

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
CURSO DE AGRONOMIA

EMERSON JUAN ZANETTI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PRÓPOLIS, ÓLEO
DE GERANIOL E EXTRATO DE CASCA DE ABACATE NO CONTROLE DE
MICROORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA**

CHAPECÓ
2022

EMERSON JUAN ZANETTI

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PRÓPOLIS, ÓLEO DE GERANIOL E EXTRATO DE CASCA DE ABACATE NO CONTROLE DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosiane Berenice Nicoloso Denardin
Co-orientadora: Prof^a Micheli Zanetti

CHAPECÓ

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Zanetti, Emerson Juan

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PRÓPOLIS,
ÓLEO DE GERANIOL E EXTRATO DE CASCA DE ABACATE NO
CONTROLE DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA
/ Emerson Juan Zanetti. -- 2022.

30 f.:il.

Orientadora: Doutora Rosiane Berenice Nicoloso
Denardin

Co-orientadora: Doutora Micheli Zanetti

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Agronomia, Chapecó, SC, 2022.

1. 1. Mastite bovina. 2. Própolis. 3. Óleo de
geraniol. 4. Extrato de casca de abacate. I. Denardin,
Rosiane Berenice Nicoloso, orient. II. Zanetti, Micheli,
co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul.
IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PRÓPOLIS, ÓLEO DE GERANIOL E EXTRATO DE CASCA DE ABACATE NO CONTROLE DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA

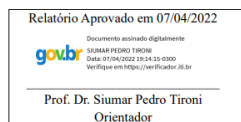
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em
23/03/2022.

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Rosiane Berenice Nicoloso Denardin - UFFS
Orientadora



Relatório Aprovado em 07/04/2022
Documento assinado digitalmente
SIUMAR PEDRO TIRONI
Data: 07/04/2022 14:14:0300
Verifique em <https://verificador.jb.br>
Prof. Dr. Siumar Pedro Tironi
Orientador

Prof. Dr. Siumar Pedro Tironi - UFFS
Avaliador



Prof. Dr. Samuel Mariano Gilson da Silva - UFFS
Avaliador

RESUMO

A mastite é a doença mais frequente e de maior impacto econômico em rebanhos leiteiros no mundo. O seu controle realizado por antimicrobianos tradicionais, deixa presença de resíduos dos medicamentos no leite e tem gerado perdas grandes para os produtores, além de graves problemas de saúde pública. Nos últimos anos tem crescido exponencialmente o número de pesquisas que buscam métodos e/ou produtos alternativos que possam ser empregados na prevenção e tratamento de diversas doenças. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de três produtos naturais, com reconhecidas propriedades biológicas, i.e., própolis, geraniol e extrato de casca de abacate, no controle de microrganismos causadores de mastite bovina, empregando modelos de estudos *in vitro*, frente as bactérias *Staphylococcus aureu* e *Streptococcus agalactiae*. Para a investigação do potencial antimicrobiano, fez-se o uso do método de difusão em ágar e para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), fez o uso do método de diluição em poços. Os resultados mostraram que o geraniol e o extrato de casca de abacate são compostos muito ativos para o controle das bactérias *Staphylococcus aureu* e *Streptococcus agalactiae*.

PALAVRAS-CHAVE: Microrganismos, *Staphylococcus aureu* e *Streptococcus agalactiae*.

ABSTRACT

Mastitis is the most frequent disease with the greatest economic impact on dairy herds worldwide. Its control carried out by traditional antimicrobials leaves the presence of drug residues in the milk and has generated great losses for producers, in addition to serious public health problems. In recent years, the number of researches that seek alternative methods and/or products that can be used in the prevention and treatment of various diseases has grown exponentially. In this context, the present study aimed to evaluate the potential of three natural products, with recognized biological properties, ie, propolis, geraniol and avocado peel extract, in the control of microorganisms that cause bovine mastitis, using in vitro study models, against *Staphylococcus aureu* and *Streptococcus agalactiae* bacteria. For the investigation of the antimicrobial potential, the agar diffusion method was used and for the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the well dilution method was used. The results showed that geraniol and avocado peel extract are very active compounds for the control of *Staphylococcus aureu* and *Streptococcus agalactiae* bacteria.

KEYWORDS: Microorganisms, *Staphylococcus aureu* and *Streptococcus agalactiae*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Mastite	14
3.2 Óleo de geraniol	15
3.3 Extrato de Própolis.....	16
3.4 Extrato de casca de abacate	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Materiais.....	18
4.2 Obtenção dos extratos.....	18
4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	19
4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	19
5. RESULTADO E DISCUSSÕES	21
6. CONCLUSÕES	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do geraniol.....	15
Figura 2 - Testes de difusão para Geraniol (a), extrato da casca do abacate (b), e da própolis (c) para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Figura 3 - Testes de difusão para Geraniol (a), extrato da casca do abacate (b), e da própolis (c) para a bactéria <i>Streptococcus agalactiae</i>	21
Figura 4 - Testes de MIC para Geraniol (a), própolis (b) e extrato da casca do abacate (c) para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Figura 5 - Testes de CIM para Geraniol (a), própolis (b) e extrato da casca do abacate (c) para a bactéria <i>Streptococcus agalactiae</i>	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diâmetro médio dos halos de inibição por difusão em ágar para os compostos avaliados frente as bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	22
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos geraniol, própolis e extrato de abacate, obtida da pela técnica da microdiluição em caldo com inóculo de 10^8 UFC·mL ⁻¹ frente às bactérias <i>S. aureus</i> e <i>S. agalactiae</i>	24

1. INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) declarou que o Brasil se encontra entre os países que possuem maior produção de leite do mundo, ocupando a quarta posição no “ranking mundial”. Contudo, essa produção vem acompanhada de muitos desafios e dificuldades, como oscilações na qualidade do produto e a garantia da condição sanitária dos estabelecimentos e equipamentos utilizados na ordenha (FAO, 2021).

Dentre os problemas enfrentados na cadeia produtiva de leite, as doenças ocasionadas na glândula mamária, são uma das principais causas de prejuízos, tanto na questão da qualidade do leite quanto na questão de descarte de vacas. Sendo a mastite considerada como a principal doença na cadeia bovina do mundo.

A mastite possui diversas causas, entre elas a ambiental e a contagiosa. Sabe-se ainda, que dessas inúmeras causas, o acometimento por microrganismos é o mais recorrente, principalmente por bactérias como *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (MEYER et al., 2013).

Os agentes contagiosos vivem e se multiplicam sobre ou dentro da glândula mamária e sua transmissão ocorre de animal para animal ou de teto para teto durante a ordenha. Dentre os microrganismos, *Staphylococcus aureus* são os agentes mais comuns relacionados à mastite bovina contagiosa, com potencial desenvolvimento de fatores de resistência a quase todos os agentes antimicrobianos sintéticos. Esta resistência antimicrobiana desenvolvida pelos patógenos é uma das principais razões da baixa taxa de cura desta doença (FIGUEIREDO, 2018).

A inflamação da glândula mamária pode ser classificada em clínica e subclínica, de acordo com sinais apresentados pelos animais. Quando clínica, o tratamento tende a ser mais rápido e eficaz, pois é notada rapidamente pelo produtor (SCHVARZ e SANTOS, 2012). Já nos casos subclínicos, o diagnóstico torna-se menos específico, pois o animal não apresenta sinais evidentes e, dependendo da causa, pode disseminar a doença para outros animais da propriedade.

De acordo com Santos et al. (2017), a mastite é considerada a doença de maior importância para o rebanho leiteiro tanto no Brasil quanto no mundo, gerando danos no âmbito econômico, diminuindo a qualidade do leite e causando prejuízos para o produtor rural.

Contudo nos últimos anos têm-se realizado uma busca com maior avidez, baseada na biodiversidade de plantas presentes em nosso país, por recursos genéticos e bioquímicos que possam ser modificados ou que apresentem moléculas bioativas com potencial farmacêutico. Ainda que a maioria das pesquisas seja relacionada à atividade de produtos vegetais, produtos de origem animal também têm conquistado espaço, tais como, os originados do metabolismo das abelhas, principalmente o mel, própolis e cera (BASTOS et al., 2011).

A própolis é conhecida há muito tempo por ser antiviral, antiinflamatório, antibacteriano, anestésico, antioxidante, antitumoral, anticâncer, antifúngico, antifúngico protozoário, anti-hepatotóxico, anti-mutagênico, anti-séptico, etc. (TORETI et al., 2013; SFORCIN, 2016).

As características físico-químicas e as propriedades naturais de vários tipos de própolis vêm sendo estudadas na última década. Novos compostos antimicrobianos ativos foram identificados na própolis. Esses compostos modulam positivamente a resistência antimicrobiana de bactérias multirresistentes. Pesquisas publicadas indicaram que a própolis e seus derivados possuem muitos compostos antimicrobianos naturais com amplo espectro contra diferentes tipos de bactérias e que aumentam a eficácia dos antibióticos convencionais. Além disso, a combinação da própolis com outros compostos, como o mel, tem sido estudada, de forma que tais combinações tenham um efeito sinérgico contra cepas bacterianas como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (ORYAN, ALEMZADEH e MOSHIRI, 2018).

Em geral, os óleos essenciais derivados de plantas são considerados compostos potencialmente eficazes contra micro-organismos e são líquidos oleosos aromáticos, voláteis à temperatura ambiente, caracterizados por um forte aroma, sendo raramente coloridos e geralmente tendo densidade menor que a água. São misturas de diferentes compostos, mas os principais componentes são terpenóides e terpenos (hidrocarbonetos cíclicos). As atividades antimicrobianas dos óleos essenciais dependem da combinação e das proporções dos diferentes compostos encontrados na sua constituição (MIHAI; POPA, 2015; PAUL; DUBEY; KANG, 2011; RUIZ; FLOTATS, 2014).

O geraniol, é um álcool monoterpene e isômero do nerol, sendo extraído com elevada concentração do óleo de palmarosa (FAHLBUSCH et al., 2003; SCHERER et al., 2009). Este composto também possui ação antimicrobiana comprovada contra algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (JIROVETZ et al., 2007; CHEN; VILJOEN, 2010) e frente a fungos, como *Candida albicans*, *Candida glabrata*,

Candida krusei, *Aspergillus niger*, *Penicillium verrucosum*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (YOKOMIZO; NAKAOKA-SAKITA, 2014; MARTINS; SOUZA, 2015; PEREIRA; LIMA, 2017).

O abacate é uma planta dicotiledônea pertencente à família Lauraceae, e ao gênero *Persea*, que é dividido em dois subgêneros: *Persea* e *Eriodaphne*, sendo o subgênero *Persea* americana o mais estudado. Trata-se de uma frutífera subtropical de alto valor nutritivo e com características funcionais, tanto para a nutrição humana quanto para a produção de cosméticos (KOLLER, 2002; SIBEN, 2012). O extrato de cascas de abacate em estudos com atividades antioxidante e antimicrobiana mostra-se promissor. O extrato apresenta resultados expressivos, com alta atividade antioxidante, além de características inibitórias frente a *S. aureus* e *S. enteritides* (LIBERINO et al., 2018).

Com base no apresentado e nos impactos causados pelas perdas por mastite, este trabalho é de suma importância para avaliar o potencial antimicrobiano destes três compostos naturais, cumprindo com a parte inicial de caracterização de materiais, para futuramente serem utilizados em produtos de controle em plantéis de vacas leiteiras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana do própolis, óleo de geraniol e extrato de casca de abacateiro no controle das bactérias causadoras da mastite.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a concentração mínima inibitória de cada um dos compostos para obtenção do produto derivado frente aos micro-organismos de importância na saúde animal;

Avaliar da atividade antimicrobiana do extrato de própolis frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

Avaliar da atividade antimicrobiana do óleo de geraniol frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

Avaliar da atividade antimicrobiana do extrato de casca de abacateiro frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mastite

A teoria da infecção foi fundamentada no século XIX, através da injeção da secreção obtida de mamas inflamadas no canal da teta de vacas sadias. Posteriormente, investigações microbiológicas de numerosos pesquisadores permitiram o conhecimento de vários tipos de agentes infecciosos (OLIVEIRA, 2015).

Segundo Sá, et al., (2018), na Revista Brasileira de Gestão Ambiental (2018), informa um grupo diversificado de microrganismo que tem sido reportado à mastite bovina, no qual se inclui: bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A incidência de infecções virais, microplasma e fungos relacionados à mastite, também são relatados pela literatura, porém com menores incidências. A literatura afirma que esta enfermidade pode ser causada por aproximadamente 137 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros, sendo a bactéria com maior prevalência (OLIVEIRA et al., 2012).

Segundo Sá, et al., (2018), os agentes etiológicos causadores de mastite infecciosa são classificados em dois grupos: contagiosos e ambientais. Os agentes contagiosos vivem e se multiplicam sobre ou dentro da glândula mamária e sua transmissão ocorre de animal para animal ou de teto para teto durante a ordenha. Dentre os microrganismos, *Staphylococcus aureus* são os agentes mais comuns relacionados à mastite bovina contagiosa, com potencial desenvolvimento de fatores de resistência a quase todos os agentes antimicrobianos sintéticos (FIGUEIREDO, 2018).

Os agentes ambientais vivem no meio onde os animais são criados e a infecção das glândulas ocorre no período entre as ordenhas. A mastite por agentes ambientais instala-se quando a imunidade do hospedeiro está comprometida ou quando as condições higiênicas sanitárias não são favoráveis (MASSOTE, et al., 2019).

Os principais agentes ambientais são os coliformes e algumas espécies de estreptococos (*Streptococcus uberis* e *agalactiae*), sendo o ambiente onde a vaca vive o local onde esses agentes são encontrados. A mastite ambiental caracteriza-se por ser uma infecção curta, que resulta em queda acentuada da produção de leite e até mesmo na morte da vaca (NEGRÃO; DANTAS, 2010).

Tanto a mastite contagiosa quanto a ambiental “ocasionam um processo inflamatório do úbere, acompanhado da redução de secreção de leite e mudança de permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue” (SANTOS et al., 2017).

Esta doença pode ser de dois tipos, mastite clínica e mastite subclínica. (MASSOTE et al., 2019). Como afirma Coser, Lopes e Costa (2012) independentemente do tipo da intensidade da mastite, irá implicar na diminuição do fornecimento do leite.

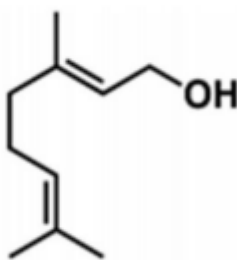
O estudo e o desenvolvimento de novas ferramentas para o tratamento da mastite é importante pelo impacto econômico e de bem estar animal. Verificar o efeito de novos compostos pode ser uma estratégia a ser utilizada devido ao aumento da resistência bacteriana contra antibióticos comumente utilizados no tratamento da mastite e as mudanças de virulência e perfil antigênico dos patógenos que apresentam relevância clínica e ecológica (JESUS et al., 2017).

3.2 Óleo de geraniol

Os óleos essenciais possuem a característica de atuarem como antimicrobianos naturais (EBRAHIMI, 2008). Os óleos essenciais têm grande importância industrial e são principalmente utilizados pelas indústrias de perfumaria, cosméticos, alimentos e farmacêutica (TRANCOSO et al., 2013).

Geraniol (3,7-dimetilocta-trans-2,6-dien-1-ol) é um álcool acíclico monoterpeneo com a fórmula química $C_{10}H_{18}O$ (Figura 1). O produto referido como "geraniol" é uma mistura dos dois cis-trans isômeros corretamente denominados geraniol (trans) e nerol (cis). Geraniol é um álcool terpeno comercialmente importante que ocorre nos óleos essenciais de várias plantas aromáticas (CHEN e VILJO, 2010)

Figura 1 - Estrutura química do geraniol



Fonte: Si et al. (2005)

Si et al., (2005) e Scherer et al., (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes tipos de óleos essenciais, entre estes o geraniol que se apresentou como um dos óleos essenciais com capacidade de inibição da bactéria *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* superior a 80% para concentrações de óleo de apenas 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e com concentração mínima inibitória (MIC) entre 0,4 e 0,6 mg.L^{-1} para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

O estudo e o desenvolvimento de novas ferramentas para o tratamento da mastite é importante pelo impacto econômico e de bem estar animal. Verificar o efeito de novos compostos pode ser uma estratégia a ser utilizada devido ao aumento da resistência bacteriana contra antibióticos comumente utilizados no tratamento da mastite e as mudanças de virulência e perfil antigênico dos patógenos que apresentam relevância clínica e ecológica (JESUS et al., 2017).

3.3 Extrato de Própolis

Mesmo sendo conhecida na medicina popular desde a antiguidade, a própolis tem atraído atenção de pesquisadores por sua utilidade na medicina e na cosmética, sendo amplamente estudada sua função antimicrobiana. Inúmeros estudos relatando as propriedades biológicas da própolis já foram descritos (SFORCIN et al., 2000).

A ação antibacteriana da própolis é evidenciada principalmente sobre as bactérias Gram positivas. Apesar de haver efeito contra as bactérias Gram-negativas, as Gram-positivas mostraram-se mais suscetíveis à própolis, sendo este fato atribuído à ação dos compostos presentes na própolis sobre a parede celular das bactérias Gram-positivas. E apesar da parede celular das bactérias Gram-negativas não ser tão rígida quanto as Gram-positivas, é quimicamente mais complexa e possui maior teor lipídico que as Gram-positivas (VARGAS et al., 2004).

Sugere-se que o extrato etanólico de própolis tem efeito bactericida causado pela presença de ingredientes muito ativos, porém, lábeis. É sugerido que a combinação de extratos de própolis com antimicrobianos possa permitir a redução da dose clínica de determinados antibióticos e, assim, diminuir a incidência de efeitos colaterais e ao mesmo tempo potencializar a antibioticoterapia no tratamento de infecções em que a resistência bacteriana torna-se fator determinante (MIRZOEVA et al., 1997). Nenhum

componente isolado possui atividade antibacteriana sobre o *Staphylococcus aureus*, ou outra bactéria, tão potente quanto todo o extrato (KUJUMGIEV et al., 1999).

No caso de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite bovina, testes *in vitro* com amostras de extratos de própolis, originários da Polônia, mostraram uma concentração inibitória mínima em torno de 80 µg/mL (MERESTA et al., 1985). Meresta et al., (1989) testaram um tratamento de mastite bovina com extrato de própolis. A recuperação completa foi observada em 86,6% das vacas com mastite aguda, em 100% dos casos de infecção causados por *Candida albicans*, 85% por *Escherichia coli*, 91% por *Staphylococcus* sp. e 84,3% por *Streptococcus* sp. Os autores ainda concluíram que a própolis apresenta-se bastante efetiva na terapia da mastite causada por microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais.

3.4 Extrato de casca de abacate

O uso da casca de abacate (*Persea americana*) em pesquisas vem crescendo nas últimas décadas. Estudos descrevem atividades hepatoprotetora, anti-inflamatória e analgésica, anti-hipertensiva, antioxidante e antimicrobiana dessas porções do abacate (ADEYEMI; OKPO; OGUNTI, 2002).

Dados etnofarmacológicos apontam que o abacate possui as seguintes propriedades: anti-inflamatória, antianêmica, antidiarreica, anti-helmíntica, antirreumática, antioxidante, antisséptica das vias respiratórias, antiuricêmica, balsâmica, carminativa, cicatrizante, depurativa, digestiva, diurética, emoliente, estomáquica, umectante, vermífuga e vulnerária. Com essas propriedades, a planta é usada popularmente em afecções hepáticas, doenças renais e vias urinárias, cistites, diarreias, disenterias, gases intestinais e estomacais, aftas, distúrbios das vias urinárias, para regularizar o fluxo menstrual e liberar a menstruação, ação está atribuída aos flavonoides. O óleo tem grande riqueza de vitaminas e de grande utilidade no combate ao raquitismo (LORENZI, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

- Água destilada
- Água deionizada
- Álcool Etílico ABS. P.A-ACS - Dinâmica Química Contemporânea Ltda.
- 2,3,5 - Triphenyltetrazolium chloride (TTC) \geq 95% - Sigma-Aldrich Brasil Ltda
- 2,2-difenil-1-picril-hidrazil - Sigma-Aldrich Brasil Ltda
- Müller Hinton Agar - Sigma-Aldrich Brasil Ltda
- Sabouraud Dextrose Agar – Kasvi
- Geraniol Sigma Aldrich 99,9%.
- Própolis em pó

4.2 Obtenção dos extratos

O composto geraniol foi utilizado puro P.A, já a própolis foi adquirida em uma casa de produtos naturais da cidade e apenas fez-se a diluição na proporção 1:1 própolis em pó e água, sem preparo de extrato. Já para o extrato de abacate, a casca de caule de abacateiro foi coletada de um ramo lateral, de uma planta adulta, localizada na zona rural do município de Descanso, Santa Catarina (-26°80'55.64"S -53°56'55.64" W). Os fragmentos de casca de caule foram coletados em novembro de 2018, quando a mesma encontrava-se no estágio de plena floração. O material coletado foi transportado até o laboratório de Bromatologia da Universidade Federal da Fronteira Sul fragmentado, utilizando-se facas para cortar a casca em fragmentos com cerca de 1 cm. Estes foram acondicionados em galões, na proporção de 2 kg de casca de caule para 2 litros de álcool 92% (v/v água), sendo deixados de molho por cerca de 40 dias.

Após macerado, o extrato alcoólico foi coado em papel filtro e levado ao rota evaporador, sob rotação média e temperatura de 48-50°C, até total evaporação do álcool, obtendo-se o extrato seco, mantido sob refrigeração (5-6°C). Os extratos foram diluídos em água Milli-q a uma concentração de 0,01 g/ml.

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

Avaliou-se a atividade antimicrobiana para as cepas de *Staphylococcus aureus*, e *Streptococcus agalactiae*. Foi realizado o teste de difusão em ágar com 18 placas baseado no documento M31-A3 (CLSI, 2012) utilizando cada um dos compostos. Nas placas de Petri esterilizadas, adicionou-se o ágar correspondente ao micro-organismo avaliado. Estriou-se o inóculo de 10^8 UFC/mL em toda área superficial. Fez-se os poços, em triplicata, de 9 mm no ágar e foram dispostos 100 μ L de extrato cada. As placas foram levadas à estufa (QUIMIS Q-316M5) a 36 °C por 24 h. Os diâmetros dos halos ao redor de cada poço foram mensurados em milímetros.

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O geraniol, o extrato de própolis e o extrato de casca de abacate foram submetidos à investigações de avaliação da atividade antimicrobiana para as bactérias, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

A determinação da atividade antimicrobiana dos compostos foi realizada por meio da técnica da Concentração Inibitória Mínima (CIM), segundo metodologia descrita pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em forma de “U, nos quais foram adicionados 100 μ L meio de cultura BHI (Heart Infusion Broth - Caldo Cérebro Coração) para crescimento microbiano. Posteriormente, na primeira linha, foram adicionados 100 μ L da solução contendo o agente antimicrobiano em estudo na maior concentração, sendo reduzido a concentração pela metade na sequência dos poços posteriores. Finalmente, em cada poço, foram adicionados 5 μ L de suspensão microbiana com 10^8 UFC mL⁻¹. As microplacas foram incubadas em estufa microbiológica, sob temperatura de 37 ± 1 °C por 20 h, de modo a promover o crescimento microbiano. Após decorrido este período, foi adicionado em cada poço 20 μ L de TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico), agente que promove a coloração das células, possibilitando a visualização do crescimento bacteriano. As microplacas foram levadas para a estufa bacteriológica por mais 4 h, sendo então retiradas para visualização da coloração, que apresenta-se avermelhada nos poços cuja adição dos materiais não foi suficiente para causar a morte microbiana, sendo identificado o

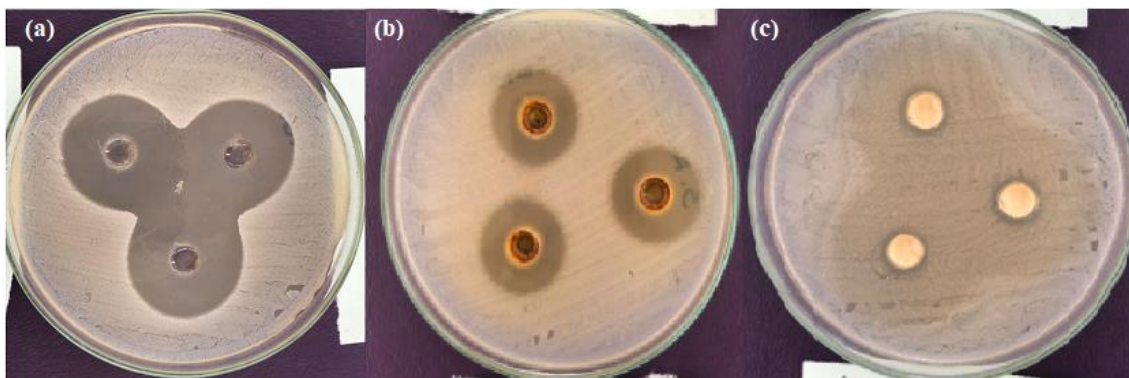
crescimento. Nos poços que não apresentaram coloração, portanto, não houve crescimento microbiano, pois naquela concentração, o agente antimicrobiano foi eficaz, evitando a proliferação das bactérias. Para a coluna 12, que representa o branco (controle) e contém apenas 100 μL de meio de cultura, os resultados mostram que a placa e o meio utilizado estão estéreis, visto que os poços estão incolores, indicando que não houve crescimento de bactérias.

5. RESULTADO E DISCUSSÕES

Primeiramente os compostos ativos foram testados quanto ao seu poder antimicrobiano pelo método de difusão em ágar, seguindo a definição de estabelecida por Alves et al. (2000), o qual estabelece que diâmetros dos halos de inibição menores que 9 mm devem ser considerados microbiologicamente inativos, os diâmetros entre 9 mm e 12 mm como parcialmente ativos, os diâmetros entre 13 mm e 18 mm como ativos e os diâmetros maiores que 18 mm muito ativos.

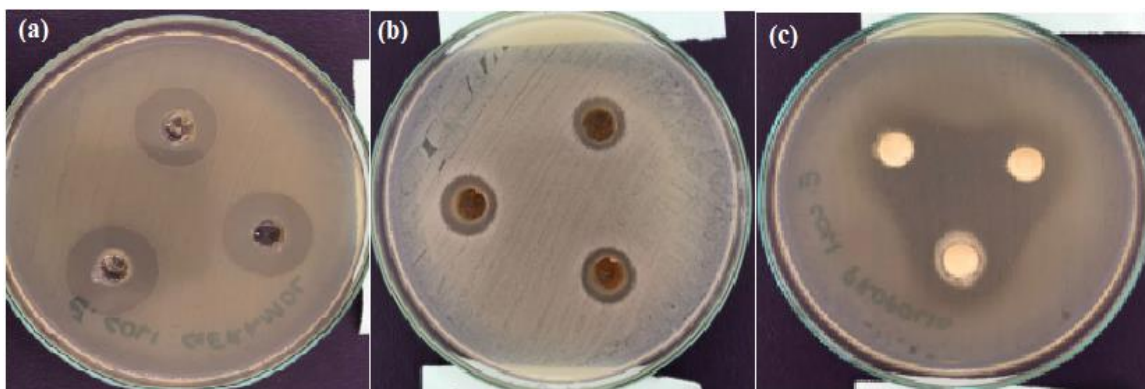
A Figura 2 apresenta os resultados dos testes de difusão para Geraniol, extrato da casca do abacate, e da própolis para a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Figura 2 - Testes de difusão para Geraniol (a), extrato da casca do abacate (b), e da própolis (c) para a bactéria *Staphylococcus aureus*.



A Figura 3 apresenta os resultados dos testes de difusão para Geraniol, extrato da casca do abacate, e da própolis para a bactéria *Streptococcus agalactiae*.

Figura 3 - Testes de difusão para Geraniol (a), extrato da casca do abacate (b), e da própolis (c) para a bactéria *Streptococcus agalactiae*.



A Tabela 1 apresenta os valores dos halos de inibição obtidos para cada uma das bactérias testadas com os três compostos ativos, conforme figuras apresentadas acima.

Tabela 1 - Diâmetro médio dos halos de inibição por difusão em ágar para os compostos avaliados frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

Compostos	Média (\pm SD) diâmetro dos halos de inibição em mm	
	Microrganismos	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>
Geraniol	22,1 \pm 0,10	13,5 \pm 0,05
Extrato de casca de abacate	12,5 \pm 0,10	7,0 \pm 0,05
Própolis	2,0 \pm 0,10	0,0 \pm 0,00

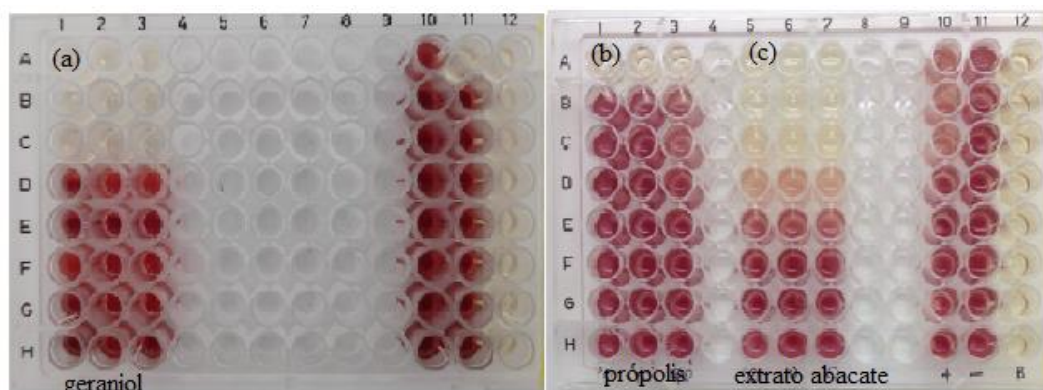
Fonte: o autor (2022).

De acordo com sua capacidade antimicrobiana, o geraniol se apresenta como um composto muito ativo para *S. aureus* e ativo para *S. agalactiae*, o extrato de casca de abacate se mostrou ativo para *S. aureus* e parcialmente ativo para *S. agalactiae*, já a própolis em pó não apresentou atividade para nenhuma das bactérias testadas.

Chang, Chen e Chang (2001) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de folhas de canela (*Cinnamomum osmophloeum*) e seus constituintes. Dentre os constituintes majoritários, atrás do cinamaldeído, o acetato de geranila e o geraniol estão presentes. Os resultados mostraram excelente efeito inibitório, com concentração mínima inibitória de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella* sp. e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Vibrio parahaemolyticus*.

Nas microplacas da Figuras 4, para a coluna 10 (controle positivo), observa-se a coloração vermelho intenso, indicando o crescimento das bactérias sem resistência ao meio de cultura, visto que esta coluna apresenta os resultados dos testes com 100 μL de BHI e 5 μL da suspensão bacteriana. Para a coluna 11 (controle negativo), onde o meio contém 100 μL de BHI, 100 μL da solução de 10% de DMSO (dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo) e 5 μL da suspensão bacteriana, os resultados indicam que na concentração empregada o solvente DMSO não inibe o crescimento bacteriano, pois todos os poços apresentam a coloração vermelho intenso.

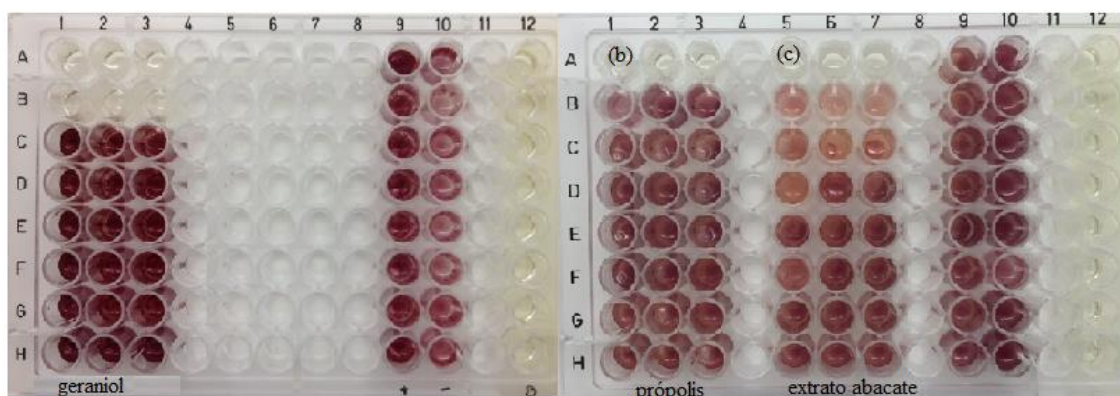
Figura 4 - Testes de CIM para Geraniol (a), própolis (b) e extrato da casca do abacate (c) para a bactéria *Staphylococcus aureus*.



Em relação aos compostos avaliados, frente ao micro-organismo *Staphylococcus aureus* verifica-se que a concentração inibitória mínima ocorre entre as linhas C e D para o geraniol (Figura 4 a), entre as linhas A e B para a própolis (Figura 4 b, colunas 1, 2 e 3), entre as linhas D e E para o extrato de abacate (Figura 4 c, colunas 5, 6 e 7). A coloração vermelha indica a presença de células bacterianas vivas. Portanto, nas linhas destacadas onde a coloração não é vermelha (incolor), não ocorreu o crescimento bacteriano, o que representa que os compostos foram inibidores. Cabe ressaltar que a intensidade visual da coloração vermelha é menor nas linhas de maior concentração dos compostos e maior nas linhas de menor concentração. Este comportamento é um indicativo da redução da taxa de crescimento bacteriano com o aumento da concentração de composto até o valor da CIM.

Já nas microplacas da Figuras 5, temos a coluna 9 (controle positivo), a coluna 10 (controle negativo) e a coluna 12, que representa o branco (controle). Em relação aos compostos avaliados, frente ao micro-organismo *Streptococcus agalactiae*, verifica-se que a concentração inibitória mínima ocorre entre as linhas B e C para o geraniol (Figura 5 a), entre as linhas A e B para a própolis (Figura 4 b, colunas 1, 2 e 3), entre as linhas A e B para o extrato de abacate (Figura 4 c, colunas 5, 6 e 7).

Figura 5 - Testes de CIM para Geraniol (a), própolis (b) e extrato da casca do abacate (c) para a bactéria *Streptococcus agalactiae*.



A Tabela 2 apresenta os valores das concentrações mínimas inibitórias para cada um dos compostos avaliados.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos geraniol, própolis e extrato de abacate, obtida da pela técnica da microdiluição em caldo com inóculo de 10^8 UFC·mL⁻¹ frente às bactérias *S. aureus* e *S. agalactiae*.

Concentração inibitória mínima [mg·mL⁻¹]			
Microrganismos	Geraniol	Própolis	Extrato de abacate
<i>S. aureus</i>	6,25	500	12,5
<i>S. agalactiae</i>	12,5	500	50

Fonte: o autor (2022).

O geraniol teve uma concentração inibitória mínima mais baixa do que os outros extratos para ambas as bactérias *S. aureus* (6,25 mg·mL⁻¹) e *S. agalactiae* (12,50 mg·mL⁻¹), para a própolis para bactérias *S. aureus* e *S. agalactiae* (500 mg·mL⁻¹) e para o extrato de abacate para as bactérias *S. aureus* (12,50 mg·mL⁻¹) e *S. agalactiae* (50,00 mg·mL⁻¹).

Duarte et al. (2007) identificaram que o geraniol demonstrou ação antibacteriana contra duas cepas de *E. coli* com valores de CIM para geraniol de 8 µg·mL⁻¹ a 20 µg·mL⁻¹. Andrade et al. (2013) identificaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) com 57,49% de geraniol em sua composição contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. O óleo apresentou valores de CIM de 0,48 mg·mL⁻¹ para *S. aureus*, 1,90 mg·mL⁻¹ para *E. coli* e maiores que 26,22 mg·mL⁻¹ para *P. aeruginosa*. Ilić et al. (2017) descobriram que o geraniol demonstrou atividade

antimicrobiana contra *E. coli* com um valor de CIM de 1386,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* com valor de CIM e CBM de 2773,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Libero et al. (2018) verificaram que o extrato aquoso das cascas de abacate apresentou resultados inexpressivos (até 10.000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ não inibiu o crescimento dos microrganismos *S. aureus* e *S. enteritides*. Também Ciolfi (2010), verificou que o extrato aquoso de abacate *Persea Gratissima* (caroço e folha) não apresentou efeito inibitório até a concentração de 2% frente as bactérias *S. aureus* e *Salmonella*. O efeito inibitório obtido em nosso trabalho, pode ser explicado pela obtenção do extrato ter sido realizada utilizando-se álcool para extração, este extrai compostos diferentes aos que podem ser extraídos pela extração aquoso utilizando como solvente água.

Vale lembrar que se utilizou neste trabalho um diluição 1:1 própolis e água e não um extrato aquoso, isso com certeza teve efeito sobre a não verificação de atividade, pois não ocorre difusão em ágar de material. Um estudo realizado por Pinto et al. (2001) demonstrou que o extrato etanólico de própolis foi eficaz como antimicrobiano contra isolados de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativo* e *Streptococcus agalactiae*, tendo apresentado resultados estatisticamente diferenciados, quando se utilizou etanol ou água como solvente de extração. Para esses autores, o *Streptococcus* sp. apresentou-se mais sensível ao extrato do que os isolados de *Staphylococcus* sp. A maior sensibilidade à própolis estaria de acordo com o perfil de maior sensibilidade aos antimicrobianos de uso comum, que o gênero *Streptococcus* apresenta, quando comparado a outras bactérias causadoras de mastite.

6. CONCLUSÕES

Ao final do trabalho foi possível concluir que tanto o geraniol quanto o extrato da casca do abacate apresentaram atividade frente as bactérias testadas. Este trabalho se torna importante pois, avalia a capacidade e a concentração de três extratos naturais, que podem ser utilizados no combate das duas principais bactérias provedoras de mastite bovina.

Os resultados mostraram que o geraniol e o extrato de casca de abacate são compostos muito ativos para o controle das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, sendo 6,25 mg·mL⁻¹ e 12,5 mg·mL⁻¹ respectivamente a concentração de geraniol e 12,5 mg·mL⁻¹ e 50 mg·mL⁻¹ respectivamente a concentração de extrato da casca de abacate necessária para inibir o crescimento. A própolis em pó puro, não apresentou atividade para as bactérias testadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEYEMI, O. O.; OKPO, S. O.; OGUNTI, O. O. Analgesic and antiinflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (lauraceae). **Fitoterapia**, Benin, v. 73, p. 375-380, Aug. 2002.

ANDRADE, B. F. M. T.; BARBOSA, L. N.; PROBST, I. S.; JUNIOR, A. F.. Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 34-40, 29 nov. 2013. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2013.860409>.

BASTOS, E.M.A.F., GALBIATI, C., LOUREIRO, E.M. & SCOARI, D.O. 2011. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 63: 1255-1259.

CHANG, S.; CHEN, P.; CHANG, S.. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, [s.l.], v. 77, n. 1, p. 123-127, set. 2001. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00273-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00273-2).

CHEN W, VILJO AM (2010) Geraniol-a review of a commercially important fragrance material. *Safr J Bot* 76: 643-651.

CHEN, W.; VILJOEN, A. M.. Geraniol - A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal Of Botany*, [s.l.], v. 76, n. 4, p. 643-651, out. 2010. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>. Acesso em: 03 mar 2022.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. 9 ed. Wayne, PA, USA, 2012.

COSER, S. M.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M.; Mastite bovina: controle e prevenção: revisão de literatura. *Boletim Técnico, Lavras/MG, ufla*, n.º 93 -p. 1-30, 2012.

Disponível em SANTOS, Issac Pereira dos. Mastite bovina: diagnóstico e prevenção – Patos, 2016. 20 f.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, [s.l.], v. 111, n. 2, p. 197-201, maio 2007. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.034>. Acesso em: jul. 2019.

EBRAHIMI, S. N.; HADIAN, J.; MIRJALILI, M.H.; SONBOLI, A.; YOUSEFZADI, M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at diferente phenological stages. **Food Chemistry**, v. 110, p. 927-931, 2008. em-resumo/pt/. Acesso em: 14 fev. 2022.

FAHLBUSCH, K. G.; HAMMERSCHMIDT, F. J.; PANTEN, J.; PICKENHAGEN, W.; SCHATKOWSKI, D.; BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. Flavors and Fragrances. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Germany, v. 15, p. 73-198, 2003. Disponível em: https://doi.org/10.1002/14356007.a11_141. Acesso em: 03 mar 2022.

FIGUEIREDO. C. H. A. Micro-organismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia agroindustrial. 2018. 35 f. Artigo (Mestrado Profissional em Sistemas Agroindustriais) -Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, Paraíba, Brasil, 2018

JESUS, R. A. DE; BERGO, D.; RODRIGUES, F. L.; SABEC, G. Z.; MARCUSSO, P. F. Uso de medicamentos homeopáticos na pododermatite em ovinos da raça santa inês – relato de caso. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 4, n. 2, p. 211-219, 2017.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; SCHMIDT, E.; STOYANOVA, A. S.; DENKOVA, Z.; NIKOLOVA, R.; GEISSLER, M.. Purity, Antimicrobial Activities and Olfactoric Evaluations of Geraniol/Nerol and Various of Their Derivatives. *Journal of*

Essential Oil Research, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 288-291, maio 2007. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2007.9699283>. Acesso em: 03 mar 2022.

KOLLER, O.C. Abacate produção de mudas, instalação, manejo de pomares, colheita e póscolheita. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2002.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 235-240, 1999.

LIBERO, F. M.; BECKER L. V.; LAUERMAN, D.; OLIVEIRA, A. L.; PERIN, M.; BEDIN, M.; SCHOENBERGER, P. . Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de cascas de abacate (*Persea americana*). II SIMPÓSIO EM SAÚDE E ALIMENTAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – CAMPUS CHAPECÓ, Chapecó 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

MARTINS, C. T; SOUZA, L. K. H. Atividade dos óleos essenciais de *Litsea cubeba* e *Cymbopogon martini* sobre isolados do complexo *Cryptococcus neoformans*. 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

MASSOTE, V. P. et al. Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. *Revista Agroveterinária Do Sul de Minas*, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 41-54, 2019. Disponível em: <https://periodicos.unis.edu.br/index.php/agrovetsulminas/article/view/265>. Acesso em 14 fev, 2022.

MERESTA, L.; MERESTA, T. Sensitivity of bovine mastitis bacteria to propolis in vitro. *Medycyna Weterynaryjna*, v. 41, n. 8, p. 489-492, 1985.

MERESTA, L.; MERESTA, T.; BURDZINSKI, J.; CHMURZYNSKI, P. Treatment of mastitis in cows using an extract of propolis. *Medycyna Weterynaryjna*, v. 45, n. 7, p. 392-395, 1989.

MEYER, N. S., PICOLI, T., PETER, C. M., CZERMAINSKI, L. A., MARQUES, L. T., & ZANI, J. L. (2013). Microorganismos isolados de quartos mamários com mastite sub-clínica em unidades de produção leiteira de Pelotas/RS. Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal..., 22.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potencial and motility of bacteria. *Microbiology Research*, v. 152, n. 3, p. 239-246, 1997.

NEGRÃO, F. M. e DANTAS, C.C.O. Mastite na bovinocultura leiteira: uma revisão. *PUBVET*, Londrina, v. 4, n. 32, 2010. Disponível em <https://www.pubvet.com.br/uploads/275db5c197d7dac80f56de10af931017.pdf>. Acesso em 14 fev, 2022.

OLIVEIRA JÚNIOR, M.B. et al. Fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Garanhuns, Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, [S.L.], v. 32, n. 5, p. 391-395, maio 2012. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2012000500005>. Acesso em 14 fev. 2022.

OLIVEIRA, C. S. F., 1985–Análise Epidemiológica e Bioeconômica da Mastite Bovina em Rebanhos Brasileiros. Escola de Veterinária –UFMG, Belo Horizonte. 2015. Disponível em https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUBD-A5GMBM/1/texto_tese_final_camila_stefanie_fonseca_de_oliveira.pdf. Acesso em 14 fev, 2022.

ORYAN, A. E. ALEMZADEH AND A. MOSHIRI (2018). “Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities.” *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 98.

PAUL, S.; DUBEY, R.C.; MAHESWARI, D. K.; KANG, S. C.. Trachyspermum ammi (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. Food Control, [s.l.], v. 22, n. 5, p. 725-731, maio 2011. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.003>. Acesso em: 03 mar 2022.

PEREIRA, J. A; LIMA, E. O. Atividade antifúngica do geraniol sobre leveduras multirresistentes do gênero Candida e perfil farmacológico e toxicológico em estudos in silico. 2017. 97 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, 2017.

PINTO, M.S.; FARIA, J.E. de; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSO, M.M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.38, p.278-283, 2001.

SÁ, J P. N., FIGUEIREDO, C. H A., NETO, O. L. S., ROBERTO, S. B. A., GADELHA, H. S., ALENCAR, M. C.B. (2018). Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva de leite. Revista Brasileira de Gestão Ambiental (Pombal - PB - Brasil) v. 12, n.1, p 08-20, jan-mar, 2018.

SANTOS, W. B. R.. Mastite bovina: uma revisão. Colloquium Agrariae, São Paulo, v. 13, n. , p. 301-314, 2017. Semestral. Disponível em: <http://journal.unoeste.br/suplementos/agrariae/vol13nr2/MASTITE%20BOVINA%20UMA%20REVIS%C3%83O.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2022.

SCHERER, R., WAGNER, R., DUARTE, M. C. T, GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela, e palmarosa. **Ver. Bras. Pl. Med.** Botucatu, v. 11, n.4, p.442-449, 2009.

SCHVARZ, D. W., & SANTOS, J. M. G. (2012). Mastite bovina em rebanhos leiteiros: Ocorrência e métodos de controle e prevenção. Revista Em Agronegócio e Meio Ambiente, 5(3), 453–473.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES, J. R. A.; LOPES, C. A. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, p. 243-249, 2000.

SFORCIN, J.M., 2016. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother. Res.* 30 (6), 894–905.

SIBEN, P. G. Composição fitoquímica das cascas de *Persea major* (MEISN.) L.E.KOPP (Lauraceae), desenvolvimento e avaliação preliminar de fomas farmacêuticas para o uso tópico. 2012. 89 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2012.

TORETI, V. C., H. H. SATO, G. M. PASTORE AND Y. K. PARK (2013). “Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin.” *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013.

TRANCOSO, M.D.; BAPTISTA, B.A.V.; GOMES, G.A.; GONZALEZ, M.M.; RIBEIRO, T.B. **Óleos essenciais**: extração, importância e aplicações no cotidiano. 53º Congresso Brasileiro de Química Realizado no Rio de Janeiro/RJ, de 14 a 18 de Outubro de 2013. ISBN: 978-85-85905-06-4 wounds. *Adv Skin Wound Care* 2014; 27(7):317-23.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

YOKOMIZO, N. K. S.; NAKAOKA-SAKITA, M.. Atividade antimicrobiana e rendimento do óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 513-520, set. 2014. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/12_097. Acesso em: 03 mar 2022.