeito toxicológico através dos testes de irritação dérmica e ocular em coelhos, bem como relatar os achados histológicos em úberes de vacas tratadas com infusão intramamária de produto fitoterápico formulado na concentração de 3% de óleo de orégano.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de irritação ocular e cutânea em coelhos foram realizados no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório – CREAL/UFRGS. Foram utilizados 12 coelhos Nova Zelândia brancos, com massa corporal média variando de 3,300 kg no início do teste a 3,683kg no final. Os animais foram colocados em gaiolas individuais e mantidos com alimentação a base de ração e água *ad libitum* por 14 dias até o início dos testes.

Foram testados dois tipos de produto: 1- veículo utilizado na formulação do fitoterápico para infusão intramamária e 2- veículo acrescido de óleo de orégano a 3% (produto fitoterápico).

O estudo de irritação cutânea foi feito em correspondência com a OECD 404 (2002), guia para testar químicos. De acordo com o recomendado, primeiramente o teste foi realizado em um coelho e somente depois de passado o período de observação, o mesmo teste foi realizado em outros dois animais. Assim, foram utilizados três coelhos albinos adultos nos quais foi aplicada a formulação fitoterápica (veículo acrescido de óleo de orégano a 3%). Estes animais, 24h antes do início do teste, foram tricotomizados nas regiões laterais do dorso. O produto foi aplicado em um dos lados do dorso do tronco, na dosagem de 0,5mL e o outro lado serviu como controle negativo. A área então foi coberta com gaze estéril, fixada ao animal com fita adesiva (Fig.1). Após 4h de exposição, o curativo ("Patch") foi removido com solução salina a 0,9% e realizada a avaliação com 1h, 24h, 48h, 72h, 7 e 14 dias após a remoção. O mesmo procedimento foi realizado posteriormente com outros três coelhos albinos adultos, porém nestes foi aplicado 0,5mL apenas do veículo. Os critérios de avaliação da reação da pele são as descritos no documento OECD 404 (2002).

O teste de irritação ocular foi realizado em correspondência com a OECD 405 (2002), guia para testar químicos. De acordo com o recomendado, primeiramente o teste foi realizado em um coelho e somente depois de passado o período de observação, o mesmo teste foi realizado em outros dois animais. Ambos os olhos de cada animal selecionado passaram por exame oftálmico 24h antes do início dos testes. Só foram mantidos os animais que não apresentaram nenhum tipo de lesão ou irritação ocular. Foram utilizados três coelhos albinos adultos que receberam aplicação de 0,1mL do produto fitoterápico (veículo acrescido de óleo de orégano a 3%) no saco conjuntival do olho esquerdo. Os olhos do lado direito serviram de controle. Os produtos foram removidos decorridos 24h da aplicação com solução salina a 0,9%. A avaliação foi realizada com 1h, 24h, 48h e 72h após aplicação. O mesmo procedimento foi realizado posteriormente em outros três coelhos, tendo sido aplicado 0,1mL apenas do veículo. As possíveis reações oculares são as descritas no documento OECD 405 (2002).

Para avaliação histológica dos úberes foram utilizadas duas vacas da raça Jersey, destinadas a descarte com histórico de mastite.

Vaca 1: Estava em fase final de lactação com média de produção diária de 5l de leite. Foi tratada em cinco ordenhas consecutivas e abatida um dia após o último



tratamento. Os quartos mamários Anterior Direito (AD) e Posterior Esquerdo (PE) foram tratados com antibiótico comercial cujo princípio ativo era gentamicina a 1,35% e os quartos Anterior Esquerdo (AE) e Posterior Direito (PD) receberam como tratamento o produto fitoterápico com óleo essencial de orégano a 3%. Na ordenha anterior a primeira aplicação e na última ordenha antes de ser enviada para abate, foram realizados testes da caneca de fundo preto, *California Mastitis Test* (CMT) e coletada amostra de leite de todos os quartos para análise microbiológica.

Vaca 2: Estava em período seco. Foi tratada da mesma forma que a vaca um, com apenas uma aplicação, um dia antes de ser enviada para abate. No dia do tratamento foram coletadas amostras de leite de cada quarto para análise microbiológica.

As amostras de leite foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas da UFPel, para realização da análise microbiológica. Uma alíquota de cada amostra de leite foi semeada em placas de agar sangue e incubadas por 48h a 37°C, sendo então as colônias identificadas segundo Quinn et al. (1998).

As vacas foram abatidas em frigorífico com inspeção estadual. Foram coletados os úberes para análise histológica que foi realizada no Laboratório de Patologia da UFPel. Os úberes foram seccionados em quatro partes: AD, AE, PD e PE e fixados em formalina a 10% durante 48h. Após este período, as amostras foram clivadas em pequenos fragmentos escolhidos de forma aleatória, seccionados em 5µm de espessura e corados por hematoxilina-eosina. Como parâmetros para análise procurou-se observar alterações degenerativas e/ou necróticas, inflamatórias ou de fibrose do tecido mamário que foram graduadas em discreta(+), moderada(++), acentuada(+++) ou muito acentuada(++++)).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados encontrados no teste de irritação cutânea em coelho realizado apenas com veículo, demonstrou que não houve formação de eritema ou escaras, bem como não houve formação de edema em nenhum dos coelhos testados até 72h, não necessitando avaliar por um período maior, sendo atribuída reação de grau zero. Na associação do veículo e óleo a 3%, as reações ocorridas foram leves, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Grau de irritação cutânea em coelhos após aplicação de veículo e formulação de óleo de orégano a 3% em diferentes tempos de observação

LESOES		PERIODO DE OBSERVAÇÃO					
		1h	24h	48h	72h	7d	14d
COELHO 4	Eritema e escaras	2	2	2	2	0	0
	Edema	1	1	1	1	0	0
COELHO 5	Eritema e escaras	1	1	1	1	1	0
	Edema	0	0	0	0	0	0
COELHO 6	Eritema e escaras	1	1	1	1	1	0
	Edema	1	1	0	0	0	0

Com relação ao teste de irritação ocular em coelho, observou-se que as reações foram muito leves. No teste realizado apenas com o veículo, o coelho 3 obteve grau zero em todos os critérios de observação, e os coelhos 1 e 2 apresentaram apenas hiperemia (grau 1) na conjuntiva nas observações de 1h e 24h. As demais observações foram todas de grau zero. Na associação do veículo com o óleo a 3%, o coelho 1 apresentou opacidade de córnea (grau 1) em 24h e 48h, hiperemia de conjuntiva (grau 1) em 1h, 24h e 48h e secreção em 1h e 24h. Os coelhos 2 e 3 apresentaram hiperemia de conjuntiva e secreção (grau 1) nas observações de 1h e 24h e 1h, respectivamente (Fig 2 e 3). Todas as demais demonstraram grau zero (Tab.2).

Estes resultados demonstraram que tanto o veículo utilizado para infusão intramamária quanto a formulação com óleo de orégano não produz efeito irritante persistente depois de uma única aplicação sobre a pele e também sobre as estruturas oculares. Em ambos os ensaios, os animais mantiveram um bom estado geral de saúde.

Os testes de toxicidade de irritação dérmica e irritabilidade oftálmica em coelhos foram utilizados por Capote et al. (2010) para avaliação da toxicidade da gentamicina em infusão intra-mamária. Estes mesmos testes também foram utilizados por Pires Júnior (2010) para avaliar os efeitos toxicológicos de *Melia azedarach* (cinamomo), planta considerada com atividades antifúngica e inseticida, dentre outras finalidades. Os testes com gentamicina e com *M. azedarach*, não apresentaram irritação na pele nem nos olhos dos coelhos testados.

Tabela 2: Reações oculares observadas em coelhos tratados com veículo e veículo acrescido de óleo de orégano a 3% em diferentes períodos de avaliação

Coelho	Tratamento	Partes	Lesões	Tempo de observação			
				1h	24h	48h	72h
1	V	Córnea	Opacidade	0	0	0	0
		Íris	Resposta inflamatória	0	0	0	0
		Conjuntiva	Hiperemia	1	1	0	0
			Edema	0	0	0	0
			Secreção	0	0	0	0
2	V	Córnea	Opacidade	0	0	0	0
		Íris	Resposta inflamatória	0	0	0	0
		Conjuntiva	Hiperemia	1	1	0	0
			Edema	0	0	0	0
			Secreção	0	0	0	0
3	V	Córnea	Opacidade	0	0	0	0
		Íris	Resposta inflamatória	0	0	0	0
		Conjuntiva	Hiperemia	0	0	0	0
			Edema	0	0	0	0
			Secreção	0	0	0	0
4	F	Córnea	Opacidade	0	1	1	0
		Íris	Resposta inflamatória	0	0	0	0
		Conjuntiva	Hiperemia	1	1	1	0
			Edema	0	0	0	0
			Secreção	1	1	0	0
5	F	Córnea	Opacidade	0	0	0	0
		Íris	Resposta inflamatória	0	0	0	0
		Conjuntiva	Hiperemia	1	1	0	0
			Edema	0	0	0	0
			Secreção	1	0	0	0
6	F	Córnea	Opacidade	0	0	0	0
		Íris	Resposta inflamatória	0	0	0	0
		Conjuntiva	Hiperemia	1	1	0	0
			Edema	0	0	0	0
			Secreção	1	0	0	0

V- Veículo, F- Veículo+óleo de orégano a 3%

Nenhuma das amostras de leite colhidos dos quartos mamários utilizados apresentaram crescimento bacteriano. Da mesma forma, a vaca 1 não apresentou mastite clínica em nenhum dos quartos no primeiro dia de tratamento, já no teste da caneca de fundo preto na última ordenha antes do abate, foi positivo nos quartos AD e PD. O CMT do quarto PE apresentou grau dois e, nos demais, grau um no dia 1, e no dia 5 observou-se grau três no CMT nos dois quartos avaliados, AE e PE. Percebe-se agudização do quadro de mastite, com mastite clínica e aumento do escore de CMT em um quarto submetido a cada tratamento.

Na análise histológica não houve diferença significativa entre os quartos tratados com produto fitoterápico e com antibiótico. Como pode ser observado na tabela 3, com exceção dos quartos AD e AE das vacas 1 e 2, respectivamente, os demais quartos mamários demonstraram alterações compatíveis com quadro de mastite, de acordo com Schalm et al., 1971. A figura 4 demonstra a histologia do quarto AD da vaca 1, que não

Tabela 3: Avaliação histológica de quartos mamários de duas vacas tratadas com antibiótico e formulação fitoterápica com óleo de orégano a 3%

VACA	QUARTO	TRAT	HISTOLOGIA
1	AD	AB	Ductos, túbulos e ácinos dilatados ++, hiperplasia de células de ácinos e túbulos ++, fibrose intersticial ++, infiltrado inflamatório não presente, restos celulares na luz de ductos ( <i>corporea amylacea</i> )+++
1	AE	FT	Hiperplasia de células de ácinos, túbulos e ductos mamários +++, fibrose intersticial +++, infiltrado inflamatório não presente, restos celulares na luz de ductos ( <i>corporea amylacea</i> )+++
1	PD	FT	Calcificação e colônias bacterianas presentes ++, ductos, túbulos e ácinos dilatados +, hiperplasia de células de ácinos, túbulos e ductos mamários +, fibrose intersticial ++, infiltrado inflamatório de polimorfonucleares na luz de ácinos, túbulos e ductos mamários +, infiltrado inflamatório de células mononucleares e polimorfonucleares no interstício +
1	PE	AB	Calcificação e colônias bacterianas presentes +, ductos, túbulos e ácinos dilatados ++, hiperplasia de células de ácinos, túbulos e ductos mamários +++, fibrose intersticial ++, infiltrado inflamatório de polimorfonucleares na luz de ácinos, túbulos e ductos mamários +, infiltrado inflamatório de células mononucleares e polimorfonucleares no interstício +, restos celulares na luz de ductos ( <i>corporea amylacea</i> )+
2	AD	AB	Fibrose intersticial +++, infiltrado inflamatório de polimorfonucleares na luz de ácinos e túbulos mamários ++, infiltrado inflamatório de células mononucleares e polimorfonucleares no interstício ++, restos celulares na luz de ductos ( <i>corporea amylacea</i> )++
2	AE	FT	Ductos túbulos e ácinos dilatados +, hiperplasia de células de ácinos, túbulos e ductos mamários +++, restos celulares na luz de ductos ( <i>corporea amylacea</i> )+
2	PD	FT	Calcificação e colônias bacterianas presentes +, ductos, túbulos e ácinos dilatados +++, hiperplasia de células de ácinos, túbulos e ductos mamários +++, fibrose intersticial ++, infiltrado inflamatório de polimorfonucleares na luz de ácinos, túbulos e ductos mamários +, infiltrado inflamatório de células mononucleares e polimorfonucleares no interstício +, restos celulares na luz de ductos ( <i>corporea amylacea</i> )+
2	PE	AB	Calcificação e colônias bacterianas presentes +, ductos, túbulos e ácinos dilatados +, hiperplasia de células de ácinos, túbulos e ductos mamários +++, fibrose intersticial +++, infiltrado inflamatório de polimorfonucleares na luz de ácinos, túbulos e ductos mamários +++, infiltrado inflamatório de células mononucleares e polimorfonucleares no interstício +++, restos celulares na luz de ductos ( <i>corporea amylacea</i> )+

TRAT: tratamento, AB:antibiótico, FT:fitoterápico. Quartos mamários: AD:anterior direito, AE:anterior esquerdo, PD:posterior direito, PE:posterior esquerdo. Resposta tecidual: +discreta,++ moderada,+++ acentuada,++++ muito acentuada

apresentou alteração e na figura 5 pode ser observada a análise histológica compatível com quadro de mastite do quarto AD da vaca 2.

Os resultados obtidos na pesquisa concordam com Cleff et al. (2008) que avaliaram a toxicidade do óleo essencial do *Origanum vulgare* em ratas Wistar, adultas, na concentração de 3% do óleo, sendo que em um grupo a aplicação foi oral e em outro intra-vaginal, e os resultados não demonstraram alterações clínica, macroscópica, hematológicas e histopatológicas.

## CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos nos testes de irritação em coelho e nas análises histológicas dos úberes, pode-se concluir que a formulação do fitoterápico a partir da associação do veículo com 3% de óleo de orégano não produziu reação de toxicidade grave, sugerindo a possibilidade de testar a atividade antimicrobiana deste produto em vacas com mastite nas condições propostas no experimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCILA-LOZANO C.C, LOARCA-PIÑA G., LECONA-URIBE S., et al. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)*.v.54, 2004.
- CAPOTE, M.R.P.; ORELLANES, I.G.; TORRES, C.C.R.; et al. Avaliação toxicológica da Gentamicina infusão intra-mamária para uso veterinário.LABIOFAM (1)2010. Disponível em: <http://www.labiofamcuba.com/pt-pt/avaliacao-toxicologica-da-gentamicina-infusao-intra-mamaria-para-uso-veterinario.html>. Acessado em: 4 jan. 2011.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ A.R.; SALLIS, E.S.; et al. Toxicidade Pré-Clínica em Doses Repetidas do Óleo Essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em Ratas Wistar. *Lat. Am. J. Pharm.* v.27, n.5, p.704-709, 2008.
- MARTÍNEZ-HIDALGO, M.P.V. Alternativas a la experimentación animal en toxicología: situación actual. *Acta bioética*.v.13, n.1, 2007.
- OECD Guideline 404 for testing of chemical. 2002. Acute Dermal Irritation/Corrosion.
- OECD Guideline 405 for testing of chemical. 2002. Acute Ocular Irritation/Corrosion.
- PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciência Agrotec*, Lavras, v.30, n.4, p.731-738, jul/ago.,2006.

PIRES JÚNIOR, H.B. Efeitos toxicológicos agudos de extratos de frutos verdes de *Melia Azedarach* (Meliaceae) em ratos (*Rattus norvegicus*), camundongos (*Mus musculus*) e *Artemia salina* .2010. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

QUINN, P.J.; CARTES, M.E.; MARKEY, B.; et al. *Clinical Veterinary Microbiology*. Londres: Ed. Wolfe, 1998.648p.

SANTOS, R.C.; MARIN, J.M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia*. v.159, p. 251–253, 2005.

ZHANG, X. Estratégia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO\\_EDM\\_TRM\\_2002.1\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf). Acessado em: 15 ago.2010.



Figura 1: Teste de irritação dérmica em coelho, demonstrando o “Patch”.



Figura 2: Teste de irritação ocular em coelho 24h após aplicação do tratamento (veículo acrescido de óleo de orégano a 3%). Observa-se secreção ocular e opacidade.



Figura 3: Teste de irritação ocular em coelho 48h após aplicação do tratamento (veículo acrescido de óleo de orégano a 3%). Observa-se ausência de secreção ocular e de opacidade.

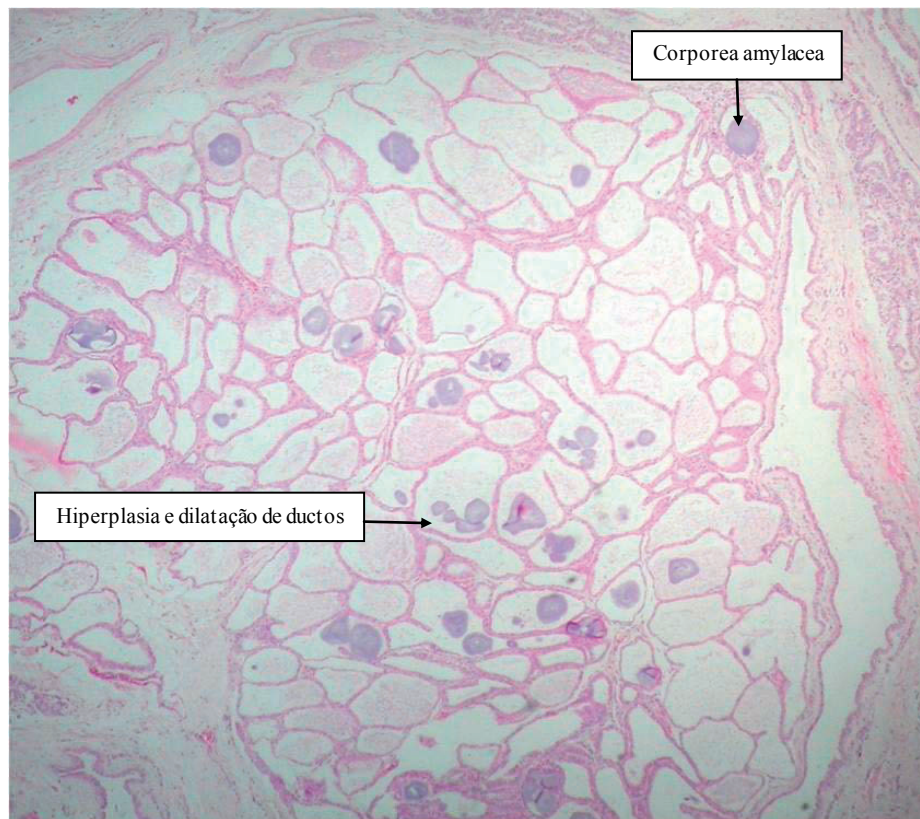


Figura 4: Análise histológica do quarto AD da vaca 1, demonstrando a hiperplasia e dilatação de ductos e a corporea amylacea.

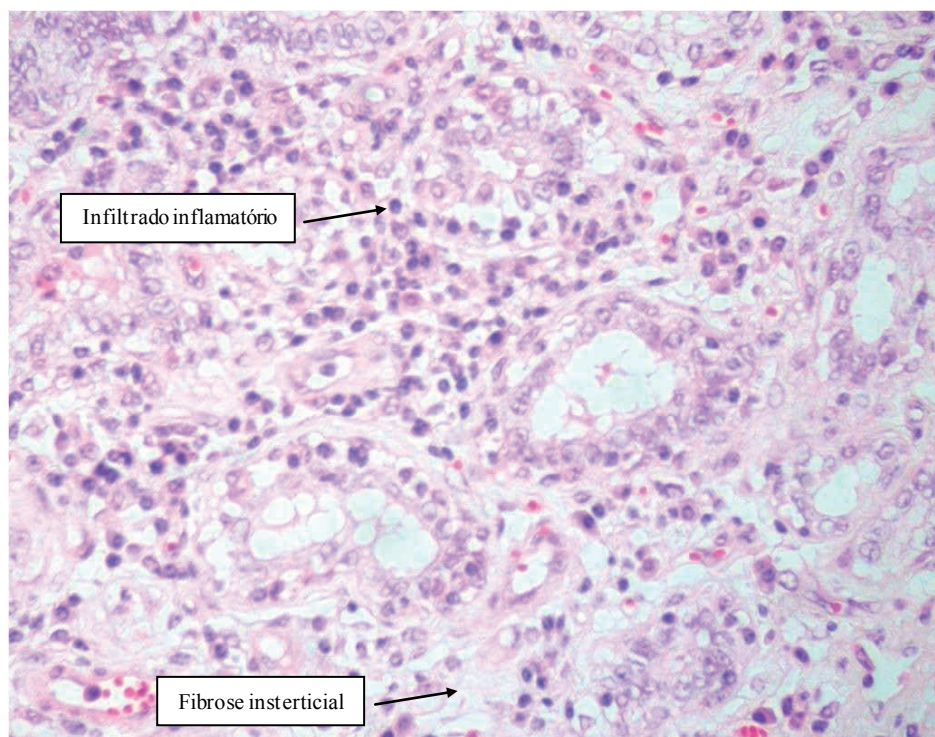


Figura 5: Análise histológica do quarto AD da vaca 2, demonstrando a fibrose intersticial (+++) e infiltrado inflamatório de células mononucleares e polimorfonucleares no interstício (++)



**ARTIGO V**

**APLICAÇÃO INTRAMAMÁRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO  
(*ORIGANUM VULGARE*) NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA**

Formatado segundo as normas da revista  
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

## APLICAÇÃO INTRAMAMÁRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*ORIGANUM VULGARE*) NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA

(Application intramammary of the essential oil oregano (*Origanum vulgare*) in the treatment of bovine mastitis)

M.E.B.Oyarzabal<sup>1</sup>, L.F.D.Schuch<sup>2</sup>, A. Gruppelli<sup>2</sup>, F.V.Motta<sup>2</sup>, H.L.Gonzalez<sup>2</sup>,  
J.R.B.Mello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS- Porto Alegre,RS

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas-UFPel-Pelotas, RS

### RESUMO

Mastite é a doença de bovino leiteiro que causa grandes prejuízos, sendo os principais agentes etiológicos bactérias dos gêneros: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. Testou-se uma formulação fitoterápica com óleo essencial de orégano à 3% para aplicação intramamária em vacas com mastite subclínica. Amostras de leite foram coletadas para confirmação do agente bacteriano relacionado a infecção intramamária. O grupo tratamento foi composto por 15 quartos tratados com fitoterápico, em sete foram isolados bactérias do gênero *Streptococcus* sp. e em oito *Staphylococcus* coagulase positiva. No grupo controle composto por 14 quartos, foi aplicado gentamicina a 1,35%, com relação aos agentes isolados seis eram do gênero *Streptococcus* sp., e oito *Staphylococcus* coagulase positiva. Os parâmetros utilizados para eficácia dos resultados foram *California Mastitis Test* (CMT), Contagem de Células Somáticas (CCS) e cura microbiológica avaliada por cultura bacteriana. Os resultados nos dias 3, 7, 14 e 21 após tratamento, não demonstraram diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos com relação ao CMT e CCS. Entretanto, houve diferença estatística para a cura microbiológica em todos os dias analisados ( $p<0,05$ ), em favor do grupo controle. Conclui-se que o óleo de orégano na formulação utilizada não foi eficiente no tratamento da mastite subclínica.

**Palavras-chave:** mastite, tratamento, bactérias, *Origanum vulgare*

## ABSTRACT

Mastitis is a disease of dairy cattle that causes the greatest damage, with the main etiologic agents of bacteria, mainly of the genera: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and *Corynebacterium* spp. In this study tested a herbal formulation with essential oil of oregano to 3% for intramammary application in cows with subclinical mastitis. Milk samples were collected from mammary glands, to confirm the bacterial agent. The treatment group was composed of 15 breasts, of which seven were isolated in bacteria *Streptococcus* sp. and in eight *Staphylococcus* coagulase positive. The control group, treated with 14 breasts, that was applied commercial product based on gentamicin concentration of 1.35% and the bacterial isolates belonged to six genera *Streptococcus* sp., and eight to the genus *Staphylococcus*. Were used as efficacy parameters the California mastitis test (CMT), Somatic Cell Count (SCC) and microbiological cure assessed by bacterial culture of samples of milk from mammary glands treated. The results on days 3, 7, 14 and 21 after treatment showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) between groups with respect to the CMT and SCC. However, there was statistical difference for the microbiological healing on days 7 and 14 after treatment ( $p < 0.05$ ) in favor of the control group. It can be concluded that under the experimental conditions the oil of oregano in the formulation used was not effective in the treatment of subclinical mastitis

**Keywords:** mastitis, treatment, bacteria, *Origanum vulgare*

## INTRODUÇÃO

Mastite é a reação inflamatória da glândula mamária causada por agentes de natureza infecciosa, tóxica ou traumática que altera as características física, química e microbiológica do leite e também leva a alterações patológicas na glândula mamária. É considerada a doença que causa os maiores prejuízos a produção leiteira, reduzindo a quantidade e qualidade do leite e derivados lácteos. Alguns dos problemas causados pela mastite é o custo com medicamentos, aumento da mão-de-obra e prejuízo pelo leite descartado durante e após tratamento com antibióticos (Schalm et al., 1971; Costa et al., 1999; Santos, 2003).

Grande parte dos casos de mastite são subclínicos, nos quais o número de células somáticas encontra-se aumentado, porém não são observadas alterações físicas macroscópicas no leite (Sears et al., 1993).

Os principais agentes bacterianos encontrados associados à mastite bovina são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase negativos, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *Streptococcus* sp. de origem fecal, *Corynebacterium bovis*, enterobactérias e outras bactérias Gram negativas (Schalm, 1971).

O controle da mastite bovina e a cura dos animais infectados constituem um dos maiores problemas enfrentados pela pecuária leiteira (Degraes e Fetrow, 1993) e é a principal causa de tratamento das vacas em lactação. Além disso, o uso de antimicrobianos pode trazer riscos ao consumidor (Costa et al., 1995; Coelho, 2003).

O aumento da consciência ecológica, aliada à desconfiança no sistema de produção e distribuição de alimentos convencionais, tem propiciado um crescimento da demanda de alimentos originários de sistemas orgânicos de produção (Feiden et al., 2002). O desafio é integrar os diferentes enfoques em estudos com rigor científico, necessariamente, integrando as realidades sociais e ecológicas das comunidades rurais (Méndez e Gliessman, 2002).

Vários grupos de pesquisadores têm estudado a atividade biológica de plantas medicinais originárias de diversas regiões do mundo orientados pelo uso popular das espécies nativas (Duarte, 2006). Dentre essas plantas, está o *Origanum vulgare* que vem sendo pesquisado devido a seu efeito antimicrobiano. Diversos autores comprovaram sua atividade antibacteriana frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas (Albado et al. 2001; Arcila-Lozano et al., 2004)

Tendo em vista os vários trabalhos comprovando a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare* em testes *in vitro*, o objetivo da pesquisa foi avaliar sua atividade antibacteriana na aplicação intramamária em vacas com mastite.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado em três Unidades de Produção Leiteira (UPL), sendo duas no município de Pelotas e a outra no município de Piratini. As vacas eram das raças Holandês e Jersey, e estavam em diferentes estágios de lactação, com média de produção diária entre 10 e 12 litros de leite. Não foram incluídos no experimento vacas nos primeiros 15 dias de lactação e nos últimos 45 dias pré-secagem.

Os animais em ordenha foram submetidos a exames para detecção de mastite clínica (teste da caneca de fundo escuro) e subclínica (*California Mastitis Test-CMT*). Amostras de leite dos quartos diagnosticados positivos nesses testes foram coletadas assepticamente em tubos de vidro estéreis, refrigerados e encaminhados ao Laboratório

de Doenças Infeciosas da Faculdade de Veterinária da UFPel, onde foram semeados em agar sangue, incubados à 37<sup>0</sup>C aerobiamente em estufa por até 48h, sendo então realizado o diagnóstico bacteriológico. As colônias isoladas foram caracterizadas segundo Quinn et al. (1998).

O orégano utilizado no estudo foi adquirido de distribuidora comercial. A extração do óleo e a análise cromatográfica foi realizada no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Química Analítica e Geociências da UFPel. A extração foi realizada por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e a análise por Cromatografia Gasosa com detector de ionização por chama. Como veículo para o fitoterápico, foi utilizado o mesmo meio base empregado na preparação de produto intramamário comercial, fornecido por uma indústria farmacêutica. Todo procedimento de preparo do fitoterápico foi realizado em capela de fluxo laminar com material esterilizado. Após a preparação, o fitoterápico foi distribuído em seringas estéreis envoltas por papel alumínio, na quantidade de 10mL. O produto era sempre preparado de um a três dias antes da primeira aplicação e mantidos sob refrigeração a temperatura de 4°C até sua utilização.

A metodologia utilizada na avaliação da eficácia do produto seguiu as normas da APVMA (1996). Para serem incluídos no experimento, os animais apresentaram em pelo menos um quarto mamário, o mesmo agente bacteriano em três prévias coletas de leite. Cada quarto mamário foi alocado aleatoriamente em um de dois grupos. O grupo um (1), recebeu o tratamento fitoterápico na concentração de 3% de óleo de orégano. Neste grupo dos 15 quartos tratados, os agentes bacterianos isolados foram os seguintes: *Staphylococcus* coagulase positiva (8), *Streptococcus agalactiae* (3), *Streptococcus* sp. (2) e *Streptococcus dysgalactiae* (2). O grupo dois (2) foi o controle, sendo aplicado produto comercial a base de gentamicina na concentração de 1,35% em 14mquartos mamários, sendo os agentes bacterianos isolados: *Staphylococcus* coagulase positiva (8), *Streptococcus* sp. (2), *Streptococcus agalactiae* (2), *Streptococcus dysgalactiae* (1) e *Streptococcus uberis* (1). As aplicações intramamárias foram realizadas em cinco ordenhas consecutivas. Para análise dos resultados foram realizados no dia 0 e nos dias 3, 7, 14 e 21 pós tratamento, teste da caneca de fundo preto e CMT, para detectar mastite clínica e subclínica respectivamente, além de coleta de leite para Contagem de Células Somáticas (CCS) e análise microbiológica, sendo que a última não foi analisada no dia três pós tratamento. As amostras de leite foram coletadas em frascos estéreis assepticamente e as análises foram feitas no Laboratório de Doenças Infeciosas da

UFPEL. A CCS foi realizada por microscopia ótica segundo Schalm et al. (1971). Para análise microbiológica o leite foi semeado em placas de agar sangue e incubadas por 48h a 37°C, sendo então as colônias identificadas segundo Quinn et al (1988). O parâmetro definitivo que indicou eficácia ou não do fitoterápico foi cura ou não cura microbiológica. Os demais parâmetros foram avaliados como indicadores de recuperação da saúde do úbere.

As análises estatísticas de CMT foram realizadas segundo o método Kruskal-Wallis, de CCS por ANOVA e a cura microbiológica pelo teste do qui-quadrado.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O óleo essencial utilizado para a formulação do fitoterápico possuía como principais constituintes  $\alpha$ -terpineno, 4-terpineol e timol e apresentou baixa concentração de carvacrol. Cleff (2008) pesquisou a ação antimicrobiana de oito diferentes amostras de orégano e obteve variação tanto na concentração inibitória mínima do óleo frente aos microrganismos, quanto nas concentrações dos constituintes. Demonstrando a variabilidade de resultados de acordo com a constituição do óleo, bem como a relação de timol e carvacrol, em que os melhores resultados encontrados por esse autor foram com os óleos que apresentaram maior relação entre os dois constituintes.

Durante o experimento, um quarto mamário do grupo tratamento apresentou mastite clínica entre os dias 7 e 14, sendo tratado com antibiótico e retirado do experimento e um animal do grupo controle foi retirado da ordenha após o dia 14, por apresentar baixa produção leiteira. Portanto chegou-se ao final do experimento com 14 quartos mamários tratados no grupo um e 13 no grupo dois.

Na presente pesquisa não houve diferença entre os tratamentos com relação ao CMT e CCS em todos os dias analisados. O grupo controle variou significativamente a CCS com contagem maior no dia três e menor nos dias 7 e 21 após tratamento. No grupo tratamento não houve variação na CCS nos diferentes dias de coleta, assim como no CMT para os dois grupos (Tab.1). A metodologia de avaliação do tratamento realizada nessa pesquisa, foi semelhante a utilizada por Reis et al. (2003) em que foram tratados 83 quartos mamários de vacas com mastite subclínica, com aplicação intramamária de 250mg de cefacetil sódico (cefalotina). Os grupos tratados e controle foram avaliados nos dias zero, 14, 25 e 40 após o tratamento por meio de provas de CMT, CCS, isolamento e identificação de patógenos. Esses autores obtiveram aos 14

dias após o tratamento, acentuada diminuição da CCS e de reações positivas ao CMT nos animais tratados.

Tabela 1: Média de CCS e CMT nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 após tratamento com óleo de orégano a 3% (1) e controle com antibiótico (2)

Dia	CCS		CMT	
	Trat 1	Trat 2	Trat 1	Trat 2
0	5,99	6,11 <sup>a,b</sup>	2,53	2,29
3	5,96	6,47 <sup>a</sup>	2,27	1,86
7	5,88	5,64 <sup>b</sup>	1,87	1,21
14	5,75	6,01 <sup>a,b</sup>	1,79	1,57
21	5,81	5,72 <sup>b</sup>	1,79	1,15

Obs: Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa nas médias entre dias de coleta no mesmo tratamento ( $p < 0.05$ ); CCS: Contagem de Células Somáticas; CMT: *California Mastitis Test*

Com relação a cura microbiológica, em todos os dias analisados houve diferença significativa, em favor do grupo controle tratado com gentamicina. Na análise dos resultados dos 14 dias após tratamento a diminuição das infecções intramamárias (IIMs) foi de 28,57% nos quartos em que utilizou-se a formulação fitoterápica. Porém, nos quartos tratados com gentamicina o percentual de cura foi de 78,57% (Tab.2). Nesse mesmo período pós tratamento Reis et al. (2003) obtiveram como resultado redução de 61,4% das IIMs. Os mesmos autores observaram que entre os dias 25 e 40 após tratamento as diferenças não foram significativas ( $P > 0,05$ ), ocorreram recidivas ou reinfecções nos tetos tratados. O mesmo ocorreu na presente pesquisa na avaliação de 21 dias pós tratamento, onde um animal apresentou reinfecção com outra espécie bacteriana (*Streptococcus* sp. para *Staphylococcus coagulase* positiva).

A produção da enzima coagulase é utilizada para dividir os *Staphylococcus* em coagulase positiva formado pelo *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, rotineiramente agrupados como *S. aureus*, e coagulase negativa (Sears et al., 1993). A pobre resposta das mastites por *S. aureus* à antibioticoterapia tem sido foco de uma variedade de estudos no esforço de determinar quais são os fatores responsáveis por falhas na terapia, de modo que no futuro os tratamentos sejam mais efetivos (Cardoso et al., 2000).

Tabela 2: Frequência de cura microbiológica de quartos com mastite subclínica, após tratamento com fitoterápico (1) e controle com antibiótico (2)

Dia	Tratamento	Cura/não cura			% total de cura
		Total	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<i>Streptococcus</i> spp.	
7	1	5/10	3/5	2/5	33,33 <sup>b</sup>
	2	11/3	5/3	6/0	78,57 <sup>a</sup>
14	1	4/10	2/6	2/4	28,57 <sup>b</sup>
	2	11/3	5/3	6/0	78,57 <sup>a</sup>
21	1	4/10	2/6	2/4	28,57 <sup>b</sup>
	2	10/3	4/3	6/0	76,92 <sup>a</sup>

Obs.: Letras diferentes indicam diferença estatística com  $p < 0,05$  ao teste do qui-quadrado

A mastite por *S. aureus* facilmente persiste, e os *Staphylococcus* coagulase negativa também podem persistir na glândula mamária e causar moderado aumento na CCS do leite (Taponen & Pyörälä, 2009). A persistência dos *Staphylococcus* spp. também foi observada na pesquisa, onde o percentual de cura dos quartos tratados com fitoterápico foi de 37,5% no dia sete e de 25% nos dias 14 e 21 após tratamento, com relação aos quartos controle tratados com gentamicina os percentuais de cura foram de 62,5% nos dias 7 e 14 e de 57,1% no dia 21 após tratamento.

No caso dos quartos infectados por *Streptococcus* sp., o percentual de cura microbiológica com uso de antibiótico foi de 100% nos dias 7, 14 e 21 após tratamento. Mesmo nos quartos infectados com *Streptococcus* spp., o tratamento com fitoterápico apresentou baixo percentual de cura, que foi de 28,57% no dia sete e de 33,3% nos dias 14 e 21 após tratamento. O resultado com uso de antibiótico, foi semelhante ao de Langoni et al. (2000) que obtiveram uma média de cura após 21 dias do tratamento com dois diferentes antibióticos e uma associação de ambos de 84,6% frente a *Streptococcus agalactiae*.

## CONCLUSÃO

A formulação fitoterápica com 3% de óleo essencial de orégano não foi eficiente no tratamento da mastite subclínica, porém como o efeito antimicrobiano desse óleo já foi comprovado em testes *in vitro*, outros trabalhos *in vivo* devem ser realizados com outras amostras de orégano e outras formulações.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALBADO, P.E.; SAEZ, F.G.; GABRIEL, A.S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev. Med. Hered.* v.12, n.1, p. 16-19, 2001.
- ARCILA-LOZANO C.C, LOARCA-PIÑA G., LECONA-URIBE S., et al. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)*.v.54, 2004.
- Australian Pesticides and Veterinary Medicine Authority. 1996. Guidelines for testing intrammary antibiotics formulated for use in lactating cows Disponível em: [http://www.apvma.gov.au/guidelines/gl25\\_intramammary.shtml](http://www.apvma.gov.au/guidelines/gl25_intramammary.shtml). Acesso em: 12 jan.2008
- CARDOSO, H.F.T; COSTA, G.M.; SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.22, p.199- 203, 2000.
- CLEFF, M.B. *Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de Origanum vulgare L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em Candida spp.* 2008. 114f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- COELHO, V.R.P. *Avaliação de resíduos de antimicrobianos no leite de quartos mamários não tratados de vacas com mastite tratadas por via intramamária.* 2003. 102 f. Dissertação (Mestrado em qualidade e produtividade animal)-Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; et al. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. *Rev. Bras. de Méd. Vet.*, v. 17, n. 4, p. 156-158, 1995.
- COSTA, E.O.; RAIÁ, R.B.; GARINO Jr.F.; et al. Presença de resíduos de antibióticos no leite de pequena mistura de propriedades leiteiras. *NAPGAMA*, v.2, n.1, p. 10-13, 1999.
- DEGRAVES, F. J.; FETROW, J. Economics of mastitis and mastitis control. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. Philadelphia, v.9, n.3, p 421-434, 1993.
- DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais*, 7 de outubro de 2006. Disponível em: [http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_05\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf). Acesso em: 04 out.2007.

- FEIDEN, A.; ALMEIDA, D.L.; VITOI, V.; et al. Processo de conversão de sistemas de produção convencionais para sistemas de produção orgânicos. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v.19, n.2, p.179-204, maio/ago., 2002.
- LANGONI, H.; ARAÚJO, W.N.; SILVA, A.V., et al. Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacinina bem como com a sua associação. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.67, n.2, p.177-180, jul./dez., 2000.
- MÉNDEZ, V.E. e GLIESSMAN, S.R. Un enfoque interdisciplinario para la investigación en agroecología y desarrollo rural en el trópico Latinoamericano. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. Costa Rica, v.64, p.5-16, 2002.
- QUINN, P.J.; CARTES, M.E.; MARKEY, B.; et al. *Clinical Veterinary Microbiology*. Londres: Ed. Wolfe, 1998. 648p.
- REIS, S.R.; SILVA N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n.6, p.651-658, 2003.
- SANTOS, M.V. Impacto econômico da mastite bovina. *A Hora Veterinária*, v.22, n.131, p. 46-50, 2003.
- SCHALM, O.W.; CARROLL, E.J.; JAIN, N.C. *Bovine Mastitis*. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1971. 360p.
- SEARS P.M.; GONZÁLEZ R.N.; WILSON D.J.; et al. Procedures for mastitis diagnosis and control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Philadelphia, v.9, p.445-468. 1993.
- TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative Staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*. v.134, p.29-36, 2009.

## DISCUSSÃO GERAL

A presença de fungos em leite bovino, tanto em amostras coletadas de tanque, quanto ao pé da vaca, tem sido evidenciada por muitos autores. No presente trabalho em 7,74% das 1499 amostras de leite coletadas isolou-se fungos, a grande maioria foram leveduras com 77,69% dos isolados e destas 68,9% do gênero *Candida*. Esses resultados são semelhantes ao encontrado por outros autores. Wunder Júnior (2007) isolou fungos em 13,4% das amostras de leite reagentes ao CMT, enquanto o percentual de fungos isolados por Santos e Marin (2005) foi de 25,4%. Estes autores também encontraram leveduras do gênero *Candida* como as mais prevalentes com 38,5% e 17,3%. Costa et al (2008) obtiveram uma frequência média de isolamento de leveduras de 3,4% entre as 17 propriedades pesquisadas no estado de Minas Gerais, mas também encontraram o gênero *Candida* como o mais frequente, em 98,1% das leveduras isoladas.

A variação de concentração das substâncias químicas encontradas em óleo essencial de orégano tem sido comprovada. A análise cromatográfica do óleo essencial utilizado nos testes *in vitro* e *in vivo*, demonstrou como principais componentes  $\alpha$ -terpineno, 4-terpineol e timol, Cleff (2008) também encontrou esses componentes como os de maior concentração quando comparou a ação anticandida de oito óleos de orégano. Porém constatou também, variação na concentração dos compostos químicos, bem como do efeito antifúngico entre os óleos testados.

Nos testes *in vitro* realizados nessa pesquisa utilizou-se microrganismos isolados de amostras de leite bovino reagentes ao CMT. A ação bactericida foi testada frente a 71 bactérias, dos gêneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. Para testar a atividade antifúngica do óleo utilizou-se 35 leveduras, sendo a maioria (32), pertencentes ao gênero *Candida* spp. A CBM variou de 0,23% a 2% sendo um isolado de *Streptococcus* sp. o mais sensível. A atividade antibacteriana do óleo de orégano tem sido comprovada por outros pesquisadores, frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, havendo variação na CBM (DORMAN & DEANS, 2000; REHDER et al, 2004). No teste da atividade antifúngica a CIM e CFM variaram de 0,0625% a 1%, sendo a *C. intermedia* a mais sensível e as duas amostras de *C. krusei* mais resistentes. Outros pesquisadores têm testado e comprovado a ação do óleo de orégano frente a leveduras em testes *in vitro*. Helal & Stelato (2009) testaram 10 amostras de orégano frente ao gênero *Candida*, e obtiveram como resultado um melhor efeito antimicrobiano em espécies de *Candida albicans* e *C. krusei*. Giordani et al.

(2004), também comprovaram a ação antifúngica do óleo essencial de *O. vulgare* em *Candida albicans*. Autores tem comprovado também a ação inibidora do óleo de orégano frente a fungos filamentosos (PEREIRA et al., 2006).

A comprovação da atividade bactericida e fungicida em testes in vitro do óleo de orégano, tem levado pesquisadores a testar em animais experimentais (CLEFF, 2008). Avaliação da atividade bactericida do óleo de orégano em vacas para tratamento de mastite com aplicação intramamária não foram descritos. Nessa pesquisa objetivou-se avaliar a atividade do óleo em vacas com mastite subclínica com presença persistente do mesmo agente bacteriano. Os resultados obtidos frente as bactérias dos gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* não foram satisfatórios. Em comparação com o grupo controle, em que foi utilizado antibiótico comercial a base de gentamicina, não houve diferença entre os tratamentos nos dias analisados, com relação a CCS e CMT, porém houve significativa diferença entre os tratamentos com relação a cura microbiológica nas coletas de leite realizadas nos dias 7 e 14 após realização dos tratamentos, em favor do grupo controle.

## CONCLUSÃO

Conclui-se a partir do presente trabalho que:

- fungos de diversas espécies foram isolados de leite bovino reagente ao CMT, pertencentes aos gêneros *Candida*, *Rodotorula*, *Kodamaea*, *Trichosporon asahii*, *Malassesia furfur*, *Cryptococcus laurentii*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Rhizopus*;

- o óleo essencial de orégano produz efeito bactericida e fungicida frente a microrganismos isolados de leite bovino mastítico;

- os testes realizados em mucosa ocular e derme de coelho, com o óleo de orégano à 3% não demonstraram atividade toxicológica persistente;

- a avaliação histológica de úberes de vacas tratadas com óleo nessa mesma concentração, não apresentou diferença com relação a tratada com antibiótico, com achados histológicos semelhantes ao quadro de mastite.

- os testes *in vivo*, como aplicação intramamária para tratamento da mastite subclínica, na concentração de 3% nas condições testadas, produziu efeito inferior ao controle tratado com antibiótico;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBADO, P.E.; SAEZ, F.G.; GABRIEL, A.S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). **Rev. Med. Hered** v.12, n.1, p. 16-19, 2001.
- BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; BIONDI, D.M.; RUBERTO, G.; Chemical composition antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coiander essential oils. **J. Essent. Oil Res**, v.10,n.6, p.618-627, 1998.
- BEDIN, C., WALD, V. B., WIEST, J. M. Atividade antibacteriana in vitro do decocto de *Origanum applii* (Domin.) Boros - Labiatae (orégano, manjerona) sobre agentes de interesse em alimentos. **Arq. Faculd. Vet. UFRGS**. Porto Alegre, v. 26, n.02, p.113 – 115, 1998.
- CARVALHO, A.F.; COSTA, C.; NOVAES, D.M.; PINTO, M.P.A.; AROUCA, N.E. Agricultura urbana: alternativa de segurança alimentar e geração de renda, Viçosa, MG. In: 2<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Extensão Rural, Belo Horizonte, 2004. **Anais**, Belo Horizonte.
- CHENGAPPA, M.M.; MADDUX, R.L.; GREER, S.C; PINCUS, D.H.; GEIST, L.L. Isolation and Identification of Yeasts and Yeastlike Organisms from Clinical Veterinary Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v.19, p.427-428, 1984.
- CLEFF, M.B. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida spp***. 2008. 114f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; XAVIER, M.; SOUZA, L.; NASCENTE, P.; SCHUCH, L.F.; MEIRELES, M.; RODRIGUES, R.; MELLO, J.R. Susceptibilidade de isolados de *Aspergillus spp* frente ao óleo essencial do *Origanum vulgare*. In: V Congresso Latinoamericano de Micologia, Brasília, Agosto 2005. **Anais**, Brasília, p.245.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M; SANTOS, M.Z.; NASCENTE, P.S.; MADRID, I.M.; SCHUCH, L.F.D.; MEIRELES, M.C.; MELLO, J.R.B.; RODRIGUES, R.A. Avaliação da Suscetibilidade de isolados clínicos de candidíase frente ao *Origanum vulgare*. In: Simpósio de Plantas Medicinais Brasileiras, Salvador, 2006. **Anais**, Salvador.

- CLEFF, M.B.; MEINERZ A.R.; LUND, R.G. Fitoterapia aplicada a Medicina Veterinária. In: MEIRELES, M.C.A & NASCENTE, P.S. **Micologia Veterinária**, Pelotas: Universitária/UFPeL, 2009, p.385-400
- COELHO, V.R.P. **Avaliação de resíduos de antimicrobianos no leite de quartos mamários não tratados de vacas com mastite tratadas por via intramamária**. 2003. 102f. Dissertação (Mestrado em qualidade e produtividade animal)-Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.
- COSTA, E. O.; BENITES, N. R. ; MELVILLE, P. A. ; PARDO, R. B. ; RIBEIRO, A. R. ; WATANABE, E. T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Rev. Bras. de Méd. Vet.**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 156-158, 1995.
- COSTA, G.M.; SILVA, N.; ROSA, C.A.; FIGUEIREDO, H.C.P.; PEREIRA, U.P. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1938-1942, 2008.
- DEGRAVES, F.J.; FETROW, J. Economics of mastitis and mastitis control. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**. Philadelphia, v.9, n.3, p 421-434, 1993.
- DORMAN, H.J.D.; SURAI, P.; DEANS, S.G. *In vitro* antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. **J. Essent. Oil Res.**, v.12, p.241-248, 2000.
- DUARTE, M.C.T. **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil**. MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais, 7/10/2006 . Disponível em: [http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_05\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf). Acesso em: 04/10/2007
- FAGUNDES, H. & OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *staphylococcus aureus* e suas aplicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p. 1315-1320, jul-ago 2004.
- FONSECA, L. F. L.& SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
- FONSECA, M.F.A.C. Cenário da Produção e da Comercialização dos Alimentos Orgânicos. In: FERNANDES, E.N.; BRESSAN, M.; VILELA, D. **Produção Orgânica de leite no Brasil**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 93-111.
- GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; et al. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. **Phytotherapy Research**. v.18, p.990-995, 2004.

- HELAL, L.G. & STELATO, M.M. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare*. In: XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC- 29 e 30 de setembro de 2009. Campinas. *Anais*, Campinas, 2009.
- HILLERTON, J.E. & BERRY, E.A. Treating mastitis cow – a tradition or an archaism. **J. of Applied Microbiol.**, Washington, v. 98, p. 1250-1255, 2005.
- KELLER, B.; SCHEIBL P.; BLECKMANN E.; HOEDEMAKER M. Differentiation of yeasts in mastitis milk. **Mycoses**, v.1, p.17-19, 2000.
- KRUKOWSKI, H. & SABA, L. Bovine mycotic mastitis (A Review). **Folia Veterinaria**, v.47, n.1, p.3-7, 2003.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. VACCARI, E.M.H.; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**. 9ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.
- LADEIRA SRL. Mastite Bovina. In: RIET-CORREA FA, SCHILD AL, MÉNDEZ, MC. **Doenças de ruminantes e equinos**. Pelotas: Universitária/UFPeL, 1998, p.248-260.
- LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J.; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J. Appl. Microbiol.**, Washington, v. 91, p. 453-462, 2001.
- MEINERZ, A. R. M.; SCHUCH, L. F. D.; CLEFF, M. B.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B.; RODRIGUES, M. R. A. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* and *Sporothrix schenckii* against *Origanum vulgare* essential oil. In: 29th International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda Fierecongressi, Riva del Garda, Italy, 29 May – 2 June, 2006. *Anais*, Riva del Garda.
- MIGUEL, M. D. & MIGUEL, G. O. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999, 115p.
- MITIDIERO, A.M.A. **Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira: avaliação dos aspectos sanitários e de produção**. 2002. 119f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas)- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- OGARA, E.A.; HILL, D.J.; MASLIN, D.J. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v. 66, p. 2269-2273, 2000.
- PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N.; PICCOLLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico



através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência Agrotec**, Lavras, v.30, n.4, p.731-738, jul/ago.,2006.

PINTO, M.R.R.; LADEIRA, S.L.; CARDOSO, C.M.; GOMES, F.R. Mastite bovina: Ocorrência de agentes etiológicos e resistência a antimicrobianos. In: XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado – RS, 1997. **Anais**, Gramado, p.162.

RAIA-JÚNIOR, R.B. **Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de resíduos de antimicrobianos no leite avaliados em protocolos terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros**. 2006.85f Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo. São Paulo,2006.

Rehder VLG, Machado ALM, Delarmelina C, Sartoratto A, Figueira GM, Duarte MCT. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 67-71, 2004

SANTOS, M.V. Impacto econômico da mastite bovina. **A Hora Veterinária**, v.22, n.131, p. 46-50, 2003.

SANTOS, R.C. & MARIN, J.M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v.159, p. 251–253,2005.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES,J.F.; SCHRAMM, R.C. ; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S.Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **R. bras. Agrociência**, v. 9, n. 3, p.287-290, jul-set, 2003.

SCHALM, O.W.; CARROLL, E.J.; JAIN, N.C. **Bovine Mastitis**. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1971, 360p.

SEARS, P.M.; GONZÁLEZ R.N.; WILSON D.J.; HAN H.R. Procedures for mastitis diagnosis and control. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v.9, p.445-468, 1993.

TAPONEN, S. & PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*?**Veterinary Microbiology**, v.134, p.29-36, 2009.

TOZZETTI, L.R.; BATAIER, M.B.N.; ALMEIDA, L.R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura. **Revista Científica Eletônica De Medicina Veterinária**. Ano VI, n.10, Janeiro de 2008.

VICHI, S.; ZITTERL-EGLESEER, K.; JUGI, M.; FRANZ, C. **Nahrung-Food**, v.45,101, 2001.

WELLENBERG, G.J.; VAN DER POEL, W.H.M.; VAN OIRSHOT, J.T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 88, p. 27-45, 2002.

WUNDER JÚNIOR, E.A. **Mastite Bovina: avaliação microbiológica do leite, com ênfase nas leveduras isoladas de casos de mastite clínica e subclínica, na região do planalto médio-RS, em 2005 e 2006.** 2007. 68f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.