

MAGDA FERNANDES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Lippia origanoides* KUNTH
(VERBENACEAE) CONTRA *Staphylococcus* spp. CAUSADORES DE
MASTITE BOVINA**

RECIFE/PE

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

MAGDA FERNANDES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Lippia origanoides* KUNTH
(VERBENACEAE) CONTRA *Staphylococcus* spp. CAUSADORES DE
MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientadora: Evilda Rodrigues de Lima

Co-orientadora: Eulina Tereza Nery Farias

RECIFE/PE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F363a Fernandes, Magda
 Atividade antimicrobiana de *Lippia organoides* Kunth (Verbenaceae) contra *Staphylococcus* spp. causadores de mastite bovina / Magda Fernandes. - 2022.
 62 f. : il.
- Orientadora: Evidla Rodrigues de Lima.
 Coorientadora: Eulina Tereza Nery Farias.
 Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Recife, 2022.
1. Etnoveterinária. 2. Fitoterapia. 3. Plantas medicinais. 4. Alecrim pimenta. 5. Glândula mamária. I. Lima, Evidla Rodrigues de, orient. II. Farias, Eulina Tereza Nery, coorient. III. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

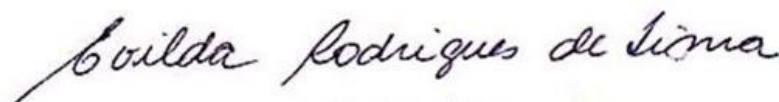
**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Lippia origanoides* KUNTH
(VERBENACEAE) CONTRA *Staphylococcus* spp. CAUSADORES DE
MASTITE BOVINA**

Dissertação de Mestrado elaborada por

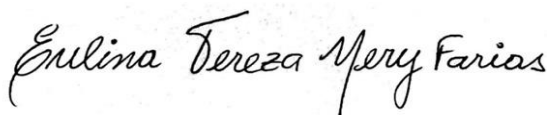
MAGDA FERNANDES

Aprovada em 12/04/2022

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. EVILDA RODRIGUES DE LIMA
Orientador – Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE



Profa. Dra. EULINA TEREZA NERY FARIAS
Co-orientadora – Centro Universitário Facol – Unifacol



Dra. VANESSA CARLA LIMA DA SILVA

Hospital Pet Dream – Recife/PE

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai, Geraldo Fernandes (in memoriam), à minha vó, Helena Tetéo (in memoriam), e
à minha tia, Geralda Fernandes (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir mais uma realização em minha vida.

A família, que mesmo diante de tanta dificuldade sempre me apoiou, apesar das perdas dos últimos três anos sempre estamos unidos e superando os desafios da vida.

A minha orientadora e co-orientadora, por todo suporte durante o mestrado.

Aos meus professores, do mestrado, da residência, da graduação, do ensino médio e do ensino fundamental, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço também aos meus colegas e amigos que conquistei durante todo o caminho até aqui. Em especial aos amigos que fiz em Recife, eles tornaram esses dois anos mais leves.

Aos colegas do Cenapesq, do LADIC e do INSA, que me ajudaram imensamente na realização deste trabalho.

Aos meus companheiros de quatro patas, vocês merecem todo meu carinho.

Por fim, agradeço a CAPES, UFRPE e ao CNPQ pelo suporte e apoio à minha pesquisa de mestrado.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Lippia origanoides* KUNTH (VERBENACEAE) CONTRA *Staphylococcus* spp. CAUSADORES DE MASTITE BOVINA

Resumo

A mastite é a enfermidade que acarreta maior prejuízo em rebanhos leiteiros, pois ocasiona a diminuição da produção de leite, descarte de animais e do leite infectado ou contaminado com resíduos. Para controlar tal infecção, tratamentos à base de antibióticos são realizados sem recomendação médica e isso está favorecendo a seleção de microrganismos resistentes. A utilização de extrato de plantas para combater infecções das glândulas mamárias já é estudada a fim de reduzir o uso indiscriminado dos antimicrobianos. A *Lippia origanoides* é uma planta rica em óleos essenciais e outras substâncias bioativas que possuem forte potencial antimicrobiano, apresentando inibição de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., considerados importantes causadores de infecções em humanos e nos animais. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a composição fitoquímica e a atividade antimicrobiana do extrato de *Lippia origanoides* contra bactérias isoladas de casos de mastite em bovinos. Após obtenção do extrato hidroalcolico, uma análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada para identificar os compostos majoritários. A atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo, e para os antibióticos convencionais, pelo teste de disco-difusão, contra bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. isoladas de casos de mastite em bovinos. A análise de HPLC revelou três compostos majoritários que pertencem ao grupo dos flavonoides. O extrato apresentou atividade antibacteriana frente a todas as amostras testadas, com concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima variando de 187,5 a 1.500 µg/mL. No teste de disco-difusão foi observado perfil de resistência aos antibióticos penicilina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina e cefoxitina, com destaque para o beta lactâmico penicilina que foi o antibiótico com maior índice de resistência. O extrato da *L. origanoides* possui alto teor de flavonoides e mostrou resultado promissor como composto antibacteriano, podendo ser uma alternativa de baixo custo para o tratamento de mastite em bovinos.

Palavras-chave: *Etnoveterinária; Fitoterapia; Plantas medicinais; Alecrim pimenta; Glândula mamária.*

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Lippia organoides* KUNTH (VERBENACEAE) AGAINST *Staphylococcus* spp. CAUSES OF BOVINE MASTITIS

Abstract

Mastitis is the disease that causes the greatest damage in dairy herds, as it causes a decrease in milk production, animal disposal and milk infected or contaminated with residues. To control this infection, antibiotic-based treatments are performed without medical advice and this is favoring the selection of resistant microorganisms. The use of plant extracts to fight infections of the mammary glands is already studied in order to reduce the indiscriminate use of antimicrobials. *Lippia organoides* is a plant rich in essential oils and other bioactive substances that have strong antimicrobial potential, showing inhibition of bacteria of the genus *Staphylococcus* spp., considered important causes of infections in humans and animals. Thus, the objective of this work was to evaluate the phytochemical composition and antimicrobial activity of *Lippia organoides* extract against bacteria isolated from cases of mastitis in cattle. After obtaining the hydroalcoholic extract, a high performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed to identify the major compounds. The antimicrobial activity of the extract was evaluated by the broth microdilution technique, and for conventional antibiotics, by the disk-diffusion test, against bacteria of the genus *Staphylococcus* spp. isolated from cases of mastitis in cattle. HPLC analysis revealed three major compounds that belong to the flavonoid group. The extract showed antibacterial activity against all samples tested, with minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration ranging from 187,5 to 1.500 µg/mL. In the disk diffusion test, a resistance profile to the antibiotics penicillin, tetracycline, erythromycin, clindamycin and cefoxitin was observed, with emphasis on the β-lactam penicillin, which was the antibiotic with the highest resistance rate. The extract of *L. organoides* has a high content of flavonoids and has shown promising results as an antibacterial compound, and may be a low-cost alternative for the treatment of mastitis in cattle.

Keywords: *Ethnovet; Phytotherapy; Medicinal plants; Rosemary pepper; Mammary gland.*

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 8 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 11 |
| 2.1 | Mastite | 11 |
| 2.1.1 | Agentes etiológicos da mastite..... | 12 |
| 2.1.2 | Diagnóstico da mastite clínica e subclínica | 13 |
| 2.1.3 | Tratamento de resistência antimicrobiana..... | 15 |
| 2.2 | Mastite e saúde pública | 16 |
| 2.3 | Uso de plantas medicinais como antimicrobiano | 18 |
| 2.3.1 | Plantas medicinais e mastite | 19 |
| 2.4 | <i>Lippia origanoides</i> | 21 |
| 2.4.1 | Composição química dos óleos essenciais e extratos | 22 |
| 2.4.2 | Uso popular e propriedades farmacológicas | 25 |
| 2.4.3 | Atividade antibacteriana de <i>L. origanoides</i> | 27 |
| 2.4.3 | Atividade antibacteriana contra bactérias causadoras de mastite | 29 |
| 3 | OBJETIVOS | 30 |
| 3.1 | Objetivos geral | 30 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 30 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 4.1 | Coleta e identificação botânica da espécie | 31 |
| 4.2 | Elaboração do extrato hidroalcolico da planta | 31 |
| 4.3 | Análise de Cromatografia líquida de alta eficiência | 32 |
| 3.4 | Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> | 32 |
| 3.4.1 | Teste de microdiluição em caldo do extrato de <i>L. origanoides</i> | 32 |
| 3.4.2 | Teste de disco-difusão..... | 33 |
| 4.5 | Análise estatística | 34 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 5.1 | Cromatografia líquida de alta eficiência | 35 |
| 5.2 | Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> | 38 |
| 6 | CONCLUSÕES | 44 |
| 7 | REFERENCIAS | 45 |

1 INTRODUÇÃO

Nas fazendas leiteiras, a mastite é a doença que traz maiores desafios à produção de leite, pois acarreta grandes prejuízos ao produtor, devido à diminuição da secreção láctea, descarte do leite durante o tratamento e gastos com medicamentos e honorários veterinários (LOPES *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2018). Trata-se de uma inflamação de origem complexa e multifatorial, na qual múltiplos patógenos como bactérias, fungos, algas e vírus, podem estar envolvidos (BRITO e BRITO, 2000). Entretanto, as bactérias são os principais agentes causadores de mastite clínica e subclínica (SAAB *et al.*, 2014; KUROSAWA *et al.*, 2020; FONSECA *et al.*, 2021).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são consideradas o agente bacteriano mais prevalente nos casos de mastite bovina (SAAB *et al.*, 2014; ZIMERMANN e ARAÚJO, 2017; KUROSAWA *et al.*, 2020), sendo o *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), *Staphylococcus aureus*, a espécie mais frequentemente isolada (LIMA *et al.*, 2020). Além deste, os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) estão cada vez mais presentes nos quadros de infecções da glândula mamária, e já constituem a maioria dos isolados (SAAB *et al.*, 2014; KUROSAWA *et al.*, 2020).

Essas bactérias representam uma ameaça à saúde pública, devido ao padrão de resistência antimicrobiana que vêm desenvolvendo ao longo dos anos (ZIMERMANN e ARAÚJO, 2017; CARVALHO *et al.*, 2018; SANTANA *et al.*, 2022) e pela possibilidade de transmissão de bactérias multirresistentes para o homem através do consumo de leite e de produtos lácteos (PEREIRA V. *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018; BIETRIX *et al.*, 2019). Além disso, os *Staphylococcus* spp. possuem vários genes codificadores de enterotoxinas, e são capazes de causar surtos de intoxicação alimentar em humanos (KÉROUANTON *et al.*, 2007; VANCRAEYNEST *et al.*, 2006; PEREIRA V. *et al.*, 2009).

A frequente utilização de antibióticos para controle e tratamento da mastite bovina, tem ocasionado seleção de cepas bacterianas resistentes aos principais antibióticos utilizados em tratamentos veterinários e humanos (WALTHER e PERRETEN, 2007; CARVALHO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018; BEITRIX *et al.*, 2019). O uso incorreto e/ou indiscriminado de antibióticos é apontado como o principal fator responsável pelo aumento da resistência

microbiana aos antibióticos (PEREIRA A. *et al.*, 2009; KREWER *et al.*, 2013; ZIMERMANN e ARAÚJO, 2017; KUROSAWA *et al.*, 2020).

Em contrapartida, vem crescendo a utilização de tratamentos alternativos para controle de mastite nos rebanhos. Essas terapias são empregadas principalmente em fazendas destinadas à produção de leite orgânico (RUEGG, 2009; TRONCARELLI *et al.*, 2013). Terapia antibacteriana à base de extrato de plantas (RODRIGUES *et al.*, 2013; NADER *et al.*, 2018; OLANDA *et al.*, 2019), homeopatia (ALMEIDA *et al.*, 2011; JESUS e COUTINHO 2017; PAIM *et al.*, 2020), ozônioterapia (OGATA e NOGATA, 2000; PEREIRA *et al.*, 2003; QUINTANA *et al.*, 2019), e ainda, utilização de óleos essenciais (POZZO *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2016; FURLANI *et al.*, 2021) para tratamentos de mastite, já são estudadas e apresentam bons resultados.

A *Lippia organoides*, conhecida também pela sinonímia de *Lippia sidoides*, é um arbusto rico em óleos essenciais e compostos não voláteis, os quais possuem inúmeras propriedades terapêuticas (STASHENKO *et al.*, 2010). Essa planta é alvo de diversos estudos, por possuir potencial antimicrobiano (LEAL *et al.*, 2019; GÓMEZ-SEQUEDA *et al.*, 2020; FURLANI *et al.*, 2021), antifúngico (CORDERO *et al.*, 2018; BRANDÃO *et al.*, 2021) antioxidante (DAMASCENO *et al.*, 2018; MAR *et al.*, 2018) analgésico e anti-inflamatório (OLIVEIRA *et al.*, 2014), antisséptico (MARCELO *et al.*, 2020), tripanocida (BALDISSERA *et al.*, 2017), inseticida e acaricida (MAR *et al.*, 2018; ALCALA-OROZCO *et al.*, 2019), e ainda, antimutagênico, podendo assim ser usada na terapia anticancerígena (VICUÑA *et al.*, 2010).

A atividade inibitória da *L. organoides* vem sendo testada contra bactérias comumente envolvidas em casos de mastite clínica e subclínica, apresentando resultados favoráveis (NADER *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2017; FURLANI *et al.*, 2021). A inibição de bactérias resistentes, como o *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), e potencialização de antibióticos convencionais frente a bactérias multirresistentes, são uma comprovação do potencial terapêutico dessa espécie (BARRETO *et al.*, 2014a; BARRETO *et al.*, 2014b; GÓMEZ-SEQUEDA *et al.*, 2020).

A utilização de extratos de plantas como antimicrobiano é considerado um método promissor, pelo baixo custo e pela grande diversidade de espécies existentes com esse potencial (PEREIRA A. *et al.*, 2009; MESQUITA *et al.*, 2017). Desta forma, o objetivo desse

trabalho foi avaliar os componentes bioativos presentes na *Lippia origanoides* e a atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de casos de mastite bovina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite

A mastite é considerada a principal enfermidade inflamatória em rebanhos leiteiros, e sua ocorrência leva a alterações tanto na glândula mamária quanto no leite, alterando suas características físico-químicas e organolépticas (SIMÕES e OLIVEIRA, 2012). Além disso, gastos com descarte do leite, serviços e medicamentos veterinários, e descarte de animais devido à mastite, somam importantes prejuízos para o produtor (LOPES *et al.*, 2012).

Essa enfermidade pode ser classificada em mastite clínica ou subclínica. Na mastite clínica, é possível observar alterações no leite e na glândula mamária, já a mastite subclínica, considerada a mais prevalente, não prova alterações visíveis no leite nem na glândula mamária, tornando difícil o diagnóstico. Sendo assim, é necessário a realização de exames complementares para diagnosticá-la (ROYSTER e WAGNER, 2015).

Os sinais clínicos da mastite clínica incluem, inchaço, hiperemia, enrijecimento e dor durante a palpação no quarto mamário afetado, alterações como assimetria ou atrofia do além de presença de grandes grumos e pus no leite (LIMA *et al.*, 2020). A mastite clínica ainda pode ser classificada em superaguda, aguda, subaguda, crônica e gangrenosa (SIMÕES e OLIVEIRA, 2012).

A forma superaguda é caracterizada por intensa inflamação, e geralmente são observados sinais sistêmicos como febre, prostração, anorexia, dentre outros. Já na forma aguda estes sinais sistêmicos são mais discretos e a evolução é mais lenta. Infecções subagudas possuem sinais inflamatórios discretos, porém é possível a visualização de alterações no leite, como a presença de grumos no teste da caneca de fundo preto. A forma crônica se destinge por infecção persistente, que podem perdurar dias meses ou anos, levando à fibrose dos quartos acometidos, ou até atrofia, e presença de fístula. Na forma gangrenosa, pode haver sangramentos, alterações de cor do tecido afetado, variando do escuro ao púrpuro-azulado, e ausência de sensibilidade (SIMÕES e OLIVEIRA, 2012).

A mastite subclínica é a mais prevalente nos rebanhos leiteiros (SANTOS, 2011; LIMA *et al.*, 2020; MESQUITA *et al.*, 2020). Por não apresentar sinais clínicos visíveis a olho nu, animais doentes podem passar despercebidos alastrando-se no rebanho, infectando outras vacas, causando alterações na qualidade e produção leiteira (MASSOTE *et al.*, 2019).

Contudo, uma alta contagem de células somáticas no leite pode indicar a presença dessa enfermidade (COSTA *et al.*, 2019). O *California Mastitis Test* (CMT) e a contagem de células somáticas do leite (CCS) são utilizados com sucesso para o diagnóstico de mastite subclínica (SANTOS, 2011; LIMA *et al.*, 2020; MESQUITA *et al.*, 2020).

Alguns fatores de risco podem ser associados ao aparecimento de mastite no rebanho, como idade avançada dos animais, úbere penduloso e estágio avançado da lactação (ALMEIDA, 2020), além da não realização de desinfecção dos tetos, antes e após a ordenha, e hábitos de higiene inadequados dos ordenhadores (KREWER *et al.*, 2013).

2.1.1 Agentes etiológicos da mastite

Vários microrganismos podem causar infecções da glândula mamária, como bactérias, fungos e algas, porém, as bactérias são consideradas os agentes mais envolvidos nos casos de mastite clínica e subclínica (MASSOTE *et al.*, 2019). Infecções da glândula mamária ainda podem ser classificadas de acordo com a etiologia, em ambiental e contagiosa (MASSOTE *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

Na mastite ambiental, os patógenos causadores estão presentes no ambiente de ordenha, nas fezes dos animais, na água contaminada e no local onde os animais se deitam. Normalmente a contaminação é atribuída à falta de higiene ambiental e no momento da ordenha, cuja transmissão pode acontecer durante a ordenha, pelas mãos do ordenhador ou teteiras sujas, ou após a ordenha, quando os animais se deitam em ambientes contaminados (MASSOTE *et al.*, 2019).

Entre os patógenos mais envolvidos nos casos de mastite ambiental estão as bactérias *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, e a *Escherichia coli*, além de *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia* spp., outros *Streptococcus* spp. e outros microrganismos como a microalga *Prototheca zopfii* (MASSOTE *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

Já a mastite contagiosa, é provocada por microrganismos residentes no interior da glândula mamária, e a principal fonte de disseminação é através dos equipamentos de ordenha ou pelas mãos dos ordenhadores (ALMEIDA, 2020). É considerada a causadora de maiores problemas dentro da produção leiteira, e sua ocorrência está associada ao aumento da CCS no leite (FONSECA *et al.*, 2021).

Os principais microrganismos envolvidos nos casos de mastite contagiosa são o *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Actinomyces pyogenes* (MASSOTE *et al.*, 2019), sendo o *Staphylococcus* spp. o agente mais isolado em casos de mastite clínica e subclínica (KREWER *et al.*, 2013; ZIMERMANN e ARAÚJO, 2017; ALMEIDA, 2020).

Do gênero *Staphylococcus*, o *S. aureus* é a espécie mais identificada, e sua prevalência pode chegar a 76,6% dos casos (COSTA *et al.* 2019). Mastite causada por *S. aureus* provoca um aumento da contagem de células somáticas no leite, o que afeta a qualidade desse alimento e de seus derivados (COSTA *et al.*, 2019). Além disso, infecções causadas por *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) também constituem a maioria dos casos mastite (SAAB *et al.*, 2014; KUROSAWA *et al.*, 2020). Santos (2011) observaram grande diversidade de SCN, isolados de casos mastite em rebanhos bovinos leiteiros da região sul de Minas Gerais, sendo as mais frequentes *Staphylococcus hyicus* (15,0%), *Staphylococcus chromogenes* (12,5%), *Staphylococcus gallinarum* (12,5%), *Staphylococcus lentus* (12,5%) e *Staphylococcus epidermidis* (10,8%).

2.1.2 Diagnóstico da mastite clínica e subclínica

O diagnóstico da mastite clínica pode ser realizado pelo exame físico do animal e da glândula mamária, por meio da inspeção, palpação, e aferição dos parâmetros clínicos. Afim de observar alterações sistêmicas, ou no quarto mamário, tais como assimetria, aumento de volume ou atrofia, verificação de endurecimento e sensibilidade local à palpação, e avaliação das características do leite, como presença de grumos e pus (MAIOCHI *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2020).

Além disso, o teste da caneca de fundo escuro pode ser aplicado como uma ferramenta para o diagnóstico nos casos de mastite subaguda ou crônica, pois permite a visualização de alterações no leite que poderiam passar despercebidas pelo produtor. Esse teste deve ser realizado antes de toda ordenha, e consiste na retirada dos quatro primeiros jatos de leite numa superfície escura e telada, a fim de observar qualquer alteração nas características do leite, como grumos, coágulos, pus, sangue ou leite aquoso (MAIOCHI *et al.*, 2019).

A mastite subclínica apresenta maior desafio diagnóstico, e sua ocorrência está intimamente relacionada com o aumento das células somáticas no leite, uma vez que o processo inflamatório instalado promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias, as quais

estimulam o recrutamento de leucócitos do sangue para o interior da glândula mamária (COSTA *et al.*, 2019).

O CMT é um teste que avalia indiretamente a quantidade de células somáticas presentes no leite, através da ação de um reagente que atua rompendo o citoplasma e núcleo das células, provocando a liberação do material genético no meio. A interação dos ácidos nucléicos com o reagente forma uma viscosidade que é medida em escores, quanto maior a viscosidade, maior a quantidade de células somáticas presentes na amostra (FONSECA *et al.*, 2021; MAIOCHI *et al.*, 2019).

Por ser um exame de aplicação rápida e fácil, o CMT tem se mostrado um teste de alta aplicabilidade no controle e diagnóstico da mastite subclínica nos rebanhos leiteiros (FONSECA *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2020). A falta de monitoramento do rebanho por meio de CMT é considerada um fator de risco para o aumento da quantidade de células somáticas no rebanho, e conseqüentemente, piora da qualidade do leite (REIS *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2019).

Outra forma de avaliação indireta das células somáticas é o Wisconsin Mastitis Test (WMT), o qual pode ser considerado um aprimoramento do CMT, com a finalidade de eliminar a subjetividade na interpretação do resultado, nesse teste o resultado é expresso em milímetros, correlacionado esse número com a quantidade de células somáticas (MAIOCHI *et al.*, 2019).

A contagem direta das células somáticas presentes no leite pode ser realizada manualmente, através da microscopia, porém esta técnica demanda muito tempo, além de apresentar grande variação de interpretação por diferentes observadores. Já a contagem eletrônica, é um método automático e de fácil processamento, como por exemplo por meio da citometria de fluxo, contudo é considerado caro sendo utilizado principalmente em países desenvolvidos (GONÇALVES *et al.*, 2018).

Embora ambas técnicas apresentem limitações, uma contagem precisa de células somáticas do leite, realizada de forma individual ou em conjunto, é uma das melhores ferramentas para o monitoramento da saúde do úbere do rebanho. Um leite com contagem de células menor que 100.000 cel/mL provavelmente não se trata de um leite mastítico, enquanto que uma contagem superior a 200.000 cel/mL geralmente é indicativo da ocorrência de mastite subclínica naquele quarto mamário (MAIOCHI *et al.*, 2019).

A cultura microbiológica do leite associada ao antibiograma é considerada o exame definitivo para o diagnóstico da mastite. Nele é possível isolar o agente causador bem como definir a melhor terapia a ser empregada, pois no antibiograma é possível identificar quais drogas são capazes de inativar aquele patógeno (FONSECA *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2020). Embora essa técnica envolva custo com equipamentos e equipe qualificada para sua realização, a cultura microbiana e o antibiograma são técnicas que devem ser utilizadas sempre que possíveis para o diagnóstico da mastite (KUROSAWA *et al.*, 2020).

2.1.3 Tratamento e resistência antimicrobiana

O tratamento das afecções da glândula mamária geralmente é à base de antibióticos, todavia, na maioria das vezes, essa escolha não é baseada no isolamento do agente e nos testes de sensibilidade *in vitro*, apenas nos aspectos clínicos da enfermidade (KUROSAWA *et al.*, 2020). Além disso, o uso indiscriminado, equívocos de dosagem e de duração do tratamento tem provocado eliminação de microrganismos sensíveis e seleção de patógenos resistentes, prejudicando assim, o sucesso do tratamento e aumentando as chances de recidivas (JAMALI *et al.*, 2018; KUROSAWA *et al.*, 2020).

A terapia antimicrobiana mais indicada é realizada através da administração intramamária das drogas. Os antibióticos recomendados para tratamentos realizados durante a lactação são os do grupo dos β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) e dos macrolídeos. Para o tratamento de vacas durante o período de secagem são utilizadas doses maiores e as formulações apresentam maior tempo de permanência no úbere, sendo os β -lactâmicos os antibacterianos de escolha (ROYSTER e WAGNER, 2015). Todavia, padrões de resistência a antibióticos vêm sendo observado ao longo dos anos, principalmente aos β -lactâmicos (MENDONÇA *et al.*, 2012; ALMEIDA, 2020; KUROSAWA *et al.*, 2020).

Os *Staphylococcus* spp. são frequentemente resistentes aos β -lactâmicos e o principal mecanismo está relacionado a produção de enzimas β -lactamases por essas bactérias. O gene *Bla Z* é o responsável pela codificação dessas enzimas, contudo, múltiplos mecanismos estão envolvidos na resistência estafilocócica aos β -lactâmicos (MENDONÇA *et al.*, 2012).

As bombas de efluxo também são consideradas um importante mecanismo de resistência à antibióticos, principalmente em *S. aureus*, e consistem em transportadores de membrana que são capazes de expelir o antimicrobiano, diminuindo sua concentração intracelular e aumentando a sobrevivência bacteriana (ZLOH *et al.*, 2003; SCHINDLER *et al.*, 2013). Outro

mecanismo desenvolvido, é a produção de proteínas de ligação às penicilinas, PBP2a e PBP2', as quais possuem baixa afinidade pelos β -lactâmicos, impedindo sua ligação com a bactéria (MENDONÇA *et al.*, 2012). Esse mecanismo de resistência é conferido por um elemento genético móvel, denominado cassete cromossômico (SCC *mec*), que contém o gene *mec A*, codificante dessa proteína, além de outros genes como o *mec C*, que também está envolvido nesse mecanismo de resistência aos β -lactâmicos (BIETRIX *et al.*, 2019).

A produção de enzimas de ligação às penicilinas é o mecanismo que confere resistência a meticilina em *Staphylococcus aureus*, chamado MRSA (MENDONÇA *et al.*, 2012; BIETRIX *et al.*, 2019). Infecções por MRSA podem ser encaradas como um problema de saúde pública, pois essas bactérias são comumente identificadas como causadoras de infecções hospitalares. (MASSOTE *et al.*, 2019). Além disso, os MSRA são carregadores de múltiplos genes de resistência a antibióticos, muitas vezes tornando a terapia complicada (KUMAR e VARELA, 2012; OTTO, 2012).

Segundo Bietrix *et al.* (2019), isolados de MRSA que carregam genes de resistência são capazes de se disseminar amplamente entre vacas leiteiras, podendo persistir no rebanho por vários anos após serem introduzidos neste ambiente.

O isolamento e identificação do agente causador de mastite, bem como, a realização de testes de sensibilidade *in vitro* são recomendados a fim de reduzir o uso de antibióticos ineficazes, porém, essa é uma prática pouco comum nas fazendas de produção leiteira (ZIMERMANN e ARAÚJO, 2017; KUROSAWA *et al.*, 2020). Além de tudo, medidas de controle, como boas práticas de ordenha, antissepsia e higiene, são aconselhadas para reduzir os casos de mastite nos rebanhos (KREWER *et al.*, 2013; ALMEIDA, 2020).

2.2 Mastite e saúde pública

Staphylococcus aureus e *Staphylococcus* coagulase negativo multirresistentes, são frequentemente isoladas do leite de animais com mastite (MENDONÇA *et al.*, 2012; KUROSAWA *et al.*, 2020). Há uma grande preocupação por parte dos profissionais de saúde humana e animal sobre a transmissão desses microrganismos ou de genes de resistência para seres humanos através da ingestão de leite e/ou derivados contaminados, principalmente de estirpes como o MRSA (SILVA *et al.*, 2018; BIETRIX *et al.*, 2019).

Carvalho *et al.*, (2018), ao avaliar a qualidade do leite cru comercializado num município do Maranhão, isolaram *Staphylococcus* spp. de todas as amostras testadas, das quais, aproximadamente 70% foram identificadas como *S. aureus* resistentes à maioria dos antimicrobianos testados.

O leite e produtos lácteos é um dos principais alimentos envolvidos em doenças transmitidas por alimento (DTA), e o *S. aureus* é o segundo patógeno mais identificados nos casos de intoxicação alimentar (COSTA e DIAS, 2013). Essa bactéria, além de apresentar resistência à vários antibióticos, também são capazes de produzir vários tipos de toxinas, causando surtos de toxinfecção (PEREIRA V. *et al.*, 2009; COSTA e DIAS, 2013).

De acordo com Pereira V. *et al.* (2009), é extremamente necessário prevenir a presença de cepas de *S. aureus* em alimentos, pois estes, são capazes de carregar múltiplos genes codificantes de enterotoxinas termoestáveis, além de vários outros fatores de virulência. Um estudo realizado com isolados de carne, produtos cárneos, leite, produtos lácteos e de vacas com mastite, revelaram que 69% dos *S. aureus* isolados mostraram-se enterotoxigênicos, apresentando um ou mais genes codificantes de enterotoxinas e, sea seg, sea seg sei e seg sei, foram perfis genético mais comuns; além disso, 38% dos isolados foram resistentes à oxacilina, ou seja, MRSA, e apresentaram outros fatores de virulência, como produção de hemolisinas e gelatinases (PEREIRA V. *et al.*, 2009).

Vale ressaltar ainda que cepas de MRSA podem transferir resistência fenotípica e genotípica para cepas de *S. aureus* sensíveis a meticilina (MSSA), disseminando a resistência a antibióticos entre diferentes cepas de *S. aureus* (BRITUS *et al.*, 2017). Além do mais, a demonstração de transferência de resistência entre cepas de *S. aureus* avícolas para cepas de *S. aureus* humanas, indica que a disseminação de genes de resistência a antibióticos pode acontecer entre cepas de diferentes ecossistemas (KHAN *et al.*, 2000).

Lobato e De Los Santos (2019), sugerem que a presença de microrganismos resistentes a antimicrobianos dentro dos sistemas de produção de leite, é provavelmente uma consequência do uso intensivo e incorreto de drogas antimicrobianas para tratamento da mastite. A utilização de antibióticos e preparações intramamárias, muitas vezes realizadas pelo proprietário sem a prescrição do médico veterinário, contribui para alta incidência de bactérias resistentes a antibióticos em casos de mastite, e consequente transferência de resistência mediada por plasmídeos entre essas bactérias (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2014).

2.3 Uso de plantas medicinais como antimicrobiano

Conhecimentos populares sobre a utilização de plantas medicinais para tratamento e controle de infecções é uma prática antiga e passada de geração em geração (BEZERRA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2017). Os fitoterápicos se tornam uma boa opção para tratamento de enfermidades, pois além de proporcionar o efeito medicinal, são mais acessíveis, além de tudo, o Brasil possui uma rica biodiversidade, possibilitando uma exploração científica que contribua para o conhecimento do brasileiro sobre a utilização de plantas medicinais que podem auxiliar na sua saúde e qualidade de vida (REMPEL *et al.*, 2019).

A busca por tratamentos alternativos para as mais diversas enfermidades tornou-se cada vez mais necessária, a fim de evitar efeitos colaterais das terapias convencionais, ou até mesmo pelo alto custo das medicações. (SPEROTTO, 2010). Além disso, os altos índices de resistência aos antibióticos impulsionou a busca por novas formulações capazes de controlar e/ou combater o crescimento bacteriano (SOUZA *et al.*, 2017; SPEROTTO, 2010).

A utilização de extratos de plantas como antimicrobiano vem sendo estudada ao longo dos anos, e é considerada uma alternativa promissora para redução do uso de antibióticos (SOUZA *et al.*, 2017). Diversos compostos bioativos sintetizados por essas plantas, já foram determinados como potentes agentes antimicrobianos, e vários estudos têm demonstrado cientificamente, a atividades de plantas tradicionais frente a microrganismos patogênicos resistentes a antimicrobianos, bem como a capacidade de inibir fatores de virulência, modular a resistência aos antibióticos, e contribuição sinérgica com os antibióticos atuais (MICKYMARAY, 2019).

Um estudo realizado por Mesquita *et al.* (2017) sobre plantas da caatinga com potencial antimicrobiano, reuniu um total de 48 famílias botânicas como alvo de estudo, sendo a família Fabaceae a mais citada. Além da Fabaceae, outras famílias amplamente estudadas são Asteraceae, Lamiaceae e Euphorbiaceae, sendo o *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum*, *Lippia alba*, *Calophyllum brasiliense* e *Lippia sidoides* (sinônimo de *L. origanoides*) as espécies que mais se destacam (ZAGO, 2018).

A ação antimicrobiana é atribuída a uma série de composto presentes nas plantas, como polipeptídios, terpenoides, alcaloides, substâncias fenólicas e polifenóis, que incluem fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, e flavonoides, além de taninos e cumarinas (ALVES e MOREIRA, 2021). Além disso, esses compostos também podem apresentar outras funções,

como a atividade antioxidante, o que torna a planta um composto antimicrobiano com baixa toxicidade, e ainda, capaz de reduzir o estresse oxidativo celular (BRAZ *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2020).

Espécies como, o marmeleiro preto (*Croton nepetifolius*), o marmeleiro da caatinga (*Croton blanchetianus*) (FERREIRA *et al.*, 2020), a arnica (*Chaptalia nutans*) (SOUZA *et al.*, 2020), o amendoim-do-campo (*Sterculia striata*) (BRAZ *et al.*, 2020), o bacupari doce (*Garcinia brasiliensis*) (MAIA *et al.*, 2018), o alecrim pimenta (*Lippia origanoides*), e o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) (SOUZA *et al.*, 2017), são exemplos de plantas nativas do Brasil que possuem potencial antimicrobiano. Contudo, vale ressaltar que apesar da imensa diversidade genética vegetal do Brasil, grande parte ainda permanecer oculta à ciência, necessitando de estudos que avaliem suas propriedades farmacológicas (ALVES e MOREIRA, 2021).

2.3.1 Plantas medicinais e mastite

Várias espécies de plantas com potencial antibacteriano são descritas para uso em tratamentos veterinários (BEZERRA *et al.*, 2009). Muitos estudos são concentrados no uso plantas medicinais para tratamentos de mastite; espécies como *Mimosa tenuiflora* (BEZERRA *et al.*, 2009), *Stryphnodendron adstringens*, *Croton urucurana* (NADER *et al.*, 2018), *Punica granatum* (SANTOS *et al.*, 2014), *Baccharis dracunculifolia*, *Croton antisiphiliticus*, *Psidium cattleianum*, *Tagetes minuta*, *Psidium guajava* (KRUMMENAUER *et al.*, 2019), e *L. origanoides* (SOUZA *et al.*, 2017) apresentam atividade inibitória de bactérias relacionadas a infecções mastíticas.

Componentes extraído de plantas ou de seus óleos essenciais, são capazes de inibir o crescimento bacteriano, modular mecanismos de resistência e agir sinergicamente à antibióticos convencionais, sem causar toxicidade ou alterações nas células mamárias (MAIA *et al.*, 2018). Tanto a mastite quanto seu tratamento podem alterar o leite, que posteriormente será destinado ao consumo, desta forma é extremamente importante a busca por tratamentos alternativos que deixem o menor percentual de resíduos no produto consumido (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

O extrato etanólico da casca da jurema preta, *Mimosa tenuiflora*, uma planta muito comum na caatinga, mostrou efetiva atividade antimicrobiana contra bactérias isoladas de mastite clínica e subclínica, mesmo em bactérias que foram consideradas resistentes ao

antibiótico amoxicilina (BEZERRA *et al.*, 2009). No Sertão de Pernambuco, a ação antimicrobiana da jurema preta, juntamente com a da umburana, *Commiphora leptophloeos*, também foram comprovadas frente a isolados de mastite em pequenos ruminantes, nessa região, essa atividade agropecuária é considerada uma das mais importantes fontes de renda, principalmente na agricultura familiar (SOUSA *et al.*, 2020).

A maioria das pesquisas com uso de extrato de plantas para tratamento e controle da mastite são direcionadas para inibição de bactérias do gênero *Staphylococcus*, considerado um importante causador de infecções da glândula mamária e responsável pela maioria dos casos de resistência antimicrobiana (PEREIRA A. *et al.*, 2009; NADER *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2014).

Nader *et al.* (2018) avaliaram as frações e subfrações do extrato de *Croton urucurana* e verificaram atividade antibiofilme semelhante ao antibiótico vancomicina frente a cepas de *S. aureus* isolados de leite mastítico, além disso, a substância α -Costol, isolada do extrato, demonstrou o melhor efeito quando comparada aos demais tratamentos avaliados, reduzindo cerca de 6 ciclos logarítmicos da população bacteriana em biofilme.

Outro ponto importante é a ação sinérgica de extratos e óleos essenciais extraído de plantas com os antibióticos utilizados para o tratamento da mastite, como por exemplo, *Eucalyptus globulus* e *Juglans regia*, as quais mostraram uma sinergia interessante em combinação com penicilina G para a maioria das cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes à penicilina isolados de mastite bovina (GOMES *et al.*, 2019). Ácidos fenólicos e flavonoides presentes nessas plantas provavelmente agem inibindo as proteínas de ligação à penicilina 2a (PBP2a), um importante mecanismo de resistência a antibióticos de *S. aureus*, e isso faz com que essas plantas fortaleçam a bioatividade de antibióticos β -lactâmicos frente a essas bactérias (GOMES *et al.*, 2019).

Há várias evidências sobre o potencial terapêutico das plantas contra patógenos causadores de mastite, todavia, estudos adicionais ainda são necessários, como a avaliação da sua atividade e toxicidade *in vivo*, a fim de introduzir sua aplicação como uma alternativa natural aos antibióticos tradicionais, ou pelo menos como um agente que contribua para a redução do uso de antibióticos em fazendas leiteiras (QUEIROGA *et al.*, 2018; MORDMUANG *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019).

2.4 *Lippia origanoides*

O gênero *Lippia* é considerado um dos maiores gêneros da família Verbenaceae, compreendendo cerca de 100 espécies (MARX *et al.*, 2010; O'LEARY *et al.*, 2011). Possui ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo da Guiana até o norte da Argentina, e também na América Central (O'LEARY *et al.*, 2011). Algumas espécies também são encontradas no continente Africano (MARX *et al.*, 2010). O Brasil é considerado um grande centro de diversidade, albergando aproximadamente 70-75% das espécies desse gênero (VICCINI *et al.*, 2006).

De acordo com O'Leary *et al.* (2011), esse gênero é caracterizado por possuir flores geralmente axilares e capituliformes, com cálices principalmente bilobados e frutos secos, que se separam em duas unidades. Essas plantas vêm despertando interesse dos pesquisadores devido à grande quantidade de substâncias bioativas em sua composição (STASHENKO *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2015). Diversas espécies são investigadas acerca de seus compostos fitoquímicos e atividades farmacológicas como, *L. origanoides*, *L. alba*, *L. citriodora*, *L. graveolens*, *L. micromera*, *L. dulcis* etc. (ESCOBAR *et al.*, 2010; STASHENKO *et al.*, 2013; BALDISSERA *et al.*, 2017; CORDERO *et al.*, 2018).

A *L. origanoides* é uma planta bastante utilizada na medicina popular para tratamento de diversas enfermidades (OLIVEIRA *et al.*, 2014), e devido seu potencial terapêutico foi inserida como planta medicinal de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL., 2018). Sua ação farmacológica na maioria das vezes é atribuída a seu óleo essencial, contudo, várias substâncias bioativas presentes na planta são de importância medicinal (PASCUAL *et al.*, 2001; STASHENKO *et al.*, 2008; STASHENKO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

No Brasil, essa planta é conhecida popularmente como alecrim-pimenta, devido à característica picante do seu sabor (GUIMARÃES *et al.*, 2015), e como salva-de-marajó em algumas regiões (OLIVEIRA *et al.*, 2014). É um arbusto aromático ereto que possui caules quebradiços e ramificados, com folhas simples, opostas, ovais lanceoladas, aromáticas e decíduas, com pecíolo, e margens crenadas, apresentando tricomas brancos em ambas as faces. As flores são brancas e organizadas em inflorescências subglobosas ou subpiramidais, com cálice curto e membranoso. Possuem haste longa e axilar, podendo ser simples ou dupla. Possui frutos secos, distribuídos em torno de um eixo em grupos quadrados, com sementes pequenas (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

Tricomas glandulares presentes em *L. origanoides* são os responsáveis pela secreção de várias substâncias bioativas da planta (TOZIN *et al.*, 2015a; TOZIN *et al.*, 2015b). A maior densidade glandular está presente nas brácteas e sépalas, seguidas de pétalas e folhas (TOZIN *et al.*, 2015b). Ao todo, cinco morfotipos de tricomas já foram identificados; desses, quatro secretam substâncias lipídicas (TOZIN *et al.*, 2015a), o que torna essa planta rica em óleo essencial. Compostos fenólicos também são secretados pelos morfotipos I, II, III e V, e ainda, terpenos, polissacarídeos, proteínas, alcaloides e mucilagem são secretados por diferentes morfotipos de tricomas (TOZIN *et al.*, 2015a).

2.4.1 Composição química dos óleos essenciais e extratos

Há uma grande variação na composição química do óleo essencial de *L. origanoides*, cujos compostos majoritários variaram entre as populações, entre os indivíduos de uma mesma população e até entre os órgãos de um mesmo indivíduo (TOZIN *et al.*, 2015b). Stakenko *et al.* (2010), descreveram três quimiotipos do óleo essencial de *L. origanoides*. Eles possuem 25 constituintes em comum, mas diferem em seus componentes principais (STAKENKO *et al.*, 2010; STAKENKO *et al.*, 2013).

O quimiotipo A, caracterizado por um forte aroma cítrico, possui maior teor de *p*-cimeno (12%) e *trans*- β -cariofileno (9%) (STASHENKO *et al.*, 2010). Também é chamado quimiotipo rico em cariofileno (STASHENKO *et al.*, 2013). Nele também são encontrados outros hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos, como α -felandreno e β -felandreno, *p*-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, α -humuleno, óxido de cariofileno e α - e β -eudesmol. O segundo quimiotipo, quimiotipo B, é rico em carvacrol, e possui aroma semelhante ao orégano. Sua composição inclui principalmente compostos fenólicos oxigenados e hidrocarbonetos monoterpênicos, cujo composto majoritário é o carvacrol (40%) seguido do *p*-cimeno (13%), além de γ -terpineno e timol em menor concentração. Os óleos do quimiotipo C, rico em timol, também possuem fragrância típica de orégano, sua composição é semelhante ao tipo B, formado principalmente por compostos fenólicos oxigenados e hidrocarbonetos monoterpênicos, contudo, o timol (56%) é componente principal, sendo encontrado também o *p*-cimeno (9%) e γ -terpineno (5%) (STASHENKO *et al.*, 2010).

De acordo com Stashenko *et al.* (2010), o quimiotipo rico em carvacrol (B), identificados em plantas da Colômbia, possuem composição semelhante aos óleos descritos por Santos *et*

al. (2004) e Oliveira *et al.* (2007) no Brasil, e o quimiotipo rico em timol (C) se assemelha ao encontrado por Rojas *et al.* (2006) na Venezuela.

No entanto, outros quimiotipos foram descritos no Brasil. Um óleo essencial extraído de *Lippia schomburgkiana*, considerada sinônimo de *L. origanoides*, coleada no Nordeste do Brasil, apresentou como componente principal o 1,8-cineol (64,1%), seguido de α -terpineol (12,0%) e γ -terpineno, sendo apontado como quimiotipo D (SILVA *et al.*, 2009). Ainda, um estudo circadiano realizado com plantas do Pará incluiu um novo quimiotipo de óleo essencial de *L. origanoides*, o quimiotipo E, o qual é rico em (E)-metil cinamato e (E)-nerolidol e apresenta odor amadeirado frutado, além de demonstrar variações na composição do óleo essencial dessa planta conforme o mês e a hora de coleta do material vegetal. Na estação seca (junho-dezembro) foram identificados (E)-metil cinamato, *p*-cimeno, 1,8-cineol, (E)-nerolidol, carvacrol, γ - terpineno, (E)-cariofileno e α -pineno. Já na estação chuvosa os principais componentes foram (E)-nerolidol, 1,8-cineol, carvacrol, α -pineno, (E)-cariofileno, γ -terpineno e *p*-cimeno. Além disso, verificou-se também que alguns componentes majoritários, como o carvacrol, podem estar ausentes em alguns meses do ano (RIBEIRO *et al.*, 2014).

Silva *et al.* (2017), ao analisar óleos essenciais de *L. origanoides* de diferentes partes da Amazônia, encontraram uma composição volátil variada entre as amostras estudadas. Na amostra 1 (LiOr-1), foram identificados principalmente monoterpenóides oxigenados, o 1,8-cineol (64,1%), α -terpineol (12,0%) e β -cariofileno (3,8%). Na amostra 4 (LiOr-4) foi verificado uma composição semelhante, com dominância dos monoterpenóides oxigenados, no qual o 1,8-cineol (70,5%) também foi o composto majoritário, seguido por α -pineno (4,6%) e sabineno (4,9%). Esses dois tipos foram considerados estatisticamente semelhantes em sua composição. No LiOr 2, também predominava os monoterpenóides oxigenados, porém o composto principal foi o timol (88,2%), além de menores concentração de *p*-cimeno (6,4%), (Z)- β -ocimeno (1,1%) e carvacrol (1,0%). O LiOr-3, constituído em sua maioria de hidrocarbonetos monoterpênicos e hidrocarbonetos sesquiterpênicos, apresentou predominantemente β -cariofileno (22,1%), β -felandreno (17,7%) e α -felandreno (17,6%). E no LiOr-5, composto principalmente por sesquiterpenóides e monoterpenóides oxigenados, foram identificados o (E)-nerolidol (27,9%), β -cariofileno (12,7%) e carvacrol (5,3%) como substâncias majoritárias.

Em plantas do Cerrado brasileiro essa variação também ocorre em indivíduos de diferentes áreas e populações. Além disso, são encontrados diferentes perfis na inflorescência e nas folhas. Numa área do Cerrado (cerrado *stricto sensu*), foi identificado na inflorescência que o trans-cariofileno foi o composto majoritário dos indivíduos 1, 2 e 4, e o α -humuleno foi o composto principal do indivíduo 3; nas folhas, α -humuleno e trans-cariofileno foram os componentes majoritários dos indivíduos 3 e 4, enquanto o indivíduo 2, era formado principalmente por trans-cariofileno e δ -cadineno. Já no campo cerrado, o indivíduo 1 apresentou maior concentração de trans-cariofileno e β -pineno nas inflorescências, e trans-cariofileno nas folhas. O α -selineno, trans-cariofileno, e o 7-*epi*- α -selineno foram os componentes principais tanto nas inflorescências quanto nas folhas do indivíduo 2. E o indivíduo 3 apresentou nas inflorescências e nas folhas, o 1,8 cineol como composto majoritário (TOZIN *et al.*, 2015b).

Todavia, quando se trata da composição não volátil de *L. origanoides*, e da composição química de seus extratos, há poucas publicações disponíveis (STASHENKO *et al.*, 2013; LEITÃO *et al.*, 2017). Stashenko *et al.* (2010) afirma que a composição dos extratos de *L. origanoides* são semelhantes aos seus quimiotipos de óleo essencial, diferindo apenas quantitativamente e pela presença da pimocembrina, a qual foi identificada no quimiotipo A, rico em carofileno.

Vários metabólitos secundários já foram identificados no extrato etanólico dessa planta, como taninos, catequinas, flavonoides, esteroides e triterpenos, derivados de cumarina, saponinas e alcaloides. Dessas substâncias, foi possível identificar o ácido gálico, catequinas, epigalocatequina-galato (EGCG), epicatequina, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido salicílico e quercetina (BRAGA *et al.*, 2019).

Stashenko *et al.* (2013), trazem um perfil cromatográfico obtido a partir de uma mistura de flavonoides e ácidos fenólicos, no qual foi possível diferenciar os seguintes composto: ácido cumárico, ácido cafeico, pinocembrina, ácido carnósico, naringenina, apigenina, kaempferol, luteolina, quercetina, ácido rosmarínico, e ácido ursólico. A pinocembrina e naringenina foram isoladas nos três quimiotipos estudados de *L. origanoides* (STASHENKO *et al.*, 2013).

Leitão *et al.* (2017) isolaram como compostos principais do extrato etanólico de *L. origanoide* o eriodictiol, naringenina, pinocembrina, ramnocitrina, 3',4'-dimetoxifisetina, e

ainda, o carvacrol e o timol, que fazem parte compostos voláteis da planta. Além disso, puderam identificar uma fração rica de flavonoides ao combinar duas técnicas de cromatografia líquida, identificando a taxifolina, verbascoside, luteolina, vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, robinetina, quercetina, 6,8-di-C-hexosil-luteolina e 6,8-di-C-glucosil-apigenina, sendo as duas últimas, relatadas pela primeira vez em Verbenaceae.

A composição química do extrato também difere em função das partes da planta utilizada. O extrato etanólico obtido dos talos apresentou o esteroide β -sistosterol como principal composto; das raízes foi isolada e a naftoquinona tecomaquinona, e no extrato etanólico das folhas foram identificados o monoterpene carvacrol, o flavonoide naringenina, a mistura de outros flavonoides e a mistura de di-hidrochalconas (ALMEIDA *et al.*, 2010).

Alguns desses metabólitos já haviam sido identificados anteriormente por Costa *et al.* (2001) e Costa *et al.* (2002), que isolaram além dos compostos já conhecidos (ácido oleanólico, metil-3,4-diidroxibenzoato, lapachenol, tecomaquinona, tectoquinona, tectol, tectol acetilado, quercetina, luteolina e glucoluteolina), a naftoquinona lippisidoquinona e os flavonoides taxifolina e isolariciresinol.

2.4.2 Uso popular e propriedades farmacológicas

Um levantamento realizado sobre o uso tradicional de espécies de *Lippia* spp. reuniu 52 espécies usadas na América do Sul, América Central, e na África Tropical. Geralmente, são utilizadas as folhas ou partes aéreas e flores, preparadas como infusão ou decocção, e administrado oralmente. Essas espécies são utilizadas principalmente para distúrbios gastrointestinais e respiratórios, sendo a *L. organoides*, empregada para tratamentos de resfriados, gripe, bronquite, tosse e asma (PASCUAL *et al.* 2001).

Em comunidades quilombolas de Oriximiná, no Pará/Brasil, a *L. organoides* se destacou como as dez espécies mais versáteis dentre 254 plantas citadas em um estudo etnofarmacológico. Essa espécie é localmente conhecida como salva-de-marajó e os principais usos citados foi para tratamento de cólicas menstruais, dores de estômago e cólicas do bebê e do pós-parto, evidenciando possíveis atividades antiespasmódicas, anti-inflamatórias e analgésicas de *L. organoides*. Ainda, essa planta também é comumente utilizada para tratamento de doença pulmonar (pneumonia e tuberculose) e inflamação na garanta (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Uma das principais atividades farmacológicas encontradas nos óleos essenciais ou extratos de *L. origanoides*, é a atividade antioxidante, a qual pode ser atribuída à presença de substâncias flavonoídicas e outros compostos fenólicos presentes nessa espécie (SILVA *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2010). A alta capacidade antioxidante também é atribuída ao timol e carvacrol, os quais são encontrados em abundância em alguns quimiotipos do seu óleo essencial e possuem a capacidade de sequestrar radicais livres (STASHENKO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2017; DAMASCENO *et al.*, 2018).

O potencial antimutagênico do óleo essencial de *L. origanoides* e seus constituintes majoritários carvacrol e timol, foram avaliados frente à droga bleomicina, e propriedades antígeno-tóxicas foram identificadas, apoiando o potencial dos óleos e compostos na quimioprevenção e terapia do câncer (VICUÑA *et al.*, 2010). Costa *et al.*, 2001 identificaram metabólitos secundários em *L. origanoides* que exibiram atividade significativa contra as linhagens de células de leucemia humana. Embora esse papel de agente quimiopreventivo na etiologia do câncer seja muito complexo e envolva vários mecanismos de ação, resultados como esses apontam que mais estudos são necessários para o uso prático desses compostos na quimioprevenção (VICUÑA *et al.*, 2010).

A atividade biocida do seu óleo essencial rico em timol sobre *Phytophthora infestans*, um fitopatógeno de importância na agricultura, mostra que esse óleo essencial pode ser uma alternativa agroecológica ao uso de agrotóxicos (CORDERO *et al.*, 2018; ACOSTA *et al.*, 2019). O óleo essencial dessa planta também é uma excelente alternativa para o controle de outras pragas de importância na produção e armazenamento de alimentos, o qual exibiu a porcentagem máxima de mortalidade e a maior potência repelente contra *Tribolium castaneum* e *Ulomoides dermestoides*, sendo considerado bastante promissor para uso no manejo de pragas, devido ao seu alto índice de segurança para as pessoas e para o meio ambiente (ALCALA-OROZCO *et al.*, 2019).

O óleo essencial de *L. origanoides* tem grande potencial para ser utilizado no manejo sustentável de pragas, bem como para controle larvicida de *Aedes aegypti*, pois o composto timol apresentou importante atividade larvicida (MAR *et al.*, 2018). O monoterpene timol, sinergicamente com outros constituintes do óleo, também foi considerado o composto responsável pelas atividades carrapaticidas frente a larvas de *Rhipicephalus microplus*, contra larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense*, e contra larvas de *Rhipicephalus sanguineus* e de *Dermacentor nitens* (GOMES, 2013).

Baldissera *et al.* (2017) observaram que a utilização do óleo essencial dessa planta em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* não proporcionou eficácia curativa, todavia observou-se um aumento significativo na longevidade dos camundongos tratados com *L. origanoides* em relação ao grupo controle, sugerindo que os compostos ativos presentes no óleo essencial podem agir sinergicamente ao tratamento com outras drogas tripanocidas.

O extrato hidroalcolólico de *L. origanoides* exibiu propriedades fitoterápicas que podem ser usadas para tratamento da hipertensão arterial, visto que, uma importante diminuição da pressão arterial média foi observada após a administração do extrato, sem evidências de alterações clínicas ou comportamentais em camundongos (COELHO *et al.*, 2015). Outra descoberta recente, é a atividade anti-acetilcolinesterase, que possivelmente está associada à ação dos compostos majoritários do óleo essencial, o timol, o carvacrol e o *p*-cimeno, tornando-o promissor para a produção de fitoterápicos com atividade anti-acetilcolinesterase e antioxidante para o tratamento do Alzheimer (RODRIGUES *et al.*, 2021).

Quando se trata da atividade antifúngica dessa planta, efeito fungicida do óleo essencial já foi identificado contra *Candida albicans* (FONTENELLE *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007; BALDIN *et al.*, 2018), *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum* (OLIVEIRA *et al.*, 2007), *Microsporum canis* (FONTENELLE *et al.*, 2007) e, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*, sendo observadas alterações morfológicas e danos à integridade da membrana celular fúngica, bem como uma redução na síntese de ocratoxina A, e inibição qualitativa da aflatoxina B1 e B2 (BRANDÃO *et al.*, 2021).

2.4.3 Atividade antibacteriana de *L. origanoides*

A ação antibacteriana da *L. origanoides* é umas das propriedades da planta mais investigada. O efeito antimicrobiano do óleo essencial já foi confirmado frente à várias cepas bacterianas padrão de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella cholerasuis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* (OLIVEIRA *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2014; LEAL *et al.*, 2019; QUIGUANÁS-GUARÍN *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2021). Esse efeito é atribuído principalmente aos componentes timol e carvacrol presentes no óleo (LEAL *et al.*, 2019; QUIGUANÁS-GUARÍN *et al.*, 2021).

O extrato da planta também apresenta resultados promissores, um estudo realizado com o extrato metanólico, apresentou sensibilidade de *S. aureus* isolados do úbere, fossa nasal e leite bovino, com halos de inibição variando de 26 a 11 mm de diâmetros, em diferentes concentrações do extrato (SILVA *et al.*, 2018).

O óleo essencial de *L. origanoides* apresenta potencial inibitório contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (RIBEIRO *et al.*, 2021). Maiores concentrações podem ser necessárias para obter esse efeito em bactérias mais patogênicas, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (QUIGUANÁS-GUARÍN *et al.*, 2021). Mesmo assim, a atividade antibacteriana desse óleo essencial apresenta resultados satisfatórios contra cepas de MRSA (OLIVEIRA *et al.*, 2007; GÓMEZ-SEQUEDA *et al.*, 2020). Alterações no tamanho e na morfologia dessas bactérias foram observadas, além de atividade antibiofilme quando foram expostas ao óleo rico em carvacrol (GÓMEZ-SEQUEDA *et al.*, 2020).

Barreto *et al.* (2014b) verificaram um efeito potencializador significativo entre este óleo e os aminoglicosídeos testados contra MRSA, reduzindo de 2500 e 788 g/mL para 248 e 78 g/mL, os valores da concentração inibitória mínima (MIC) para neomicina e amicacina, respectivamente. Sinergismo semelhante foi observado com a clorpromazina, que é um inibidor da bomba de efluxo, sugerindo que a capacidade moduladora do óleo essencial envolva também a inibição do sistema de efluxo de drogas (BARRETO *et al.*, 2014b). Frações hexano e diclorometano do extrato etanólico de *L. origanoides*, também apresentaram efeito modulatório da resistência de MRSA aos aminoglicosídeos. Essa modulação foi atribuída a uma interação sinérgica dos componentes do extrato na membrana plasmática bacteriana, o que leva a um aumento da permeabilidade celular aos aminoglicosídeos, além da inibição dos sistemas de efluxo dependentes da força próton-motriz, e maiores concentrações intracelulares de antibióticos levam a um aumento da atividade dos aminoglicosídeos contra MRSA (BARRETO *et al.*, 2014a).

Esse sinergismo com antibióticos convencionais pode resultar no desenvolvimento de formulas farmacêuticas baseadas no uso combinado do antibiótico com o óleo essencial de *L. origanoides*, contribuindo para a redução das concentrações terapêuticas desses fármacos, e assim, minimizar seus efeitos colaterais e até mesmo e diminuir os custos do tratamento (BARRETO *et al.*, 2014a).

2.4.4 Atividade antibacteriana contra bactérias causadoras de mastite

A atividade antibacteriana de *L. origanoides* contra bactérias causadoras de mastite vem sendo alvo de muitos estudos. O óleo essencial rico em timol exerceu atividade bactericida e bacteriostática contra cepas de *Staphylococcus* spp. e de *Streptococcus* spp. isolados do leite de ovinos com mastite, sendo observada uma redução de ≥ 5 Log UFC após cinco minutos de contato com o óleo (SOUZA *et al.*, 2017).

Furlani *et al.* (2021) ao testar a atividade antibacteriana de *Lippia origanoides* (alecrim-pimenta), *Lippia alba* (erva cidreira), *Ocimum basilicum* (manjeriçã) e *Cymbopogon citratus* (capim-santo), frente a *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* isolados de mastite caprina e ovina, observaram inibição de 100% dos isolados, e menores valores de MIC e CBM para *L. origanoides*.

O uso de um produto contendo óleo essencial como agente antisséptico de pré e pós-ordenha evidenciou que o óleo atua de forma eficiente no controle de microrganismos em comparação com a desinfecção por produto convencional, isso mostra a eficácia de um antisséptico alternativo à base de óleo essencial, na prevenção de novos casos de mastite em vacas leiteiras (MARCELO *et al.*, 2020). A baixa toxicidade observada no óleo essencial de *L. origanoides*, possibilita sua aplicação prática como antimicrobiano veterinário (ANDRADE *et al.*, 2014).

Ao avaliar a atividade antisséptica do óleo essencial na presença de leite bovino sobre as cepas bacterianas de *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Choleraesuis*, o óleo apresentou efeito inibitório do crescimento de *S. aureus* após 5 min de contato, e para *Escherichia coli* e *Salmonella Choleraesuis* após 15 min, evidenciando que o óleo essencial de alecrim-pimenta tem potencial antimicrobiano natural, mesmo na presença do leite bovino, o qual é considerado uma matéria orgânica e nutricional complexa. (ALMEIDA *et al.*, 2016).

O óleo essencial de *Lippia origanoides* também apresentou atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos, todavia, maiores valores de CIM e CBM foram observados para os isolados de leite bovino e leite ovino em comparação com bactérias isoladas de carcaça e queijo (QUEIROZ *et al.*, 2014). Esse óleo essencial pode ser utilizado para a prevenção do crescimento bacteriano de alimentos, pois possui baixa toxicidade, permitindo sua aplicação na também indústria alimentícia (SARRAZIN *et al.*, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliação a composição fitoquímica e a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolico de *Lippia origanoides* frente à amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de casos de mastite bovina.

3.2 Específicos

- Analisar a composição fotoquímica do extrato hidroalcolico, para determinação de compostos bioativos de ação farmacológica da planta;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato em diferentes concentrações frente à *Staphylococcus* spp. isoladas de casos de mastite bovina;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e identificação botânica da espécie

A planta foi coletada no campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em Recife/PE em setembro de 2021. Anteriormente, uma amostra da planta foi coletada para confecção de exsicata e identificação botânica. Esse material foi indexado ao Herbário Dárdano de Andrade Lima da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária/IPA, sob o número #92547 (Figura 1).

O projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número A543EDA.

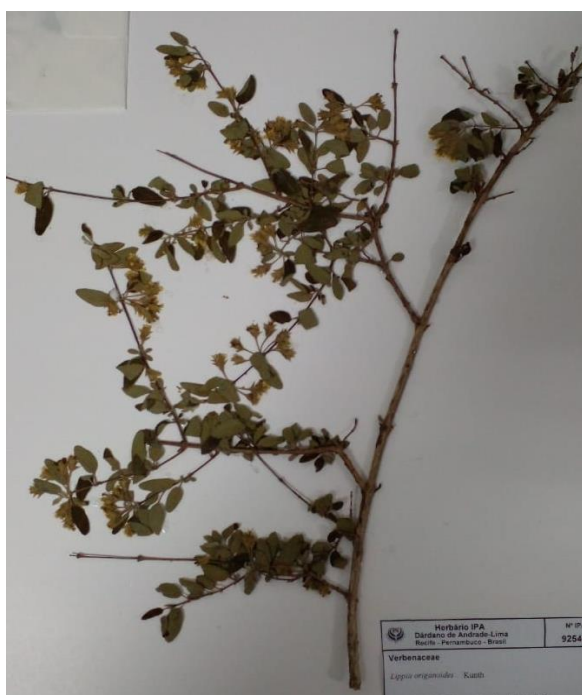


Figura 1 – Exsicata de *Lippia origanoides* depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária/IPA, sob número #92547.

4.2 Elaboração do extrato hidroalcolólico da planta

O extrato foi preparado com as partes aéreas da planta, as quais foram secas a temperatura ambiente. A extração foi realizada com etanol a 70% pelo método de maceração a frio a partir da planta triturada. Foi utilizado 100g do material vegetal triturado e adicionado solvente suficiente para imergir todo o material. A mistura foi mantida maceração durante 72 horas, em seguida, filtrada e submetida à rotavaporação sob pressão reduzida, em temperatura

de 30-45 °C e, sob agitação de 120 rotações por minuto (RPM). Posteriormente, o extrato hidroalcolóico obtido foi liofilizado.

4.3 Análise de cromatografia líquida de alta eficiência

A análise fotoquímica do extrato foi realizada no laboratório de cromatografia do Instituto Nacional do Semiárido (INSA) em Campina Grande/PB. A amostra foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography – HPLC).

A amostra foi solubilizada com metanol e água ultrapura para alcançar uma concentração de 5mg/mL e colocada em banho de ultrassom por 10 minutos. Em seguida, visando à precipitação de componentes muito apolares, a amostra permaneceu em repouso por 24h a –20C, e após, filtrada com membrana de 0,22 micrometros. A análise foi realizada em um sistema HPLC Agilent 1260 Infinity acoplado com uma bomba quaternária e degaseificador (G1311D), injetor automático (G1329B), forno de coluna (G1316A), e Diode Array Detector (DAD G4212B). Para as separações cromatográficas, foi utilizada uma coluna Zorbax® (Agilent) SB-C18 (5µm; 4,6 x 250mm) e uma pré coluna Zorbax® (Agilent) SB-C18 (5µm e 4,6 x12,5mm).

Foi utilizado como fase móvel água ultra pura acidificada a 0,3% com ácido acético (A) e Acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich®) (B), com fluxo de 0,8 mL/min, e o método cromatográfico foi executado da seguinte forma: 92% (A) por 10 min, seguido de 92% (A) a 65% (A) por mais 50 minutos a 30 C°, com detecção completa entre 190-400nm. Este método foi considerado como exploratório e o cromatograma foi considerado representativo para os componentes majoritários da amostra visto que não houve nenhum sinal equivalente na lavagem.

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

4.4.1 Teste de microdiluição em caldo do extrato de *L. origanoides*

Para o teste da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato, foram selecionadas 11 amostras bacterianas isoladas de casos de mastite clínica ou subclínica, pertencentes a bacterioteca do laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos/Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE.

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do extrato da planta foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Furlani *et al.* (2021) e Acosta *et al.* (2021). As cepas bacterianas foram repicadas em placas de ágar Mueller-Hinton (MH), incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas e, posteriormente diluídas em solução salina a 0,9% até obter turvação equivalente a um padrão 0,5 da escala McFarland (aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL)) (BAUER, 1966). Em seguida, o inóculo foi diluído em caldo MH obtendo concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL.

Para determinação da CIM foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços, nos quais foram adicionados 200µL do inóculo em caldo MH, em seguida, foi adicionado ao primeiro poço 200µL do extrato hidroalcolico da planta diluído em água ultrapura numa concentração inicial de 3000µg/mL e, após homogeneização 200µL foi transferido para o segundo poço, e assim sucessivamente para obtenção do extrato nas concentrações variando de 3.000µg/ML até 5,86 µg/ML. As placas foram então incubadas a 37°C por 24 horas sob aerobiose.

A CIM foi determinada por meio das densidades ópticas medidas por espectrofotometria a 600nm, e um curva de crescimento foi estabelecida com medições no tempo zero, e em 24 horas de incubação. Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato hidroalcolico da *L. origanoides* capaz de inibir qualquer crescimento microbiano visível (COS *et al.*, 2006). Já a CBM se deu a partir do repique do conteúdo dos poços em ágar MH, considerando a concentração mínima na qual o crescimento bacteriano foi totalmente inibido. Todos os testes foram realizados em duplicata.

4.4.2 Teste de disco-difusão

Para avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos convencionais foram realizados testes de disco-difusão seguindo os protocolos do CLSI (CLSI, 2018), utilizando os antimicrobianos Cefoxitina 30mg (CFO 30), Benzilpenicilina G 10 mg (PEN 10), Tetraciclina 30mg (TET 30), Eritromicina 15mg (ERI 15), Clindamicina 2mg (CLI 2) e Ceftiofur 30mg (CTF 30), e as drogas testadas foram consideradas sensíveis (S), resistentes (R) ou intermediário (I).

4.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística do tipo descritiva, com auxílio do software Microsoft Exell®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A análise de cromatografia líquida do extrato de *Lippia origanoides* evidenciou a presença de três compostos majoritários, eles aparecem na amostra entre 40-60 minutos, com área de pico maior que 500 mAU (Figura 2). Os três compostos identificados apresentam estrutura semelhantes, e provavelmente pertencem a mesma classe de substâncias devido à similaridade de espectros ultravioleta (UV) (Figura 3). A figura 2 e 3 mostram o cromatograma do extrato de *L. origanoides* obtido por HPLC, e os espectros UV dos três compostos majoritários identificados na amostra.

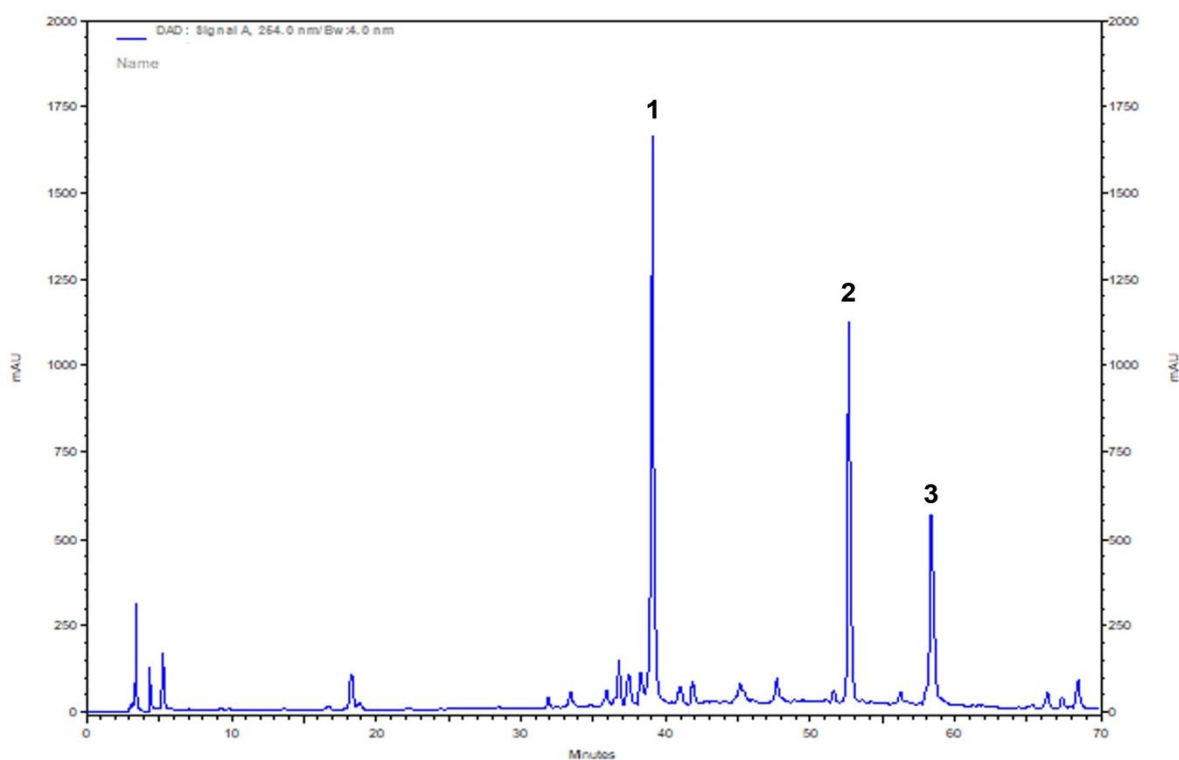


Figura 2 – Perfil cromatográfico do extrato hidroalcolólico de *Lippia origanoides* obtido por HPLC-DAD, coluna Zorbax® SB-C18, com detecção completa entre 190-400nm. Picos **1, 2, 3**: compostos majoritário presentes na amostra, provavelmente correspondendo ao grupo dos flavonoides.

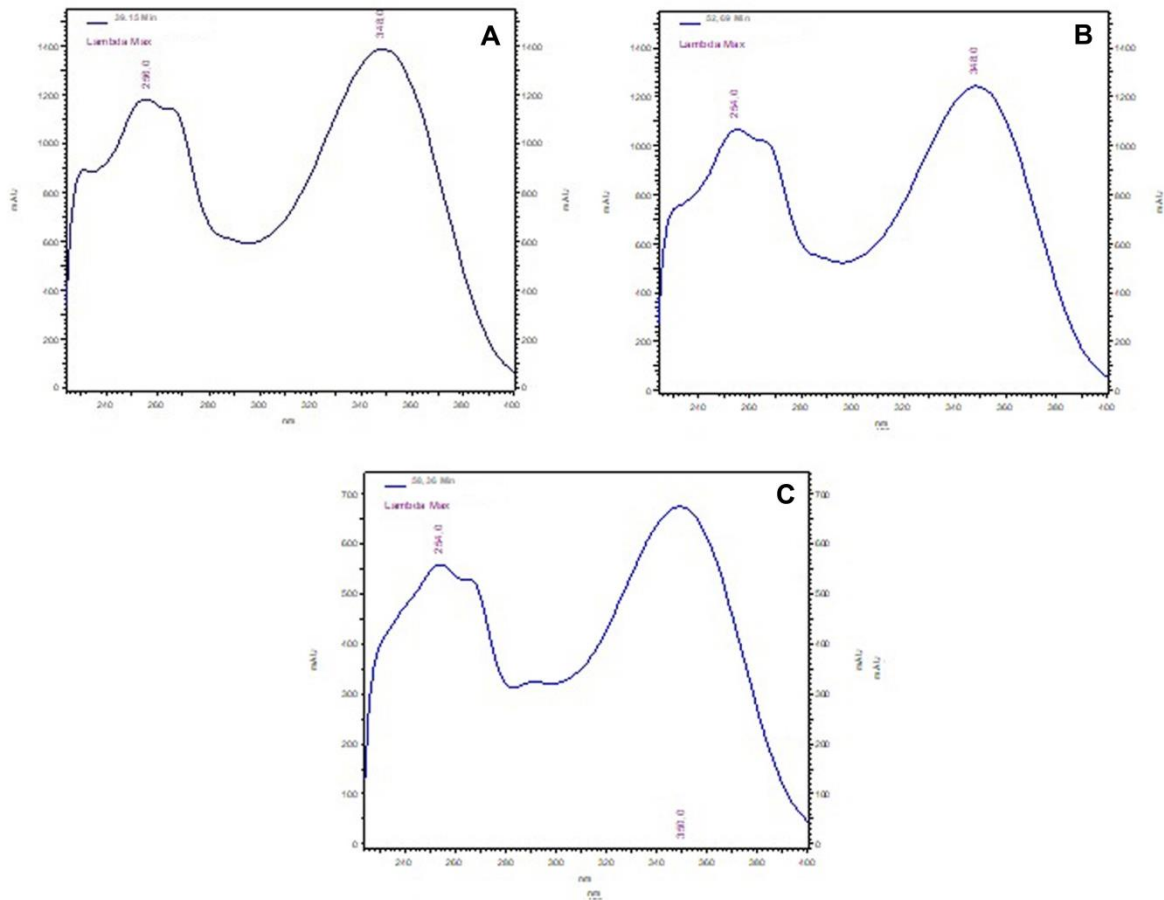


Figura 3 – Espectros UV dos três compostos majoritários identificados no extrato hidroalcolóico de *Lippia organoides* por HPLC-DAD. **A:** Espectro UV do pico **1** (tempo de retenção de 39,15 minutos), **B:** espectro UV do pico **2** (tempo de retenção de 52,09 minutos), **C:** espectro UV do pico **3** (tempo de retenção de 58,26 minutos).

Baseado no espectro de absorvância dos picos é possível afirmar que se esses compostos fazem parte do grupo dos flavonoides, pois possuem espectros UV característicos. Eles são caracterizados por exibirem duas bandas de absorção, sendo a Banda I entre 320-385 nm, que representa o perfil de absorção do anel fenólico B, e a Banda II entre 250-285 nm, correspondendo ao anel fenólico A (YAO *et al.*, 2004). Embora não tenha sido possível identificar quais os flavonoides correspondiam aos picos encontrados, a partir de dados da literatura podemos sugerir que o pico 1 e 3 tratam-se das flavanonas naringenina e pinocebrina, respectivamente (COLEHO *et al.*, 2015; LEITÃO *et al.*, 2017; STASHENKO *et al.*, 2010).

Esses dois flavonoides, juntos com o eriodictiol, são descritos como os principais marcadores fitoquímicos do extrato de *L. organoides* (STASHENKO, *et al.*, 2013;

BARRETO *et al.*, 2014a; LEITÃO *et al.*, 2017). Outros flavonoides também são encontrados no extrato dessa planta, a qual é considerada uma importante fonte de substâncias bioativas devido à variedade e a alta concentração de flavonoides em todos os três quimiotipos (STASHENKO *et al.*, 2013; LEITÃO *et al.*, 2017). Esses compostos são responsáveis por inúmeras propriedades terapêuticas, como ação antioxidante, antimicrobiana e antifúngica (KUJUMGIEV *et al.*, 1999; UZEL *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2010).

Os flavonoides naringenina, pinocembrina, quercetina, luteolina, canferol, e apigenina já foram identificados no extrato dessa planta (STASHENKO *et al.*, 2013). Barreto *et al.*, (2014a) identificaram os compostos voláteis carvacrol e timol numa fração hexano do extrato etanólico da planta, além de outros compostos minoritários. Já na fração diclorometano as flavononas naringenina, eriodictiol, hesperetina, outras isoflavonas como a dihidrogluciteína, 3'-hidroxi-irilonina, e a catequina, foram identificadas como componentes majoritários.

Em outro estudo realizado por Ferreira *et al.* (2017), com o extrato metanólico dessa planta, foi observado o composto fenólico ácido gálico, juntamente com os flavonoides catequina, naringina e quercetina, com destaque para a flavonona naringina, a qual foi encontrada em alta concentração. Todavia, estudos com foco na composição não volátil dessa planta, ainda são escassos (STASHENKO *et al.*, 2013; LEITÃO *et al.*, 2017). Uma análise voltada para esses compostos não voláteis da *L. origanoides*, permitiu a identificação de 19 substâncias, dentre as principais, o eriodictiol, a naringenina e a pinocembrina, além de dois compostos relatados pela primeira vez na família Verbenaceae, a 6,8-di-C-hexosiluteolina e 6,8-di-C-glucosil-apigenina (LEITÃO *et al.*, 2017). Estudos como esses, são necessários para elucidar todas as propriedades bioativas dessa planta.

A cromatografia de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC - DAD) têm sido eficiente em avaliações de extrato de plantas (STASHENKO *et al.*, 2010; STASHENKO *et al.*, 2013). Contudo, nem sempre é possível uma boa separação por HPLC de todas as bandas no cromatograma, principalmente quando se trata de extratos de plantas, pois estes, possuem matrizes complexas (LEITÃO *et al.*, 2017).

Devido à complexidade da matriz vegetal do extrato etanólico de *L. origanoides*, Leitão *et al.* (2017), obteve melhores resultados ao combinar a Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada às

metodologias de detecção Ultravioleta e Espectrometria de Massa de Alta Resolução (HPLC-UV-HRMSn). O fracionamento do extrato por HSCCC, permitiu a visualização de uma fração rica em flavonoides, passando de sete compostos identificados por HPLC-UV-HRMSn, para 19, após a combinação das técnicas. Essa complexidade de matriz do extrato de *L. organoides*, pode explicar fato da análise de HPLC-DAD identificar poucos compostos no presente trabalho. Além disso, um maior número de placas teóricas aumenta a eficiência do processo de separação e, embora os vários tipos de colunas de fase estacionária forneçam resultados semelhantes para a maioria dos compostos, existem algumas colunas que exibem perfil cromatográfico melhor que outras (LEITÃO *et al.*, 2017).

A maioria dos estudos com *L. organoides* são voltados para seu óleo essencial, ou seja, sua composição volátil (LEITÃO *et al.*, 2017). Os constituintes majoritários do óleo, o carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno e timol, são apontados em vários estudos, contudo, apresentam percentuais variáveis (BARRETO *et al.*, 2014b; SARRAZIN *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2016; ACALA-OROZCO *et al.*, 2019; LEAL *et al.*, 2019). Outros trabalhos citam o 1,8-cineol como composto principal (TOZIN *et al.*, 2015b; SILVA *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2021). Vários fatores podem influenciar na composição do óleo essencial desta planta, como método de extração, período do ano em que a planta foi colhida, além de condições edafoclimáticas, variáveis biológicas e de diversidade genética (ROJAS *et al.*, 2006; BARRETO *et al.*, (2014a); TOZIN *et al.*, 2015b; CORDERO *et al.*, 2018).

Tozin *et al.* (2015b), encontraram uma grande diversidade nas composições químicas do óleo essencial de *L. organoides*, ao avaliar plantas de diferentes áreas e populações do Cerrado Brasileiro, além disso, verificou que a inflorescência da planta apresenta uma maior quantidade de substâncias quando comparada com as folhas. Tal informação pode justificar as poucas substâncias encontradas neste trabalho, uma vez que para elaboração do extrato foram utilizadas apenas folhas e caule.

5.2 Atividade antimicrobiana *in vitro*

A partir dos resultados obtidos foi possível verificar que o extrato de *Lippia organoides* demonstrou atividade antimicrobiana frente à toda as bactérias testadas, apresentado efeito bacteriostático e bactericida. No teste de disco-difusão, 81,8% das amostras apresentaram padrão de resistência à pelo menos um dos seis antimicrobianos testados. Na Tabela 1 estão

dispostos os valores da CIM e CBM frente a *Staphylococcus* sp. isolados de casos de mastite em bovinos, além do padrão de resistência microbiana às drogas convencionais.

O extrato hidroalcolico de *L. origanoides* apresentou efeito antibacteriano promissor. A atividade antimicrobiana do óleo essencial da planta já havia sido comprovada em diversos estudos (ANDRADE *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2016; FURLANI *et al.*, 2021; QUIGUANÁS-GUARÍN *et al.*, 2021, RIBEIRO *et al.*, 2021). O extrato metanólico dessa planta também demonstrou efeito bacteriostático sob cepas de bactérias padrão como *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (TRINDADE *et al.*, 2021), contudo estudos realizados a partir do extrato ainda são escassos.

Os valores de CIM e CBM variaram de 187,5 a 1.500 µg/mL nas amostras testadas. Além disso, observou-se maior valor de CIM para as bactérias que também apresentaram maior padrão de resistência aos antimicrobianos convencionais. Os valores de CIM e CBM estabelecidos no presente estudo são semelhantes aos descritos na literatura, contudo é importante levar em consideração que a maioria desses testes não são realizados com o extrato, mas, a partir do óleo essencial da planta (FURLANI *et al.*, 2021; QUIGUANÁS-GUARÍN *et al.*, 2021). Além disso, as divergências entre valores de CIM e CBM relatados, são atribuídos à vários fatores, como, método de extração utilizado, composição química do extrato da planta ou do óleo, virulência da cepa bacteriana, e do tipo de análise antimicrobiana empregada (OTHMAN *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2016; FURLANI *et al.*, 2021).

Um estudo com bactérias isoladas de mastite caprina e ovina testou a atividade antibacteriana do óleo essencial de quatro plantas, sendo o óleo da *L. origanoides* o que demonstrou menor CIM. Esse efeito foi atribuído à presença do carvacrol, um constituinte majoritário desse óleo essencial (FURLANI *et al.*, 2021). Outras substâncias encontradas no óleo essencial dessa planta também são apontadas como as responsáveis pelo efeito antibacteriano, como o timol, e p-cimeno (ANDRADE *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2016; QUIGUANÁS-GUARÍN *et al.*, 2021). Esses compostos químicos formam uma mistura complexa os quais podem agir de forma sinérgica (ANDRADE *et al.*, 2014).

Tabela 1- Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Lippia origanoides* e de antibióticos convencionais frente a *Staphylococcus* sp. isolados de mastite em bovinos.

| Isolados | Disco-difusão | | | | | | Microdiluição | | | | | | | | | |
|-----------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|------|------|
| | CFO 30 | PEN 10 | TET 30 | ERI 15 | CLI 2 | CTF 30 | 5,86 | 11,72 | 23,44 | 46,88 | 93,75 | 187,5 | 375 | 750 | 1500 | 3000 |
| <i>S. chromogenes</i> | R | R | R | I | S | S | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| <i>S. aureus</i> | S | S | I | R | S | S | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>S. aureus</i> | S | R | S | I | R | I | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>S. aureus</i> | S | S | S | S | S | S | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| <i>S. aureus</i> | S | R | S | I | S | S | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| <i>S. aureus</i> | S | R | S | R | I | I | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| <i>S. aureus</i> | S | S | S | S | S | S | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| <i>S. aureus</i> | S | R | R | I | S | S | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| <i>S. aureus</i> | S | R | R | S | S | S | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| <i>S. aureus</i> | S | R | R | S | S | S | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| <i>S. epidermidis</i> | S | R | S | S | S | S | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |

CFO 30: Cefoxitina 30mg, **PEN 10:** Benzilpenicilina G 10 mg, **TET 30:** Tetraciclina 30mg, **ERI 15:** Eritromicina 15mg, **CLI 2:** Clindamicina 2mg, **CTF 30:** Ceftiofur 30mg. O valor MIC é indicado pela linha vertical preto e o valor MBC é indicado pelo símbolo negativo na área cinza.

Produtos naturais ricos em terpenoides como o carvacrol e timol, são capazes de alterar e danificar as membranas celulares das bactérias. Esses compostos agem alterando a permeabilidade e fluidez das membranas interna e externa da célula bacteriana, além de afetar as enzimas e proteínas das membranas, levando a danos estruturais e funcionais (NAZARRO *et al.*, 2013; CHOUHAN *et al.*, 2017; CUNHA *et al.*, 2018). Ainda, ações intracelulares interferem na geração de energia e na força motriz de prótons responsáveis pelo movimento flagelar (NAZARRO *et al.*, 2013; CHOUHAN *et al.*, 2017).

Outros compostos presentes no extrato de *Lippia origanoides*, como os flavonoides, possuem propriedades antioxidantes e antibacterianas (KUJUMGIEV *et al.*, 1999; UZEL *et al.*, 2005; MARQUES *et al.*, 2015; TRINDADE *et al.*, 2021). O teor de flavonoide dessa planta é considerado especialmente alto, quando comparado com outras plantas aromáticas (STASHENKO *et al.*, 2013).

A atividade antibacteriana apresentada pelo extrato de *Lippia origanoides* pode estar relacionada à presença da pinocebrina e da naringenina. O flavonoide pinocebrina, provavelmente o composto encontrado no extrato deste trabalho, é conhecido por apresentar potencial antimicrobiano (BOSIO *et al.*, 2000; UZEL *et al.*, 2005). Esse efeito é atribuído a interferências na divisão celular, desorganização do citoplasma, membrana citoplasmática, e da parede celular, e à inibição da síntese de proteínas (TAKAISI-KIKUN *et al.*, 1993). A flavanona naringenina, também demonstrou atividade inibitória contra cepas de MRSA (TSUCHIYA *et al.*, 1996). Contudo, vale ressaltar que a capacidade inibitória não deriva apenas da concentração de um único flavonoide, mas sim, do sinergismo de todos os componentes fenólicos (KOSALEC *et al.*, 2003).

No teste de disco-difusão a maior taxa de resistência observada, foi para o antibiótico Penicilina (72,7%), seguida da Tetraciclina (36,3%), Eritromicina (18,2%) e Clindamicina e Cefoxitina (ambos com 9,1%). Nenhuma das amostras testadas apresentaram resistência ao Ceftiofur, porém, duas cepas (18,2%) demonstraram sensibilidades intermediárias. Avaliando as amostras testadas, apenas duas cepas de *S. aureus* foram sensíveis a todos os antibióticos testados, sendo a maioria resistente a no mínimo uma das drogas.

Neste trabalho ocorreu resistência do gênero *Staphylococcus* aos antibióticos penicilina, tetraciclina, clindamicina e eritromicina, resultados similares foram já relatados por

Zimmermann e Araújo (2017), Schabauer *et al.* (2018), Santana *et al.* (2022). A Penicilina é o antibiótico que apresenta maiores índices de resistência microbiana em *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite (THOMAS *et al.*, 2015; ZIMERMANN e ARAÚJO, 2017; SCHABAUER *et al.*, 2018; KUROSAWA *et al.*, 2020), corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa.

A resistência bacteriana aos antibióticos do grupo dos β -lactâmicos é bastante comum, e o principal mecanismo de resistência apontado é a produção de enzimas betalactamases por essas bactérias (MATOS 2014; CARVALHO *et al.*, 2018). Essas enzimas inativam esses antibióticos pela hidrólise da ligação amina no anel B- lactâmico (OPAL E POP-VICAS, 2020).

O maior perfil de sensibilidade às drogas convencionais foi observado para as cefalosporinas de 2^a e 3^a geração. Geralmente, esses antibióticos apresentam melhores resultados contra bactérias envolvidas em casos de mastite (THOMAS *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2018; SANTOS JUNIOR *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2020). No entanto, novas β -lactamases são descobertas a cada dia, como por exemplo a β -lactamases espectro estendido (ESBL) que têm a capacidade de inativar a maioria das cefalosporinas (RAHMAN *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2020).

Também foi possível observar resistências à múltiplas drogas, destacando a cepa de e *S. chromogenes*, a qual apresentou perfil de resistência a três antibióticos testados. Resistência a dois antimicrobianos testados foi verificada em 45,5% das amostras, e bactérias resistentes à apenas um antibiótico constituíram 27,3%. A resistência bacteriana a mais de um princípio ativo é bastante frequente (GARINO JUNIOR *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2018). Deste modo, ressalta-se a importância de descobrir novos compostos capazes combater infecções que até mesmo os antibióticos mais modernos não conseguem controlar.

Desta maneira, metabólitos secundários extraído de plantas, podem contribuir na redução da resistência bacteriana às drogas convencionais em bactérias multirresistentes (BARRETO *et al.*, 2014a; BARRETO *et al.*, 2014b; ALHADRAMI *et al.*, 2020). A associação do óleo essencial de *L. origanoides* com antibióticos da classe dos aminoglicosídeos demonstrou fortes evidências sinérgicas, diminuindo em 10 vezes a CIM para neomicina e amicacina conta uma cepa de MRSA (BARRETO *et al.*, 2014a).

Além disso, flavonoides como o kaempferol, naringenina e outras flavonas, também possuem capacidade de modulação da resistência bacteriana aos antibióticos (TSUCHIYA *et al.*, 1996; FALCÃO-SILVA *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2011). Flavonoides agliconas presentes no extrato da *L. origanoides*, como a naringenina, possuem características lipofílicas e, conseqüentemente, melhor ligação com proteínas plasmáticas e melhor efeito antioxidante (XIAO *et al.*, 2009). Essa capacidade lipofílica está associada aos efeitos dos flavonoides sobre a redução da resistência bacteriana através da inibição de bombas de efluxo de antibióticos (ROCCARO *et al.*, 2004; ZHLO *et al.*, 2004; MAIA *et al.*, 2011). Tudo isso confirma o potencial terapêutico a ser explorado em *L. origanoides*.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o extrato hidroalcolico de *L. origanoides* é rica em substâncias bioativas, com destaque para os flavonoides e óleos essenciais, os quais possuem efeito antibacteriano. O extrato foi capaz de inibir cepas de *Staphylococcus* spp. causadores de mastite em bovinos, muitos desses, resistentes aos principais antibióticos utilizados no tratamento dessa enfermidade. Pesquisas com foco na utilização desse extrato *in vivo* são necessárias, a fim de comprovar sua eficiência sob condições de campo.

Este trabalho traz uma alternativa de baixo custo que pode ser aplicada para o tratamento da mastite, reduzindo assim, o uso indiscriminado de antibióticos para tratamentos de animais com essa enfermidade.

7 REFERÊNCIAS

- ACOSTA, Atzel C. *et al.* Antimicrobial properties of heterocyclic compounds against clinical mastitis isolates. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, 2021. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-6862.
- ACOSTA, Julian M. *et al.* Actividad biocida del aceite esencial de *Lippia origanoides* HBK sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. **Información tecnológica**, v. 30, n. 6, p. 45-54, 2019. DOI: 10.4067/S0718-07642019000600045.
- ALCALA-OROZCO, María *et al.* Repellent and fumigant actions of the essential oils from *Elettaria cardamomum* (L.) Maton, *Salvia officinalis* (L.) Linnaeus, and *Lippia origanoides* (V.) Kunth against *Tribolium castaneum* and *Ulomoides dermestoides*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 22, n. 1, p. 18-30, 2019. DOI: 10.1080/0972060X.2019.1585966.
- ALHADRAMI, Hani Abdullah. *et al.* Flavonoids as potential anti-MRSA agents through modulation of PBP2a: a computational and experimental study. **Antibiotics**, v. 9, n. 9, p. 562, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9090562.
- ALMEIDA, Anna Christina *et al.* Atividade de bioterápicos para o tratamento de mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 134-141, 2011.
- ALMEIDA, Anna Christina *et al.* Atividade antisséptica do óleo essencial de *Lippia origanoides* Cham. (Alecrim-pimenta) na presença de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 905-911, 2016. DOI: 10.1590/S0100-736X2016000900018.
- ALMEIDA, Macia Cleane S. de *et al.* Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1877-1881, 2010.
- ALMEIDA, Thamara Venâncio. **Fatores de risco para mastite bovina e avaliação fenotípica de resistência antimicrobiana**. Goiânia, 2020, 81 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás.
- ALVES, Thâmela; MOREIRA, Maria Aparecida Scatamburlo. Mastite bovina: tratamento convencional e ação de compostos extraídos de plantas. **UNICIÊNCIAS**, v. 25, n. 1, p. 20-25, 2021. DOI: 10.17921/1415-5141.2020v25n1p20-25.

ANDRADE, Viviane A. *et al.* Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 1153-1161, 2014. DOI: 10.1590/S0100-736X2014001200002.

BALDIM, Iara *et al.* *Lippia sidoides* essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti-*Candida* agent. **Industrial Crops and Products**, v. 127, p. 73-81, 2019. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.10.064.

BALDISSERA, Matheus D. *et al.* Trypanocidal action of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* essential oils against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 2, p. 345-351, 2017. DOI: 10.1007/s12639-016-0800-7.

MEDEIROS BARRETO, Humberto *et al.* Phytochemical prospection and modulation of antibiotic activity *in vitro* by *Lippia origanoides* HBK in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014a. DOI: 10.1155/2014/305610.

BARRETO, Humberto Medeiros *et al.* Effect of *Lippia origanoides* HBK essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 6, n. 5, p. 560-564, 2014b. DOI: 10.1016/j.eujim.2014.03.011.

BAUER A. W., *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**, v. 45, n. 4, p. 493-6, 1966. PMID: 5325707.

BEZERRA, Denise AC *et al.* Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 814-817, 2009. DOI: 10.1590/S0102-695X2009000600002.

BIETRIX, Jacques *et al.* Persistence and diffusion of mecC-positive CC130 MRSA isolates in dairy farms in Meurthe-et-Moselle County (France). **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 47, p. 1-6, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00047.

BOSIO, K. *et al.* *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in applied microbiology**, v. 31, n. 2, p. 174-177, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00785.x.

BRAGA, Mariana Aparecida *et al.* Prospection of enzyme modulators in aqueous and ethanolic extracts of *Lippia sidoides* leaves: genotoxicity, digestion, inflammation, and hemostasis. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 3, p. e1800558, 2019. DOI: 10.1002/cbdv.201800558.

BRANDAO, Rafaela Magalhães *et al.* Antifungal activity and the effect of the essential oil of *Lippia origanoides* Kunth on *Aspergillus* mycotoxins production. **Australian Journal of Crop Sciences**, v. 15, n. 7, p. 1005-1012, 2021. DOI: 10.21475/ajcs.21.15.07.p3005.

BRAZ, Elton Marks Araujo *et al.* Modified chicha gum by acetylation for antimicrobial and antiparasitic applications: Characterization and biological properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 1177-1188, 2020. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.05.219.

BRASIL. **Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: Lippia sidoides Cham., Verbenaceae (Alecrim-pimenta)**. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. 2018. 72 p.

BRITO, José Renaldi Feitosa; BRITO, Maria Aparecida V. P. **Mastite bovina**. In: Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite/ Área de Comunicação Empresarial, 2000. 65p.

BITRUS, Asinamai Athliamai *et al.* *In vitro* transfer of methicillin resistance determinants *mecA* from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA). **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2017. DOI: 10.1186/s12866-017-0994-6.

CARVALHO, Aparecida Selsiane Sousa *et al.* Susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru a antibióticos comerciais. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, 2018. DOI: 10.1590/1809-6891v19e-47159.

CHANDRASEKARAN, D. *et al.* Pattern of antibiotic resistant mastitis in dairy cows. **Veterinary World**, v. 7, n. 6, 2014.

CHOUHAN, Sonam; SHARMA, Kanika; GULERIA, Sanjay. Antimicrobial activity of some essential oils - present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017. DOI: 10.3390/medicines4030058.

CLSI M07-A11. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 11th ed., USA: CLSI document M07-A11, v 38, 2018. 112 p.

COELHO, Angélica G. *et al.* Optimization and standardization of extraction method from *Lippia origanoides* HBK: Focus on potential anti-hypertensive applications. **Industrial Crops and Products**, v. 78, p. 124-130, 2015. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.10.033.

CORDERO, Alexander Pérez; ROMERO, Deimer Vitola; CASTILLO, Marcelo Márquez. Chemical profile and antifungal activity against phytophthora cinnamomi of essential oils from *Lippia alba* and *Lippia origanoides*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 11, n. 25, p. 1-8, 2018. DOI: 10.17485/ijst/2018/v11i25/127786.

COS, Paul *et al.* Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006. DOI: 10.1016/j.jep.2006.04.003.

COSTA, Priscila D.; DIAS, Ricardo Souza. Ocorrência de linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus* spp. em leite e derivados envolvidos em Doenças Transmitidas por Alimentos. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 3, n. 05, p. 32-38, 2013. DOI: 10.15601/2238-1945/pcnb.

COSTA, Sônia Maria O. *et al.* Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 6, p. 792-795, 2001. DOI: 10.1021/np0005917.

COSTA, Sônia Maria O. *et al.* Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 66-67, 2002. DOI: 10.1590/S0102-695X2002000300032.

COSTA, Geraldo M. *et al.* Risk factors for high bulk milk somatic cell counts in dairy herds from Campos das Vertentes region, Minas Gerais State, Brazil: a case-control study. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 606-613, 2019. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5826.

CUNHA, J. A.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens—a review. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 2, p. 328-344, 2018. DOI: doi.org/10.1111/jam.13911.

DAMASCENO, Elisa Tatiana Silva *et al.* *Lippia origanoides* Kunth. essential oil loaded in nanogel based on the chitosan and ρ -coumaric acid: encapsulation efficiency and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 85-94, 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.08.074.

ESCOBAR, Patricia *et al.* Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

FALCÃO-SILVA, Vivyanne S. *et al.* Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 10, p. 1367-1370, 2009. DOI: 10.1002/ptr.2695.

FERREIRA, Maria Jaiana Gomes *et al.* Avaliação de plantas medicinais como potenciais aditivos antimicrobianos alimentares. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i5.3295.

FERREIRA, Talita Pereira Souza *et al.* Secondary metabolites from endophytic fungus from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11, n. 16, p. 296-306, 2017. DOI: 10.5897/JMPR2017.6371.

FONSECA, Maria Eduarda Barbosa *et al.* Mastite bovina: Revisão. **Pubvet**, v. 15, n. 2, p. 1-18, 2020. DOI: 10.31533/pubvet.v15n02a743.1-18.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007. DOI: 10.1093/jac/dkm066.

FURLANI, Rodolfo *et al.* Antibacterial activity of essential oils against pathogens of importance in caprine and ovine mastitis. **Revista Caatinga**, v. 34, p. 702-708, 2021. DOI: 10.1590/1983-21252021v34n322rc.

GARINO JUNIOR, F. *et al.* Suscetibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no semiárido paraibano. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 103-107, 2020. DOI: 10.1590/1808-1657v78p1032011.

GOMES, Geovany Amorim. **Estudo químico de Myrcia ovata Cambess.(Myrtaceae) e Lippia sidoides Cham.(Verbenaceae) e avaliação de atividades contra artrópodes.** Seroédica, 2013, 249 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

GOMES, Fernanda *et al.* Phenolic plant extracts versus penicillin G: *in vitro* susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 3, p. 128, 2019. DOI: 10.3390/ph12030128.

GÓMEZ-SEQUEDA, Nicolás *et al.* Antimicrobial and antibiofilm activities of essential oils against Escherichia coli O157: H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Antibiotics**, v. 9, n. 11, p. 730, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9110730.

GONÇALVES, Ana Carolina Siqueira *et al.* Somatic cell count obtained by Ekomilk Scan® and correlations with other methods of analysis. **Ciência Rural**, v. 48, n. 6, 2018. DOI: 10.1590/0103-8478cr20170848.

GUIMARÃES, Luiz Gustavo de L. *et al.* General characteristics, phytochemistry and pharmacognosy of *Lippia sidoides*. **Natural product communications**, v. 10, n. 11, 2015. DOI: 10.1177/1934578X1501001116.

JAMALI, Hossein *et al.* Invited review: incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 4729-4746, 2018. DOI: 10.3168/jds.2017-13730.

JESUS, Renan Almeida; COUTINHO, César Alberto. Uso de medicamentos homeopáticos para o tratamento da mastite bovina: Revisão. **PUBVET**, v. 12, p. 130, 2017. DOI: 10.22256/pubvet.v12n3a58.1-10.

KÉROUANTON, A. *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International journal of food microbiology**, v. 115, n. 3, p. 369-375, 2007. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.050.

KHAN, Saeed A. *et al.* Transfer of erythromycin resistance from poultry to human clinical strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1832-1838, 2000. DOI: 10.1128/JCM.38.5.1832-1838.2000.

KOSALEC, Ivan; BAKMAZ, Marina; PEPELJNJAK, Stjepan. Analysis of propolis from continental and Adriatic region of Croatia. **Acta Pharmaceutica-zagreb-**, v. 53, n. 4, p. 275-286, 2003.

KREWER, Carina C. *et al.* Etiologia, perfil de sensibilidade dos *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos e fatores de risco associados à mastite bovina nos estados da Bahia e Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 601-606, 2013. DOI: 10.1590/S0100-736X2013000500009.

KRUMMENAUER, Amanda; PONZILACQUA, Barbara; ZANI, João Luiz. Atividade antibacteriana de extratos naturais sobre agentes causadores de mastite bovina. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 15, n. 4, 2019.

KUJUMGIEV, A. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999. DOI: 10.1016/S0378-8741(98)00131-7.

KUMAR, Sanath; VARELA, Manuel F. Biochemistry of bacterial multidrug efflux pumps. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 4, p. 4484-4495, 2012. DOI: 10.3390/ijms13044484.

KUROSAWA, Larissa Sayuri *et al.* Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. associados a mastite bovina. **PUBVET**, v. 14, p. 138, 2020. DOI: 10.31533/pubvet.v14n5a563.1-6.

LEAL, Antonio Linkoln Alves Borges *et al.* Antimicrobial action of essential oil of *Lippia origanoides* HBK. **Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology**, v. 5, n. 1, p. 007-012, 2019.

LEITÃO, Suzana Guimaraes *et al.* Counter-current chromatography with off-line detection by ultra high performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry in the study of the phenolic profile of *Lippia origanoides*. **Journal of Chromatography A**, v. 1520, p. 83-90, 2017. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.09.004.

LIMA, Allana Lais Alves *et al.* Perfil de sensibilidade antimicrobiana de bacterias isoladas de leite de vacas com mastite em propriedades de agricultura familiar. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e099119438-e099119438, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i11.9438.

LOBATO, Cláudio Luiz Damé Sayão; DE LOS SANTOS, João Rodrigo Gil. Resíduos de antibióticos no leite: causas e impactos para a indústria e saúde pública. **Science And Animal Health**, v. 7, n. 3, p. 232-250, 2019. DOI: 10.15210/sah.v7i3.17501.

LOPES, M. A. *et al.* Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 477-483, 2012.

MAIA, Gabriela Lemos de Azevedo *et al.* Flavonoids from *Praxelis clematidea* RM King and Robinson modulate bacterial drug resistance. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4828-4835, 2011. DOI: 10.3390/molecules16064828.

MAIA, Natasha L. *et al.* Synergism of plant compound with traditional antimicrobials against *Streptococcus* spp. isolated from bovine mastitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1203, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01203.

MAIOCHI, Rafaela; RODRIGUES, Raquel; WOSIACKI, Sheila. Principais métodos de detecção de mastites clínicas e subclínicas de bovinos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, 2019. DOI: 10.18677/EnciBio_2019A104.

MAR, Josiana M. *et al.* *Lippia origanoides* essential oil: an efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Industrial crops and products**, v. 111, p. 292-297, 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.10.033.

MARCELO, Natalia Arantes *et al.* Efficacy of novel antiseptic product containing essential oil of *Lippia origanoides* to reduce intramammary infections in cows. **Veterinary World**, v. 13, n. 11, p. 2452, 2020. DOI: 10.14202/VETWORLD.2020.2452-2458.

MARQUES, Graziella Silvestre *et al.* Plantas medicinais como alternativa terapêutica para aumento da resistência imunológica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, 2015.

MARX, Hannah E. *et al.* A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. **American journal of Botany**, v. 97, n. 10, p. 1647-1663, 2010. DOI: 10.3732/ajb.1000144.

MASSOTE, Vitória Pereira *et al.* Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária do Sul de Minas-ISSN: 2674-9661**, v. 1, n. 1, p. 41-54, 2019.

MATOS, Rodrigo Antônio Torres. **Resistência à meticilina em estafilococos coagulase positivos e negativos causadores de infecções em animais de companhia e animais de produção**. Patos, 2014, 65p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande.

MENDONÇA, Elaine CL *et al.* Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 859-864, 2012. DOI: 10.1590/S0100-736X2012000900008.

MESQUITA, Alan Andrade *et al.* O impacto da extensão rural no controle da mastite em propriedades de agricultura familiar na região amazônica: Estudo de multicasos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 14, n. 1, p. 76-89, 2020.

MESQUITA, Maria Otammires Mota; PINTO, Tatiana Maria Farias; MOREIRA, Raulzito Fernandes. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isolados de plantas da Caatinga: uma revisão. **Revista Fitos**. V. 11, n. 2, p. 119-249; 2017. DOI: 10.5935/2446-4775.20170028.

MICKYMARAY, Suresh. Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogens. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 257, 2019. DOI: 10.3390/antibiotics8040257.

MORDMUANG, Auemphon *et al.* Evaluation of a *Rhodomyrtus tomentosa* ethanolic extract for its therapeutic potential on *Staphylococcus aureus* infections using *in vitro* and *in vivo* models of mastitis. **Veterinary research**, v. 50, n. 1, p. 1-11, 2019. DOI: 10.1186/s13567-019-0664-9.

NADER, Talita T. *et al.* Avaliação *in vitro* da eficácia de extratos de plantas medicinais do cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolado de diferentes fontes de propriedades leiteiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 429-433, 2010. DOI: 10.1590/1808-1657v77p4292010.

NADER, Talita Thomaz *et al.* Atividade antibiofilme de substâncias de *Croton urucurana* em *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1713-1719, 2018. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5034.

NAZZARO, Filomena *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013. DOI: 10.3390/ph6121451.

OGATA, Atsuya; NAGAHATA, Hajime. Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 7, p. 681-686, 2000. DOI: 10.1292/jvms.62.681.

OLANDA, Gabriela Berguenmaier *et al.* Estabilidade da atividade antibacteriana do extrato de *Pluchea sagittalis* (lam.) cabrera frente a microrganismos causadores da mastite bovina. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 22, n. 1, p. 21-25, 2019. DOI: 10.25110/arqvet.v22i1.2019.6483.

O'LEARY, Nataly *et al.* Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, n. 2, p. 197-219, 2012. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2012.01291.x.

OLIVEIRA, Danilo R. *et al.* Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* HBK. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236-240, 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.01.022.

OLIVEIRA, Danilo R. *et al.* Ethnopharmacological studies of *Lippia organoides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 206-214, 2014. DOI: 10.1016/j.bjp.2014.03.001.

OLIVEIRA, Luciana *et al.* Uso de plantas medicinais no tratamento de animais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 5, n. 08, 2009.

OLIVEIRA, Solange Cristina Canesin *et al.* Extratos de plantas brasileiras no controle da bactéria *Staphylococcus aureus* causadora da mastite contagiosa em bovinos leiteiros. **Revista Tecnológica**, v. 27, n. 1, p. 48-58, 2019. DOI: 10.4025/revtecnol.v27i1.43745.

OPAL, Steven M.; POP-VICAS, Aurora. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria. In: **BENNETT, Jhon. E.; DOLIN, Raphael; BLASER, Martin J. Principles and Practice of Infectious Diseases**. 9th ed., Philadelphia: Elsevier. 2020. p. 222- 239.

OTHMAN, Mukhrizah *et al.* Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 2, p. 161-166, 2011. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.11.008.

OTTO, Michael. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with increased mortality. **Future microbiology**, v. 7, n. 2, p. 189-191, 2012. DOI: 10.2217/fmb.11.156.

PAIM, Jordana Beal *et al.* Avaliação de tratamento homeopático na prevalência da mastite bovina. **PUBVET**, v. 14, n. 11, p. 157, 2020. DOI: 10.31533/pubvet.v14n11a691.1-5.

PASCUAL, M. E. *et al.* *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001. DOI: 10.1016/S0378-8741(01)00234-3.

PEREIRA, A. V. *et al.* Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de Jurema Preta e Neem sobre amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em búfalas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 341-346, 2009. DOI: 10.1590/1808-1657v76p3412009.

PEREIRA, Vera. *et al.* Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food microbiology**, v. 26, n. 3, p. 278-282, 2009. DOI:10.1016/j.fm.2008.12.008.

PEREIRA, Marco Túlio Carrijo; RIBEIRO, Sueli Cristina de Almeida; CARVALHO, Saulo Fernandes Mano. Revisão sobre o uso do ozônio no tratamento da mastite bovina e melhoria da qualidade do leite. **Biosci. J.**, v. 19, n. 2, p. 109-114, 2003.

POZZO, Marcelo *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, p. 667-672, 2011.

QUEIROGA, Maria Cristina *et al.* Antimicrobial activity of essential oils of Lamiaceae aromatic spices towards sheep mastitis-causing *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 5, p. 1155-1165, 2018. DOI: 10.1080/0972060X.2018.1491330.

QUEIROZ, M. R. A. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 737-743, 2014. DOI: 10.1590/1983-084X/130_083.

QUIGUANÁS-GUARÍN, Edwin Stiven. *et al.* *In vitro* antimicrobial and cytotoxic activity of *Lippia origanoides* essential oil against bacteria of potential health concern. **bioRxiv**, 2021. DOI: 10.1101/2021.09.02.458771.

QUINTANA, Marina Cristini Fernandes; DOMINGUES, Isadora Monteiro; RIBEIRO, Andrea Rentz. Uso de óleo ozonizado no tratamento de mastite subclínica em vaca Jersey: Relato de caso. **Pubvet**, v. 13, n. 5, p. 166, 2019. DOI: 10.31533/pubvet.v13n5a336.1-4.

RAHMAN, Sadeeq *et al.* The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. **BioMed research international**, v. 2018, 2018. DOI: 10.1155/2018/9519718.

REIS, Eduardo Mitke Brandão *et al.* Identificação de pontos fracos e fortes associados à qualidade do leite em propriedade leiteira de agricultura familiar. **Pubvet**, v. 11, n. 9, p. 889-900, 2017. DOI:10.22256/PUBVET.V11N9.889-900.

REMPEL, Claudete *et al.* Efeito antimicrobiano de plantas medicinais: uma revisão de estudos científicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 4, p. 57-82, 2019. DOI: 10.6008/CBPC2179-6858.2019.004.0006.

RIBEIRO, Alcy F. *et al.* Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 249-259, 2014. DOI: 10.1016/j.bse.2014.03.014.

RIBEIRO, Fabiana Paiva *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of the *Lippia origanoides* Kunth essential oil from the Carajás National Forest, Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, 2021. DOI: 10.1155/2021/9930336.

ROCCARO, Andrea Sudano *et al.* Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 1968-1973, 2004. DOI: 10.1128/AAC.48.6.1968-1973.2004.

RODRIGUES, Aldenora Maria Ximenes *et al.* Essential Oil of *Lippia origanoides* HBK: a promising compound acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Preprints.org**, v1, 2021. DOI: 10.20944/preprints202109.0261.v1.

RODRIGUES, Francklin *et al.* Atividade bactericida da *Copaifera* sp. frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17, p. 293, 2013.

ROJAS, Janne *et al.* Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Lippia oreganoides* collected in two different seasons in Venezuela. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 3, p. 205-207, 2006. DOI: 10.1177/1934578X0600100306.

ROYSTER, Erin; WAGNER, Sarah. Treatment of mastitis in cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 17-46, 2015. DOI: 10.1016/j.cvfa.2014.11.010.

RUEGG, Pamela. L. Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. **Journal of animal science**, v. 87, n. 13, p. 43-55, 2009. DOI: 10.2527/jas.2008-1217.

SAAB, Andreia Bittar *et al.* Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Nova Tebas, Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 835-843, 2014. DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n2p835.

SANTANA, Jordana Almeida *et al.* Isolation and antimicrobial resistance of coagulase-negative Staphylococci recovered from healthy tortoises in Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v. 52, n. 7, 2022. DOI: 10.1590/0103-8478cr20210354.

SANTOS, Francisco J. B. *et al.* Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* HBK. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 504-506, 2004. DOI: 10.1080/10412905.2004.9698782.

SANTOS, Gleyde Córdova da França. **Leite *in natura* e queijos artesanais comercializados em Cruz das Almas – Bahia: qualidade microbiológica e susceptibilidade antimicrobiana**. Cruz das Almas - BA, 2011, 95p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

SANTOS JÚNIOR, Dinamérico de Alencar *et al.* Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de cabras com mastite no Sertão e Cariri paraibano. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, 2019. DOI: 10.1590/1089-6891v20e-44848.

SANTOS, Lauana Aparecida *et al.* Avaliação da atividade de *Punica granatum* Linnaeus contra *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina e ação anti-inflamatória “*in vivo*”. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 12, n. 1, p. 775-784, 2014. DOI: 10.5892/ruvrd.v12i1.1557.

SARRAZIN, Sandra Layse F. *et al.* Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 145, p. 1-8, 2015. DOI: doi.org/10.1186/s12944-015-0146-7.

SCHABAUER, Andrea *et al.* The relationship between clinical signs and microbiological species, spa type, and antimicrobial resistance in bovine mastitis cases in Austria. **Veterinary microbiology**, v. 227, p. 52-60, 2018. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.10.024.

SILVA, Alessandra P. et al. Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia organoides* (Verbenaceae) essential oils. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0175598, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0175598.

SILVA, Isamara Ferreira da *et al.* Antimicrobial activity of ethanolic extracts from *Commiphora leptophloeos* (mart.) JB Gillett against *Staphylococcus* spp. isolated from cases of mastitis in ruminants. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, 2019. DOI: 10.1590/1089-6891v20e-57228.

SILVA, José Givanildo; ALCÂNTARA, Adrienne M.; MOTA, Rinaldo A. Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina: revisão de literatura. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 223-228, 2018. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-4996.

SILVA, Nathalie A. *et al.* Essential oil composition and antioxidant capacity of *Lippia schomburgkiana*. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 9, 2009. DOI: 10.1177/1934578X0900400925.

SILVA, Viviane A. *et al.* Determinação da atividade antimicrobiana in vitro da *Lippia sidoides* Cham sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 4, n. 1, p. 7-11, 2010. DOI: dx.doi.org/10.30969/acsa.v4i1.34.

SIMÕES, Tânia Valeska Medeiros Dantas; OLIVEIRA, Amaury Apolônio. **Mastite bovina: considerações e impactos econômicos**. Aracaju, Embrapa Tabuleiros Costeiros - ISSN 1678-1953, 2012. 25 p.

SOUSA, Maura Marinete *et al.* Antimicrobial potential of Jurema preta and umburana, native species of the Caatinga biome, on *Staphylococcus* isolated from small ruminants with mastitis. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5, p. 2231-2244, 2020. DOI: 10.5433/1679-0359.2020v41n5Sup1p2231.

SOUZA, Cintya Neves *et al.* Atividade antimicrobiana de plantas medicinais do cerrado mineiro frente a bactérias isoladas de ovinos com mastite. **Revista unimontes científica**, v. 19, n. 2, p. 51-61, 2017.

SOUZA, Letiele Bruck *et al.* Phytochemical analysis, antioxidant activity, antimicrobial activity, and cytotoxicity of *Chaptalia nutans* leaves. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2020, 2020. DOI:10.1155/2020/3260745.

SPEROTTO, Vitor da Rocha. **Atividade antibacteriana in vitro do decocto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC-asteracea-(" macela"), sobre bactérias isoladas de mastite bovina.** Porto Alegre/RS, 2010, 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

STASHENKO, Elena E. *et al.* Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* HBK grown in Colombia. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 4, 2008. DOI: 10.1177/1934578X0800300417.

STASHENKO, Elena E. *et al.* *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 1, p. 93-103, 2010. DOI: 10.1002/jssc.200900452.

STASHENKO, Elena E. *et al.* Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 1, p. 192-202, 2013. DOI: 10.1002/jssc.201200877.

TAKAISI-KIKUNI, Ntongo B.; SCHILCHER, Heinz. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta medica**, v. 60, n. 03, p. 222-227, 1994. DOI: 10.1055/s-2006-959463.

THOMAS, Valérie *et al.* Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. **International journal of antimicrobial agents**, v. 46, n. 1, p. 13-20, 2015. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.03.013.

TOZIN, Luiz Ricardo dos Santos *et al.* Glandular trichome diversity on leaves of *Lippia origanoides* and *Lippia stachyoides* (Verbenaceae): morphology, histochemistry, and ultrastructure. **Botany**, v. 93, n. 5, p. 297-306, 2015a. DOI: 10.1139/cjb-2014-0251.

TOZIN, Luiz Ricardo dos Santos; MARQUES, Marcia OM; RODRIGUES, Tatiane M. Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in the Brazilian Cerrado. **Anais da Academia**

Brasileira de Ciências, v. 87, n. 2, p. 943-953, 2015b. DOI: 10.1590/0001-3765201520140376.

TRINDADE, Soraya Castro *et al.* Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de diferentes espécies do gênero *Lippia*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e22610918051-e22610918051, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i9.18051.

TRONCARELLI, Marcela Zampoli *et al.* Mastite bovina sob nanocontrole: A própolis nanoestruturada como nova perspectiva de tratamento para rebanhos leiteiros orgânicos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 124-136, 2013.

TSUCHIYA, Hironori *et al.* Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, n. 1, p. 27-34, 1996. DOI: 10.1016/0378-8741(96)85514-0.

UZEL, Atac *et al.* Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological research**, v. 160, n. 2, p. 189-195, 2005. DOI: 10.1016/j.micres.2005.01.002.

VANCRAEYNEST, Dieter; HERMANS, Katleen; HAESEBROUCK, Freddy. Prevalence of genes encoding exfoliative toxins, leucotoxins and superantigens among high and low virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains. **Veterinary microbiology**, v. 117, n. 2-4, p. 211-218, 2006. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.05.009.

VICCINI, L. F. *et al.* Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1, p. 171-178, 2005. DOI: 10.1007/s00606-005-0351-3.

VICUÑA, Gloria Carolina; STASHENKO, Elena E.; FUENTES, Jorge Luis. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, n. 5, p. 343-349, 2010. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.10.008.

WALTHER, Carole; PERRETEN, Vincent. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in organic milk production. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 12, p. 5351, 2007. DOI: 10.3168/jds.2007-0547.

XIAO, Jianbo *et al.* Glycosylation of dietary flavonoids decreases the affinities for plasma protein. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6642-6648, 2009. DOI: doi.org/10.1021/jf901456u.

YAO, Liu H. *et al.* Flavonoids in food and their health benefits. **Plant foods for human nutrition**, v. 59, n. 3, p. 113-122, 2004. DOI: 10.1007/s11130-004-0049-7.

ZAGO, Leciana de Menezes Sousa; MOURA, Meirielle Euripa Pádua. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. **Tecnia**, v. 3, n. 1, p. 157-173, 2018.

ZLOH, Mire; KAATZ, Glenn W.; GIBBONS, Simon. Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 14, n. 4, p. 881-885, 2004. DOI: 10.1016/j.bmcl.2003.12.015.

ZIMERMANN, Katia Fabiane; ARAUJO, Maria Eugênia Moraes. Mastite bovina: agentes etiológicos e susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista Campo Digital**, v. 12, n. 1, 2017.