

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FORMULAÇÕES
ANTISSÉPTICAS PARA TETOS À BASE DE EXTRATOS
VEGETAIS NO CONTROLE DA MASTITE BOVINA:
AVALIAÇÕES *IN VITRO* E *IN VIVO***

Gabriel Michelutti do Nascimento

Biomédico

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FORMULAÇÕES
ANTISSÉPTICAS PARA TETOS À BASE DE EXTRATOS
VEGETAIS NO CONTROLE DA MASTITE BOVINA:
AVALIAÇÕES *IN VITRO* E *IN VIVO***

Discente: Gabriel Michelutti do Nascimento

Orientadora: Profa. Dra. Marita Vedovelli Cardozo

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Microbiologia
Agropecuária**

2025

N244a

Nascimento, Gabriel Michelutti do

Atividade antimicrobiana de formulações antissépticas para tetos à base de extratos vegetais no controle da mastite bovina: avaliações in vivo e in vitro / Gabriel Michelutti do Nascimento. -- Jaboticabal, 2025

47 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Marita Vedovelli Cardozo

1. Mastite bovina. 2. Extratos vegetais. 3. Bacteriologia veterinária.
I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FORMULAÇÕES ANTISSEPTICAS PARA TETOS À BASE DE EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DA MASTITE BOVINA: AVALIAÇÕES *IN VITRO* E *IN VIVO*

AUTOR: GABRIEL MICHELUTTI DO NASCIMENTO

ORIENTADORA: MARITA VEDOVELLI CARDOZO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br MARITA VEDOVELLI CARDOZO
Data: 07/07/2025 13:15:02-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br NATÁLIA MARAMARQUE NESPOLO
Data: 07/07/2025 13:42:45-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. NATÁLIA MARAMARQUE NESPOLO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - São Carlos/SP

Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA (Participação Virtual) **gov.br** JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Data: 08/07/2025 08:41:05-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. ARGEMIRO SANAVRIA (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) - Rio de Janeiro/RJ

Documento assinado digitalmente
gov.br ARGEMIRO SANAVRIA
Data: 08/07/2025 11:42:07-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 07 de julho de 2025

A handwritten signature in black ink, appearing to be "R. Schocken Iturrino", written over a horizontal line.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gabriel Michelutti do Nascimento, nascido na cidade de Jaboticabal – SP em 15 de abril de 1995, durante os anos de 2014 – 2018 obteve o título de Bacharel em Biomedicina pelo Centro Universitário Barão de Mauá, na cidade de Ribeirão Preto – SP. Trabalhou no Laboratório de Densitometria Óssea e Análise Corporal Animal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/FCAV, Jaboticabal – SP durante o período de setembro de 2018 até julho de 2019. Logo em seguida, durante os anos de 2019 – 2021 concluiu o curso de Pós-Graduação por esta mesma Universidade, obtendo o título de Mestre em Microbiologia Agropecuária. Em 2022 iniciou então o curso de Doutorado no mesmo Programa.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Programa de Microbiologia Agropecuária, pela oportunidade, acolhimento, ajuda e incentivo para a realização deste trabalho e por todo o crescimento pessoal e profissional.

Agradeço também pelo apoio financeiro obtido durante todo o meu Doutorado, através de Bolsa de Estudos fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, através do processo de número 88887.817729/2023-0

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO CEUA.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Produção leiteira.....	03
2.2 Mastite bovina.....	03
2.2.1 Mastite bovina de origem bacteriana.....	04
2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	05
2.3 Produtos antissépticos.....	06
2.4 Produtos naturais.....	07
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	08
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
5. CONCLUSÃO.....	14
6. REFERÊNCIAS.....	14

CERTIFICADO CEUA

O protocolo do experimento envolvendo animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCAV), campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil, sob o Protocolo nº 1206/2024, em 12 de junho de 2024.

Atividade Antimicrobiana de Formulações Antissépticas para Tetos à Base de Extratos Vegetais no Controle da Mastite Bovina: Avaliações *In Vitro* e *In Vivo*

RESUMO – O leite é um alimento de grande importância e amplamente consumido em todo o mundo; por isso, garantir sua qualidade e segurança é fundamental para a prevenção de doenças. A adoção de boas práticas durante a ordenha é essencial para manter a qualidade do leite e prevenir doenças causadas principalmente por bactérias patogênicas. O processo de imersão dos tetos é o principal método de sanitização dos tetos durante a ordenha, sendo comumente realizado com produtos à base de iodo e outros agentes químicos. No entanto, produtos derivados de extratos vegetais têm demonstrado grande eficácia na redução de microrganismos, abrindo a possibilidade de desenvolver uma alternativa natural para a realização desse método de assepsia. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da combinação de extratos vegetais de papaiína, babosa, andiroba, alecrim, melaleuca e barbatimão em ensaios *in vivo*. Adicionalmente, ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foram realizados para averiguar as propriedades antimicrobianas desses extratos. No total, foram coletadas 320 amostras da pele de vacas leiteiras, alocadas em dois grupos: controle (iodo) e tratamento (vegetais). As amostras coletadas foram inoculadas em placas de meio de cultura MacConkey, sangue-azida, sal-manitol, batata-dextrose e nutriente para contagem de Enterobacteriaceae, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., leveduras totais e mesófilos aeróbios totais, respectivamente. Esses microrganismos são frequentemente identificados em casos de mastite bovina, sendo o *Staphylococcus aureus* o principal agente envolvido. Adicionalmente, realizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação do *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos mostraram um desempenho semelhante entre o produto controle e o de tratamento, indicando que os extratos vegetais escolhidos são eficazes na redução da carga microbiana total, de forma comparável ao produto à base de iodo, sendo que ambos foram capazes de reduzir em mais de 80% da carga microbiana, sendo especialmente eficientes contra bactérias Gram-negativas, além de obterem um ótimo escore visual nas análises de conformidade. Isso oferece uma alternativa para o uso em processos de sanitização durante a ordenha, contribuindo para a redução das chances de desenvolvimento de mastite bovina.

Palavras-chave: ensaio *in vivo*, extratos vegetais, mastite bovina, microrganismos

Antimicrobial Activity of Teat Antiseptic Formulations Based on Plant Extracts for Controlling Bovine Mastitis: *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation

ABSTRACT – Milk is a globally important and widely consumed food, making the assurance of its quality and safety critical for disease prevention. Implementing good practices during milking is essential to maintaining milk quality and preventing diseases typically caused by pathogenic bacteria. The teat dipping process, commonly performed with iodine-based products, is the primary method of teat sanitization during milking. However, vegetal-extract products have demonstrated significant efficacy in reducing microbial contamination, presenting an opportunity to develop a natural alternative for aseptic procedures. This study aimed to evaluate the efficacy of a combination of vegetal extracts, specifically papain, *Aloe vera*, andiroba, rosemary, tea tree, and barbatimão, through *in vivo* assays. Additionally, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) assays were conducted to assess the antimicrobial properties of these extracts. A total of 320 skin samples were collected from dairy cows and allocated into two groups: control (iodine-based) and treatment (plant extracts). The collected samples were inoculated onto culture media MacConkey, azide-blood, mannitol-salt, potato-dextrose, and nutrient agar plates to quantify Enterobacteriaceae, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., total yeasts, and total mesophilic aerobes, respectively. These microorganisms are frequently implicated in cases of bovine mastitis, with *Staphylococcus aureus* being the primary pathogen. Additionally, polymerase chain reaction (PCR) was also employed to specifically identify *Staphylococcus aureus*. The results revealed similar efficacy between the control and treatment groups, indicating that the selected plant extracts were effective in reducing the total microbial load, comparable to the iodine-based product, both being able to reduce in more than 80% the total microbial load, being especially efficient against Gram-negative bacteria, moreover, they also showed very good score in the conformity assays. These findings suggest that plant extract-based sanitizing agents could serve as a viable alternative in milking procedures, potentially reducing the incidence of bovine mastitis.

Keywords: bovine mastitis, *in vivo* assay, microorganisms, vegetal extracts

1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença que impõe perdas significativas aos produtores de leite, além das preocupações e riscos que ela representa para a saúde animal e a saúde pública. De acordo com De Souza Rezende (2017), a redução na produção de leite causada pela mastite subclínica, os custos gerados por casos de mastite clínica, a despesa com descarte e morte prematura de animais, gastos veterinários, a compra de medicamentos e o descarte de leite com resíduos antimicrobianos são os principais danos causados pela mastite bovina.

A presença de agentes patogênicos eliminados através do leite contaminado é uma preocupação para a saúde do consumidor. Bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* estão entre os principais agentes causadores de mastite bovina. Em um estudo realizado por X. Song et al. (2020), os autores encontraram isolados de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em mais de 50% das amostras analisadas. Semelhantemente, em outro estudo envolvendo 8 fazendas leiteiras, foram analisadas amostras de leite dos tetos de animais infectados com mastite. Das amostras analisadas, 18,1% apresentaram crescimento microbiano, sendo que *Staphylococcus* spp. (10,4%) e *Streptococcus* spp. (4,6%) foram encontrados de forma mais consistente (Castelani et al., 2013). Complementarmente, um estudo de revisão feito por Ashraf e Imran (2020), também concluiu que o microrganismo *Staphylococcus aureus* é o principal agente causador de mastite mundial, seguido por *Staphylococcus* coagulase negativa (CNS) e *Escherichia coli*.

Embora esses microrganismos sejam os mais prevalentes em casos de mastite, as bactérias da família Enterobacteriaceae também merecem cautela. De acordo com Santiago (2013), os principais são *Escherichia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Yersinia* spp., *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp. A espécie *Escherichia coli* é considerada um dos principais agentes oportunistas da mastite bovina (Tomanić et al., 2023). Outro

estudo realizado por Awandkar et al. (2022) evidenciou que os principais patógenos ambientais incluem bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus* e *Serratia*, sendo também frequentemente associados à posse de genes de resistência antimicrobiana.

Além disso, o uso inadequado de antimicrobianos como medidas preventivas ou terapêuticas pode causar problemas (Silanikove et al., 2010), como o desenvolvimento de resistência antimicrobiana seletiva entre bactérias, inclusive as responsáveis por causarem quadros de mastite (Oliver & Murinda, 2012). Por essa razão, um dos fatores para a escolha de soluções antissépticas é com base em suas propriedades antimicrobianas, capazes de reduzir a carga de microrganismos presentes nos tetos do animal, tanto antes da ordenha (*pré-dipping*), quanto depois (*pós-dipping*).

Geralmente, os produtos mais comumente utilizados são baseados em iodo e peróxido de hidrogênio. No entanto, extratos vegetais têm demonstrado uma boa capacidade de reduzir o número total de microrganismos após a sua aplicação (Lopes et al., 2020a), sugerindo que uma formulação contendo alguns desses compostos pode ter uma boa capacidade de redução bacteriana durante o processo de higiene na ordenha. Ao mesmo tempo, torna-se uma alternativa viável para a indústria de leite orgânico, por ser um produto de origem natural.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de um produto fitoterápico baseado em extratos vegetais de papaína, babosa, andiroba, alecrim, melaleuca e barbatimão no controle do crescimento de microrganismos aeróbios mesófilos totais; fungos e leveduras totais; enterobactérias totais; estafilococos totais e estreptococos totais. Isso abrange a maioria dos agentes microbianos que causam mastite bovina. Além disso, foi realizada a detecção molecular usando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação de *Staphylococcus aureus*. O estudo também avaliou a capacidade de controle microbiológico individual de cada extrato vegetal na formulação, examinando se há um efeito sinérgico entre eles, através de ensaios de

concentração mínima inibitória. Finalmente, realizou-se também a avaliação de conformidade dos produtos de pós-*dipping*, através de pontuação por escore visual para diferentes categorias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção leiteira

O leite é um dos produtos mais consumidos mundialmente, sendo que o Brasil detém a 5ª posição no ranking mundial de produção de leite cru, chegando a produzir 35 bilhões de litros de leite no ano de 2023 (IBGE, 2024). Um dos motivos de seu elevado consumo histórico está em sua composição, por possuir elevadas concentrações de cálcio, proteínas e vitaminas, é frequentemente associado a benefícios para a saúde dos consumidores (Pereira, 2014).

Portanto, a garantia da qualidade do leite é imprescindível para promover a saúde dos animais e também das pessoas que consomem esse produto e seus derivados, que estão espalhados por diversas categorias de alimentos, como queijos, manteigas, iogurtes, cremes, suplementos alimentares, entre outros.

Um dos principais problemas para a produção leiteira é o desenvolvimento de doenças no rebanho, o que gera prejuízos econômicos aos produtores devido ao baixo volume de leite obtido. Outro fator é que essas doenças podem ser de origem infecciosa, significando que animais sadios podem adquirir a doença de animais infectados, um exemplo disso é a mastite bovina, que é considerada a principal doença presente em produções leiteiras em todo o mundo.

2.2 Mastite bovina

A mastite bovina é uma doença caracterizada pela inflamação da glândula mamária, frequentemente associada à redução na produção leiteira e a danos econômicos para os produtores. Sua classificação é geralmente dividida entre

mastite contagiosa e mastite ambiental, dependendo do agente responsável pelo desencadeamento da doença (Bradley, 2002).

É uma doença que existe possivelmente desde os primórdios da ordenha, por volta de 3100 A.C., e ainda é considerada a doença mais frequente e prejudicial em produções leiteiras, apesar de todo o desenvolvimento nos métodos de produção, prevenção e tratamento dos rebanhos (Ruegg, 2017).

Apesar de ser frequentemente associada a infecções bacterianas, a mastite também pode ser causada por fungos, algas, agentes químicos e traumas mecânicos e/ou térmicos (Zhao e Lacasse, 2008), tornando-a assim uma doença de difícil controle e de alta incidência dentro de produções leiteiras.

Por ser uma doença de várias etiologias, cada uma necessitando de um tratamento e diagnóstico específico, a prevenção da doença se torna o melhor caminho a fim de evitar danos econômicos aos produtores e também danos à saúde dos consumidores.

Mesmo possuindo diversas etiologias, a mastite bovina bacteriana é a forma mais comum da doença (Pedersen et al., 2021) e também a mais danosa, pois é frequentemente associada a quadros contagiosos, onde um animal infectado pode transmitir a doença para um animal sadio, desenvolvendo um rápido quadro de surto dentro da produção.

2.2.1 Mastite bovina de origem bacteriana

Dentro da mastite bovina de origem bacteriana, algumas bactérias são frequentemente isoladas em casos de surtos, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, que são comumente ligadas a quadros de mastite contagiosa e responsáveis pela maioria dos casos da doença (Adkins e Middleton, 2018). Porém, surtos causados por *Mycoplasma bovis* têm começado a se tornarem mais frequentes (Gelgie et al., 2024).

Já bactérias da família Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. principalmente, são frequentemente associadas a casos de mastite

bovina ambiental (Gomes e Henriques, 2016), onde os agentes estão presentes no ambiente dos animais, tornando a higienização do local um processo de suma importância para a prevenção da doença.

2.2.2 *Staphylococcus aureus*

A mastite causada por *Staphylococcus aureus* é o tipo mais comum da doença de origem bacteriana, sendo este o agente frequentemente isolado em surtos ao redor do mundo (Campos et al., 2022). Essa bactéria pode produzir uma enterotoxina que é prejudicial para a saúde humana, além de enzimas termoresistentes responsáveis pela indução de diarreias, vômitos e dores abdominais, caracterizando um quadro clínico de intoxicação alimentar estafilocócica, e é o segundo tipo de doença transmitida por alimentos mais frequente em todo o mundo, atrás apenas da salmonelose (Borena et al., 2023).

Outro motivo de preocupação com esse patógeno é sua resistência à antimicrobianos, que são frequentemente aplicados aos rebanhos para tratamento e prevenção de doenças (Beuron et al., 2014). O uso indiscriminado de antibióticos, principalmente como método de prevenção ao invés de tratamento, é um sério problema de saúde pública, capaz de selecionar microrganismos resistentes e dificultar cada vez mais o tratamento de doenças (McEwen & Collignon, 2018).

A bactéria *Staphylococcus aureus* possui resistência aos β -lactâmicos e quinolonas (Wang et al., 2022), fazendo com que o uso desses antibióticos tenha baixa ou nenhuma eficiência em quadros de mastite, porém, dificultando assim também o tratamento de doenças causadas por esse patógeno em casos de infecção em consumidores, fazendo-se necessário o uso de outras classes de antibióticos, que frequentemente possuem seus efeitos colaterais (de Nies et al., 2023).

Contudo, devido ao frequente uso de antibióticos de forma errônea e desnecessária, algumas cepas de *Staphylococcus aureus* presentes no leite estão

desenvolvendo resistência à outras classes de antibióticos que normalmente não deveriam, como tetraciclina e macrolídeos (Ul-Haq et al., 2024).

Por esse motivo, é crucial que o leite consumido possua garantia de qualidade e não esteja contaminado com esse patógeno. A garantia de qualidade microbiológica do leite é uma etapa fundamental para que o produto final esteja livre de patógenos que podem causar quadros de doenças para os consumidores, além de prevenir problemas de saúde para os animais.

2.3 Produtos antissépticos

Um dos meios mais eficientes utilizados para garantir a qualidade do leite é a aplicação de produtos antissépticos nos tetos dos animais durante o processo de ordenha, processo esse conhecido como *teat-dipping*, composto geralmente por dois produtos: *pré-dipping* e *pós-dipping*, que frequentemente são formulados a partir de iodo, ácido láctico e/ou peróxido de hidrogênio (Fitzpatrick et al., 2021), utilizados para prevenir o aparecimento de quadros de mastite bovina.

O problema dessas soluções a base de iodo e outros reagentes é que podem gerar uma contaminação química no leite, aumentando os níveis desses compostos no organismo dos consumidores e tornando-os potencialmente perigosos a longo prazo (Iwarsson e Ekman, 1973).

O iodo, por exemplo, pode trazer sérios riscos à saúde dos consumidores se ingerido em excesso e acumulado no organismo, como a disfunção da glândula tireoide, gerando quadros de hipotireoidismo induzido por excesso de iodo (Leung e Braverman, 2012), sendo que gestantes e crianças são mais vulneráveis às alterações.

Indivíduos com doença renal crônica são considerados um grupo de risco, uma vez que o comprometimento dos rins resulta em uma má excreção da concentração de iodo no organismo, elevando seus níveis e causando uma série de complicações e problemas metabólicos (Sohn et al., 2024).

O peróxido de hidrogênio também é um composto tóxico para a saúde dos consumidores e que é frequentemente utilizado em soluções antissépticas (Nascimento et al., 2017).

Por esses motivos, o uso de produtos de origem química tem sido questionado e substituído por produtos naturais, como por exemplo extratos vegetais, própolis, óleos essenciais, substâncias extraídas de plantas, entre outros, que possam gerar o mesmo efeito antisséptico, porém com pouco ou nenhum efeito colateral para a saúde animal e dos consumidores.

2.4 Produtos naturais

Dentro do âmbito dos produtos naturais, um grupo vem ganhando destaque recentemente: os fitoterápicos, que são produtos que possuem como compostos ativos em sua formulação componentes extraídos de plantas, que muitas vezes possuem efeitos semelhantes e em alguns casos até melhores do que seus concorrentes químicos e sintéticos.

Dentro da mastite bovina isso não é diferente, estudos comprovam a eficácia de produtos à base de extratos vegetais no controle da doença, sendo utilizados em formulações de soluções higienizadoras da pele do teto dos animais durante o processo de ordenha (Aiemsaard et al., 2023).

Os fitoterápicos também têm demonstrado grande eficácia no tratamento dos animais após o desenvolvimento da doença, sendo capazes interagir sinergicamente com antibióticos, aumentando seu efeito antimicrobiano e reduzindo sua concentração mínima inibitória em até oito vezes (El-Sayed e Kamel, 2021).

Esses componentes naturais por si só também podem possuir efeitos antimicrobianos e serem utilizados no lugar de antibióticos, como é o caso do extrato de chebula (*Terminalia chebula*), que demonstrou efeito antimicrobiano de largo-espectro contra agentes isolados de amostras de leite de vacas acometidas

com mastite bovina, tendo efeito semelhante ao antibiótico amoxicilina (Lopes et al., 2020b).

Os mecanismos de ação desses produtos naturais ainda não são totalmente compreendidos ou conhecidos, mas acredita-se que grande parte de seu efeito antimicrobiano se deve à capacidade de causar danos na parede celular bacteriana, causando lise celular e, conseqüentemente, morte do microrganismo, sendo bactérias Gram-positivas especialmente suscetíveis a esses produtos, principalmente por possuírem em sua morfologia uma camada mais fina de lipopolissacarídeo, tornando-as mais vulneráveis (Touza-Otero et al., 2024).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e Processamento das amostras

As coletas e análises foram conduzidas no primeiro semestre de 2022. Foram utilizadas vacas leiteiras, alocadas em duas fazendas leiteiras na cidade de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Os animais foram divididos em dois grupos: controle e tratamento. No grupo de tratamento, utilizou-se o produto a base de extratos vegetais, enquanto no grupo de controle, foi utilizada uma solução de iodo com peróxido de hidrogênio. Essa solução foi escolhida por ser a mais comumente usada para esse fim, uma vez que o presente estudo visa avaliar a não inferioridade do produto natural. Os produtos avaliados foram então alocados em dois grupos: grupo tratamento, contendo os produtos 1 (*pós-dipping* natural) e 2 (*pré-dipping* natural) e grupo controle, contendo os produtos 3 (*pós-dipping* de iodo) e 4 (*pré-dipping* de peróxido de hidrogênio).

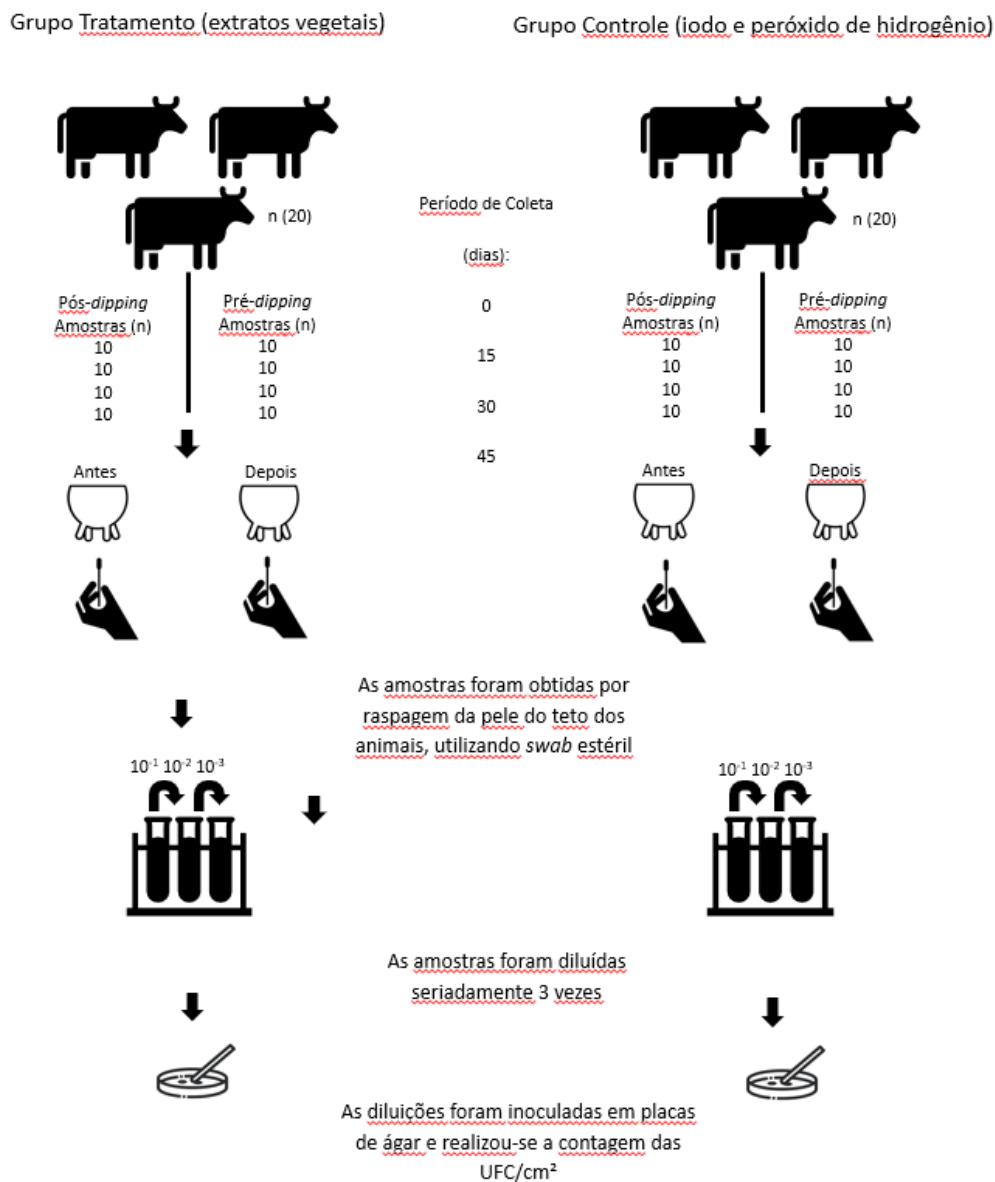
Foram realizadas oito coletas (quatro em cada fazenda) com um intervalo de 15 dias entre elas. A escolha dos animais se deu de forma aleatória, sendo que os únicos quesitos eram: os animais deviam estar em pico de lactação, saudáveis e sem uso de antibiótico. Em cada coleta, foram utilizados 20 animais (10 em cada

grupo), os quais permaneceram constantes ao longo do experimento. Amostras foram coletadas antes e depois da aplicação do produto antisséptico em cada animal. Assim, em cada coleta, foram obtidas 40 amostras, totalizando 320 amostras ao final do experimento. A primeira coleta ocorreu antes da aplicação de qualquer solução antisséptica ou lavagem com água, visando avaliar a concentração original presente na pele dos tetos dos animais apenas com a aplicação do pós-*dipping* do dia anterior, já a segunda coleta ocorreu 30 segundos após a aplicação do pré-*dipping*, sendo essa janela de tempo um período ideal para a boa atuação do produto (Kennedy et al., 2020), visando assim, avaliar a redução na concentração microbiana comparada à primeira coleta.

A coleta foi realizada por fricção da pele do teto dos animais com um *swab* estéril em uma área preestabelecida equivalente a 10 cm². Os *swabs* foram então armazenados em tubos de ensaio contendo peptona bacteriológica a 0,1%, os quais foram colocados em caixas hermeticamente fechadas e refrigeradas. Posteriormente, foram enviados ao Laboratório de Biotecnologia e Resistência Bacteriana do Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única da

UNESP/FCAV para análise microbiológica. Um esquema ilustrando o procedimento da coleta das amostras está representado na Figura 1.

Figura 1: esquema ilustrado da coleta e processamento das amostras durante o experimento



A quantificação de microrganismos foi realizada contando unidades formadoras de colônia (UFC) por centímetro quadrado, seguindo a técnica de

plaqueamento de superfície. Diluições seriadas das amostras foram feitas na proporção de 1:10 até 10^{-3} em caldo de peptona bacteriológica a 0,1%. Para essa diluição, 0,5mL da peptona bacteriológica a 0,1%, contendo a amostra previamente diluída da coleta, foi transferido para um tubo contendo 4,5mL de peptona de mesma concentração. Após homogeneização, 0,5mL da peptona com a amostra recém-diluída foi transferido para um novo tubo com 4,5mL de peptona estéril, completando as três diluições.

Após homogeneização de todas as diluições, alíquotas de 0,1mL de cada diluição foram transferidas para placas de petri contendo ágar MacConkey, ágar sal-manitol, ágar sangue-azida, ágar nutriente e ágar batata-dextrose para o crescimento de enterobactérias, estafilococos, estreptococos, aeróbios mesófilos totais e leveduras totais, respectivamente.

As alíquotas foram uniformemente espalhadas na superfície dos meios de cultura usando espalhador de células, e os meios foram incubados em uma incubadora bacteriológica a 37°C por até 48 horas. Após a incubação, unidades formadoras de colônia (UFC) por centímetro quadrado foram contadas para as amostras antes da aplicação do produto (*pré-dipping*) e após a aplicação (*pós-dipping*) para avaliar a redução na concentração microbiana.

3.2 Análise estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância, utilizando teste de não inferioridade, em delineamento em parcelas subdivididas, com dois tratamentos (iodo-peróxido de hidrogênio e extratos vegetais) e quatro períodos de avaliação. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SAS, versão 1.1.0.714, e do programa Agro-Estat, versão 1.1.0.714 (2024).

Os dados obtidos das contagens microbianas foram transformados utilizando a função logarítmica $\text{Log}(x + 1)$ e analisadas estatisticamente em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×4 (dois tratamentos e quatro tempos de avaliação). As comparações entre os tratamentos

foram realizadas por meio do procedimento de modelo linear geral (GLM), e as diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

3.3 Análise molecular de *S. aureus*

Para a análise molecular, a extração do material genético bacteriano foi realizada usando a técnica de clorofórmio-álcool isoamílico, seguindo o protocolo de Eurya Kuramae-Izioka (1997), com as modificações descritas a seguir: 750µL de cultura bacteriana foram transferidos para um microtubo de 2mL e centrifugados a 13.400 rpm a 10°C por 2 minutos. Em seguida, o *pellet* foi suspenso em 700µL de tampão de extração composto por Tris-HCl 160mM pH8.0, EDTA 50mM pH8.0, NaCl 20mM e SDS 0,5% (p/v). A suspensão foi homogeneizada e incubada em uma incubadora a 65°C por 40 minutos. Após a incubação, 300µL de acetato de potássio 5M foram adicionados, homogeneizados e incubados a -20°C por 30 minutos.

Após a incubação, 650µL de uma solução contendo clorofórmio e álcool isoamílico (24:1 v/v) foram adicionados ao tubo, e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 13.400 rpm e 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 1mL de etanol absoluto foi adicionado. Os tubos foram homogeneizados novamente e armazenados a -20°C por 18 horas. A etapa final de extração envolveu a centrifugação dos tubos a 13.400 rpm e 10°C por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o sedimento foi permitido secar à temperatura ambiente por 30 minutos, seguido pela ressuspensão em 20µL de tampão T.E. contendo Tris-HCl 10mM pH8.0 e EDTA 1mM pH8.0.

A seleção de amostras para a identificação de *S. aureus* foi realizada por meio de avaliação bioquímica proporcionada pelo meio de cultura utilizado na etapa de quantificação. Colônias de coloração amarelada e com mudança na cor do meio (indicando fermentação do açúcar manitol) em ágar sal-manitol foram

consideradas sugestivas de *S. aureus*, essas colônias foram então isoladas e submetidas ao teste da catalase. Amostras catalase positivas foram separadas para a análise de identificação molecular, conforme demonstrado na Figura 2.

Figura 2: foto da placa de ágar sal-manitol demonstrando fermentação do açúcar manitol (setas indicando coloração amarela), sugerindo crescimento de colônias de *S. aureus*.



Fonte: autoria própria

A identificação de *S. aureus* foi realizada utilizando o *primer* específico *cydB-aureus*. A sequência de nucleotídeos do *primer cydB-aureus* é a seguinte: *Forward* (F): CCCATTGCTTGGTCTGTAGTA e *Reverse* (R): GTCCAGCCCATTCTGGATTA. Este conjunto de *primers* apresenta um produto de PCR com 432pb de comprimento.

A preparação da reação foi conduzida utilizando reagentes da empresa Cellco Brasil, seguindo as instruções do fornecedor. O PCR Master Mix foi preparado com as seguintes concentrações finais: *Buffer* de Reação (10X) 1X; dNTP (10mM) 200 μ M; Taq DNA Polimerase (5U/ μ L) 1,5U; *Primers* (10 μ M) 0,5 μ M, e água ultrapura para completar o volume até 25 μ L por reação.

A mistura de reação foi então homogeneizada usando uma mini centrífuga e distribuída em tubos moleculares. Posteriormente, o DNA bacteriano de cada amostra a ser analisada foi adicionado, resultando em uma concentração final de DNA de 1ng para cada reação.

As amostras foram então submetidas ao termociclador seguindo a seguinte configuração de ciclos para o *primer* específico utilizado: o primeiro ciclo a 95°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto na fase de desnaturação, anelamento a 57,5°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. O ciclo final foi a 72°C por 7 minutos.

Após a reação de PCR, 5 μ L de corante molecular SYBR Green foram adicionados às amostras e, em seguida, elas foram transferidas para um gel de agarose a 1,5% para eletroforese. Após a corrida de eletroforese, a interpretação dos resultados foi realizada visualizando o gel sob luz ultravioleta usando fotodocumentador.

3.4 Análise de CIM e CBM

Para o ensaio de concentração inibitória mínima (CIM), foram utilizados extratos brutos das soluções pré e pós-*dipping*, bem como cada extrato individual que compõe a formulação. A avaliação foi realizada conforme o protocolo de Wiegand et al. (2008) com as seguintes modificações: após a semeadura em ágar Müller-Hinton, uma suspensão em solução salina a 0,85% foi preparada para cada cepa bacteriana e padronizadas para concentração específica, em espectrofotômetro com OD600, equivalente a 0,5 na escala McFarland. Um teste

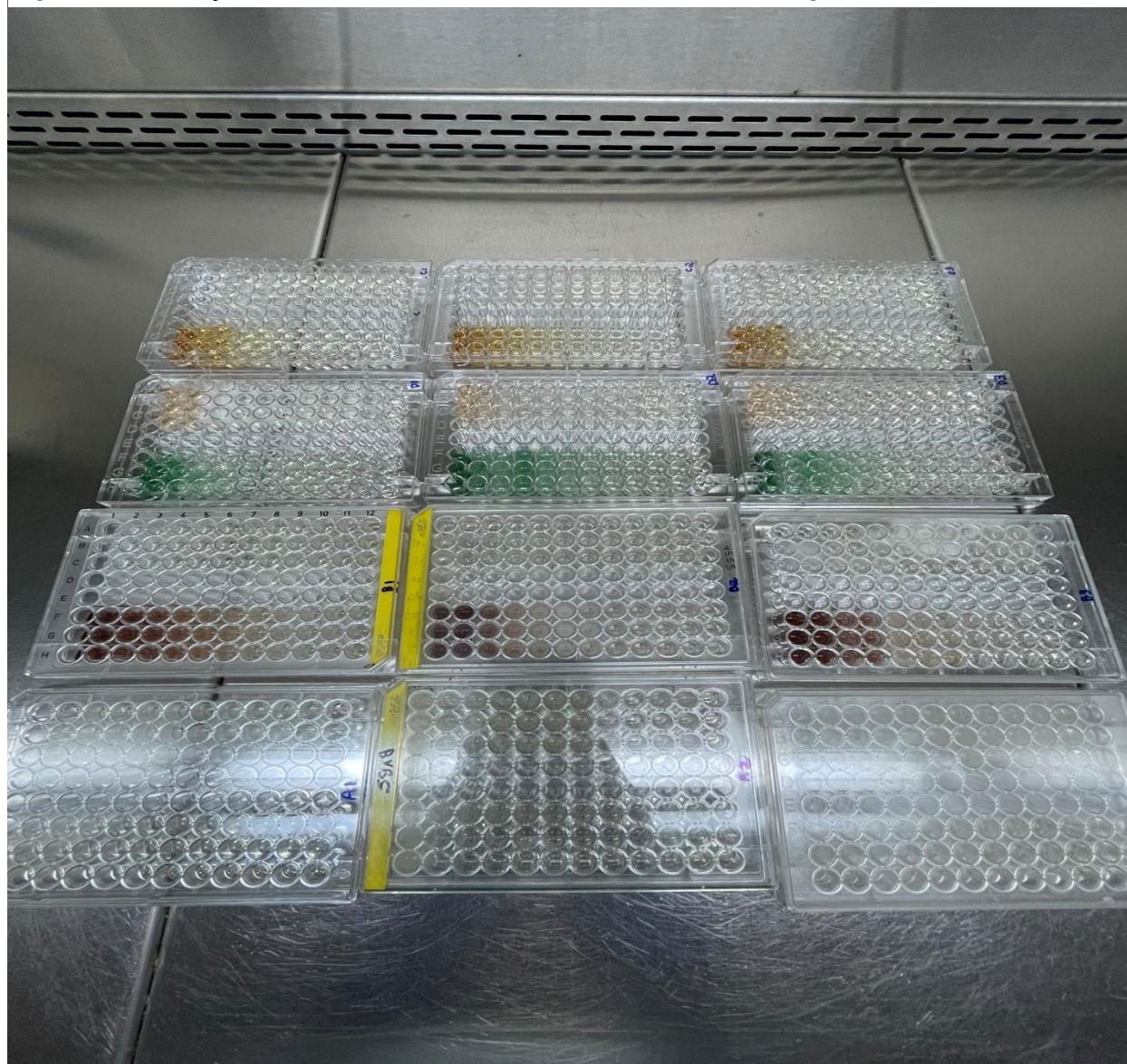
piloto foi realizado para confirmar a concentração bacteriana de cada cepa (UFC/mL) em diluições seriadas na proporção de 1:9 e contagem em superfície.

Posteriormente, a concentração do inóculo de cada microrganismo foi ajustada para 10^5 UFC/mL em caldo Müller-Hinton e as amostras inoculadas em microplaca de 96 poços contendo 150µl de uma diluição na proporção 1:2 de cada um dos extratos vegetais avaliados. O ensaio foi conduzido em triplicata para cada cepa bacteriana. Os resultados foram expressos em porcentagem e considerando que não há pontos de corte clínicos específicos para os produtos à base de extratos vegetais, quando houve a ausência de turbidez contra as espécies bacterianas em questão, a diluição foi considerada “sensível”, e a presença de turbidez como “resistente”.

Os produtos foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir inóculos de 10^5 UFC/mL de cepas padrão adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC) das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813). Inóculos bacterianos foram preparados suspendendo colônias em solução salina estéril a 0,85% e ajustando por espectrofotometria para uma concentração equivalente a uma escala de MacFarland de 0,5, correspondendo a 10^8 UFC/mL, e então diluídos para a concentração final de 10^5 UFC/mL.

Os extratos brutos de *Aloe vera* (babosa) - AV, *Carapa guianensis* (andiroba) - AR, *Carica papaya* (mamão) - MM, *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) - BT, *Melaleuca alternifolia* (melaleuca) - ML, *Salvia rosmarinus* (alecrim) – AL, bem como os produtos *pré-dipping* (PRE) e *pós-dipping* (POS), foram inoculados em placas de cultura celular de 96 poços em um volume de 300µL, onde 150µL foram transferidos em série para os poços seguintes contendo 150µL de caldo Müller-Hinton estéril, resultando em uma diluição de 1:2 até o poço número 10. Os dois últimos poços, 11 e 12, eram compostos pelo controle negativo (apenas caldo nutritivo) e controle positivo (caldo nutritivo e a cepa bacteriana avaliada), respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (Figura 3).

Figura 3: ilustração das análises de CIM utilizando extratos vegetais.



Fonte: autoria própria

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi feita após observar as diluições realizadas, identificando a maior diluição capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano no poço avaliado. Esta diluição foi então plaqueada em placas de ágar Müller-Hinton, juntamente com as diluições anteriores, para verificar a concentração bactericida mínima (CBM), caracterizada

pela menor concentração do composto avaliado capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano.

3.5 Análise Visual de Conformidade

A avaliação de conformidade foi realizada exclusivamente nos produtos pós-*dipping* (Produto 1 e Produto 2), simultaneamente à coleta das amostras mencionadas anteriormente, com o objetivo de comparar a formulação à base de extratos vegetais ao produto controle à base de iodo. Essa avaliação macroscópica *in vivo* foi conduzida imediatamente após a ordenha. A metodologia analítica foi baseada em estudo anterior (Kybartas et al., 2023).

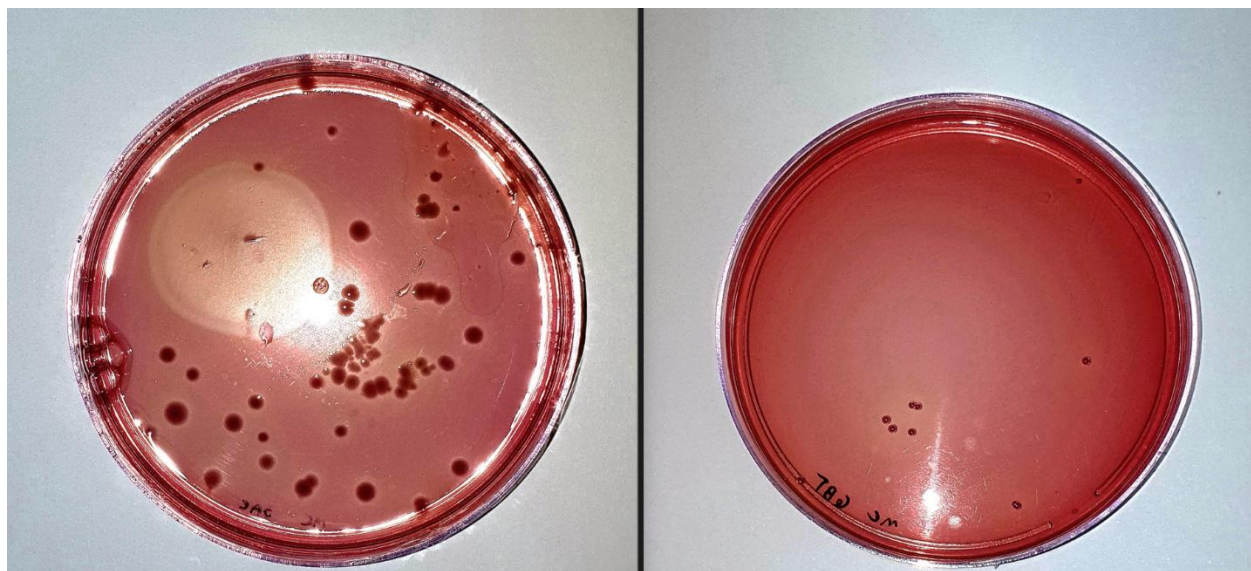
Foi utilizado um sistema de pontuação com escala de 5 pontos para avaliação das principais características, sendo 1 a pontuação menos desejável e 5 a mais desejável. Os parâmetros avaliados incluíram: cor, escorrimento imediatamente após a aplicação, formação de gota na extremidade do teto, cobertura do teto por uma película e uniformidade da cobertura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação microbiana

Com relação à quantificação microbiana, foi observado que ambos os produtos foram capazes de reduzir de forma semelhante a concentração microbiana durante todo o período avaliado, como demonstrado na Figura 4, comprovando assim a semelhança da eficiência do produto a base extratos vegetais, com o produto químico. A redução total dos microrganismos para ambos os sanitizantes avaliados ficou acima de 80%, sendo que o produto natural foi capaz ainda de superar o produto convencional quanto à redução de patógenos dos gêneros *Staphylococcus* e grupo das Enterobactérias de forma mais significativa.

Figura 4: foto de uma placa de ágar MacConkey, indicando a concentração bacteriana antes (esquerda) e após (direita) a aplicação do produto antisséptico natural.



Fonte: autoria própria

Os resultados referentes à média da população microbiana para cada coleta, propriedade e produto estão representados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: média da população microbiana em cada grupo e período de coleta.

Período de coleta	Grupo Tratamento (UFC/cm ²)				
	Produtos	Enterobacteriaceae	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	Mesófilos Totais
T0	Produto 1	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²
	Produto 2	10 ²	10 ¹	10 ²	10 ³
T15	Produto 1	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²
	Produto 2	10 ¹	10 ²	10 ¹	10 ³
T30	Produto 1	10 ¹	10 ²	10 ¹	10 ²
	Produto 2	10 ²	10 ³	10 ²	10 ⁴
T45	Produto 1	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ³
	Produto 2	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ³

Grupo Controle (UFC/cm²)						
Período de coleta	Produtos	Enterobacteriaceae	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	Mesófilos Totais	Leveduras Totais
T0	Produto 3	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ²
	Produto 4	10 ²	10 ²	10 ¹	10 ²	10 ³
T15	Produto 3	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ²
	Produto 4	10 ¹	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ³
T30	Produto 3	10 ²	10 ²	10 ²	10 ³	10 ²
	Produto 4	10 ⁴	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	10 ⁴
T45	Produto 3	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ²
	Produto 4	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³

Produto 1: pré-dipping natural
 Produto 2: pós-dipping natural
 Produto 3: pré-dipping controle
 Produto 4: pós-dipping controle

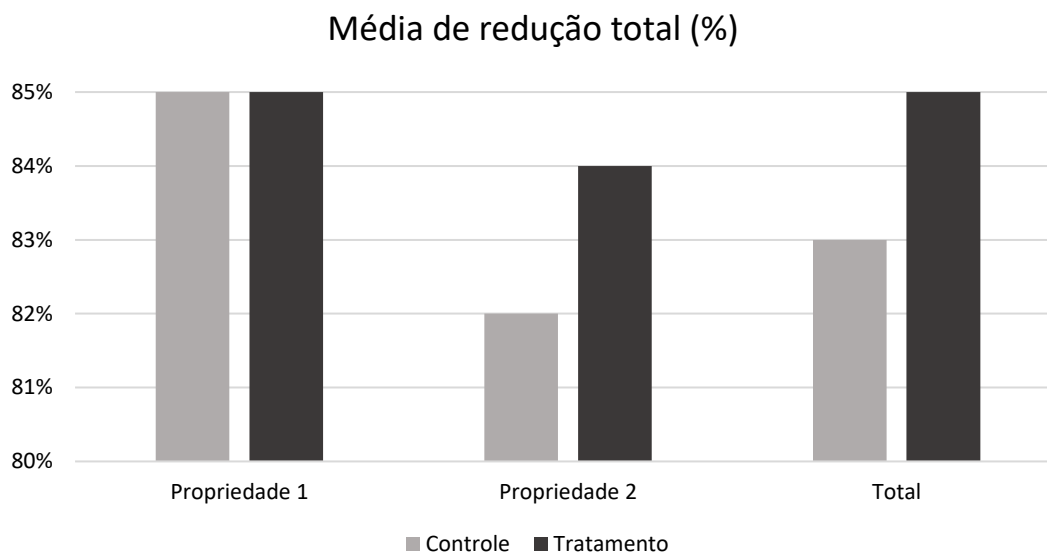
Adicionalmente, a Tabela 2 apresenta os resultados relacionados à diferença na concentração microbiana entre a primeira e a última coleta em cada propriedade analisada, assim como cada grupo microbiano, expressando os resultados em termos de UFC/cm². De acordo com essa tabela, é perceptível que concentração média da população microbiana foi reduzida de forma semelhante. Isso mais uma vez indica a semelhança entre ambos os produtos em sua capacidade antisséptica.

Tabela 2: concentração da população microbiana em ambas as fazendas, comparativo entre a primeira e a última coleta

Comparação das médias das populações microbianas (UFC/cm ²) entre a primeira e última coleta de cada propriedade						
Coleta e Propriedade		Enterobacteriaceae	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	Mesófilos Totais	Leveduras Totais
Coleta Nº 2	Propriedade Nº 1	10 ¹ UFC/cm ²	10 ² UFC/cm ²	10 ¹ UFC/cm ²	10 ⁴ UFC/cm ²	10 ⁴ UFC/cm ²
Controle	Propriedade Nº 2	10 ² UFC/cm ²	10 ² UFC/cm ²	10 ² UFC/cm ²	10 ⁴ UFC/cm ²	10 ³ UFC/cm ²
Coleta Nº 4	Propriedade Nº 1	10 ² UFC/cm ²	10 ² UFC/cm ²	10 ³ UFC/cm ²	10 ³ UFC/cm ²	10 ³ UFC/cm ²
Controle	Propriedade Nº 2	10 ³ UFC/cm ²	10 ³ UFC/cm ²	10 ² UFC/cm ²	10 ⁴ UFC/cm ²	10 ⁴ UFC/cm ²
Coleta e Propriedade		Enterobacteriaceae	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	Mesófilos Totais	Leveduras Totais
Coleta Nº 2	Propriedade Nº 1	10 ¹ UFC/cm ²	10 ² UFC/cm ²	10 ¹ UFC/cm ²	10 ⁴ UFC/cm ²	10 ⁴ UFC/cm ²
Tratamento	Propriedade Nº 2	10 ² UFC/cm ²	10 ⁴ UFC/cm ²	10 ³ UFC/cm ²	10 ⁴ UFC/cm ²	10 ⁴ UFC/cm ²
Coleta Nº 4	Propriedade Nº 1	10 ¹ UFC/cm ²	10 ² UFC/cm ²	10 ³ UFC/cm ²	10 ³ UFC/cm ²	10 ³ UFC/cm ²
Tratamento	Propriedade Nº 2	10 ³ UFC/cm ²	10 ⁴ UFC/cm ²	10 ³ UFC/cm ²	10 ⁴ UFC/cm ²	10 ⁴ UFC/cm ²

A média da redução percentual total para todos os grupos de microrganismos avaliados durante todas as coletas está apresentada no Gráfico 1, destacando a porcentagem de redução total de ambos os produtos em cada fazenda, bem como a média total combinada. É evidente que todas as médias, tanto entre propriedades quanto total, foram similares para os dois produtos antissépticos testados, sendo o produto natural um pouco superior no geral.

Gráfico 1: média de redução total (%) de ambos os grupos de produtos



Pode-se observar uma redução total significativa na concentração microbiana com o produto natural, às vezes superando o produto controle. No geral, ele se apresenta de maneira equivalente em relação à redução total de microrganismos presentes na pele dos tetos dos animais. Além disso, é perceptível uma maior capacidade média de redução total de *Staphylococcus* spp. para o grupo tratamento em comparação com o grupo controle. Esse achado complementa um estudo conduzido por Pasca et al. (2020), onde os autores também avaliaram um produto natural à base de extratos vegetais e observaram uma maior eficácia na redução da concentração de agentes bacterianos Gram-positivos.

Uma explicação para os resultados neste estudo poderia ser um possível desenvolvimento de resistência ao iodo, o principal composto na formulação do produto controle utilizado. Isso é apoiado por um estudo conduzido por Brown et al. (1995), onde os autores observaram alguma resistência ao iodo-povidona em biofilmes formados por *Pseudomonas aeruginosa*. Da mesma forma, outros

estudos avaliaram a eficácia de óleos essenciais para o controle da mastite bovina (Caneschi et al., 2023), observando também uma maior atividade antimicrobiana de produtos naturais contra agentes Gram-positivos.

Em relação ao grupo *Streptococcus* spp., o resultado foi novamente favorável para o produto natural, mas apenas marginalmente, indicando eficiência muito semelhante de ambos os produtos na redução total desse grupo bacteriano. Esse padrão também se manteve para os dois últimos grupos avaliados, aeróbios mesófilos totais e leveduras totais. No entanto, em nenhum dos casos, a redução foi superior a 97%, como em outros grupos durante o período analisado. Uma possível explicação para esse achado é a formação de biofilmes por diferentes gêneros bacterianos no grupo de mesófilos. Esses biofilmes podem ter levado a uma maior tolerância aos antissépticos testados. Outros estudos têm observado a interação de produtos naturais com biofilmes, como o uso de extrato de romã e sumagre para combater biofilmes formados por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Nostro et al., 2016).

É notável uma redução percentual menor nas populações de mesófilos aeróbios totais e leveduras totais, o que pode ter contribuído para a concentração desses microrganismos permanecer relativamente alta mesmo após a aplicação dos produtos, quando comparada à concentração dos outros grupos avaliados. A formação de biofilmes é um fator crucial na geração de resistência a agentes antimicrobianos. Apesar disso, o uso de produtos naturais tem se mostrado eficaz em auxiliar e reduzir a formação de biofilmes. Isso é demonstrado por Elgamoudi e Korolik (2021), onde extratos vegetais, óleos essenciais, peptídeos e outros compostos foram eficientes em interferir na produção de biofilme por *Campylobacter jejuni* em animais. Além disso, extratos de copaíba e melaleuca também têm demonstrado bom efeito antifúngico (Deus et al., 2011; Roana et al., 2021), reforçando assim a capacidade de redução deste grupo de microrganismos com o produto avaliado.

O uso de extratos vegetais tem ganhado destaque devido a muitas plantas conterem fitoquímicos com atividades antimicrobianas, especialmente compostos

das classes de polifenóis e flavonoides (Cheng & Han, 2020). Um estudo de Sakarikou et al. (2020) demonstrou que o uso de extrato da planta nogueira-japonesa tem sido eficiente no controle da formação de biofilmes por *Salmonella* spp.

Da mesma forma, o uso de óleos essenciais de manjerona, tomilho, alecrim, zimbro e gengibre foi avaliado por sua capacidade de inibir a formação de biofilmes por *Escherichia coli* isolada de pacientes com infecção do trato urinário (ITU), resultando em reduções de até 85% na formação de biofilme pelas cepas avaliadas (Lagha et al., 2019).

A combinação de agentes naturais com antibióticos tem sido empregada no tratamento da mastite bovina, mostrando-se um método de tratamento eficaz, onde em alguns casos pode-se observar uma redução na concentração de antibióticos necessária para a atividade antimicrobiana quando combinada com produtos naturais. Isso é exemplificado em um estudo de Buldain et al. (2018), onde foi observada uma redução na concentração do antibiótico cloxacilina para a inibição de *Staphylococcus aureus* na presença de óleo essencial de melaleuca.

Outros estudos também apoiam descobertas semelhantes, como visto no estudo conduzido por Song et al. (2021), onde os autores testaram 85 flavonoides de 271 plantas medicinais e descobriram que mais de 40% deles exibiram atividade antimicrobiana contra bactérias multirresistentes, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE). Além disso, 35% dos compostos avaliados foram capazes de restaurar a suscetibilidade de *Escherichia coli* à colistina. Flavonoides extraídos de musgo de carvalho, absinto e lavanda mostraram alta capacidade antimicrobiana, com efeitos semelhantes aos de florfenicol e enrofloxacin (Pasca et al., 2017).

4.2 Análise molecular de *S. aureus*

Com relação à identificação molecular de *S. aureus*, todas as amostras avaliadas foram negativas para a identificação por PCR desse agente, utilizando o *primer cydB-aureus*. A ausência do agente indica que os animais estavam saudáveis e que há um manejo adequado nas fazendas estudadas, não ocorrendo contaminação dos animais pelas mãos dos ordenhadores. Além disso, a ausência de *S. aureus* mesmo após isolamento de amostras sugestivas pode ser explicado pela limitação dos testes bioquímicos, onde outras bactérias também podem possuir a enzima manitol-desidrogenase.

4.3 Análise de CIM e CBM

A determinação da CIM e CBM evidenciaram que dentre os extratos vegetais que compõem o sanitizante natural, os extratos de melaleuca, andiroba e alecrim obtiveram os melhores valores quanto à inibição do crescimento microbiano para as três cepas controle avaliadas, como indicado na Tabela 3.

Além disso, a interação de todos os extratos, compostos no *pré-dipping*, obteve a melhor eficiência, obtendo valores de CIM de apenas 0,1% de sua concentração, indicando uma forte interação entre todos os extratos presentes na formulação, com alta capacidade de redução dos microrganismos avaliados.

Observa-se ainda, que a cepa de *Staphylococcus aureus* apresentou maior resistência aos extratos de andiroba (AR): CIM 25% CBM 100%>; melaleuca (ML): CIM 12,50% CBM 25% e alecrim (AL) CIM 25% CBM 100%, entretanto, foi a cepa mais sensível ao extrato de barbatimão (BT) dentre as três cepas avaliadas, obtendo valores de CIM de CBM de 12,50%.

Em contrapartida, a cepa de *Escherichia coli* apresentou o maior valor de CBM para o produto *pré-dipping*, que é composto por todos os extratos vegetais, obtendo um valor de CBM de 0,30%, que foi 3 vezes maior do que o apresentado pelas duas outras cepas avaliadas.

Os resultados mostraram que o ponto principal para a eficiência dos produtos de *pré-dipping* e *pós-dipping* é a interação entre todos os extratos em sua formulação. Em particular, o produto de *pré-dipping* inibiu visivelmente o crescimento bacteriano a 0,10% da concentração original, mesmo na última diluição avaliada. Ele também foi capaz de inibir completamente o crescimento microbiano em concentrações muito baixas.

Tabela 3: resultados da concentração inibitória mínima para cada produto avaliado

<i>Staphylococcus aureus</i>		
Amostra	CIM	CBM
AV	100%	ND
AR	25%	ND
MM	50%	ND
BT	12.50%	12.50%
ML	12.50%	25%
AL	25%	100%
PRE	0.10%	0.10%
POS	0.70%	0.70%
<i>Streptococcus agalactiae</i>		
Amostra	CIM	CBM
AV	100%	ND
AR	3.10%	100%
MM	50%	100%
BT	25%	25%
ML	0.30%	0.70%
AL	6.20%	6.20%
PRE	0.10%	0.10%
POS	50%	100%
<i>Escherichia coli</i>		
Amostra	CIM	CBM
AV	100%	ND
AR	6.20%	ND
MM	50%	100%
BT	50%	50%
ML	1.50%	6.20%
AL	6.20%	25%
PRE	0.10%	0.30%
POS	12.50%	100%

Diluição proporção 1:2

AV = *Aloe vera*

AR = *Carapa guianensis*

MM = *Carica papaya*

BT = *Stryphnodendron adstringens*

ML = *Melaleuca alternifolia*

AL = *Salvia rosmarinus*

PRE = Solução pré-dipping

POS = Solução pós-dipping

ND = Não detectado, o valor de MBC não foi detectado nas concentrações utilizadas (até 100%)

Isso pode ser explicado por uma possível interação sinérgica entre os compostos presentes na formulação. Quando combinados, eles podem ter um efeito antimicrobiano maior do que quando aplicados individualmente. Isso é evidente nos valores de CIM e CBM dos extratos isolados obtidos neste estudo. Todos os extratos mostraram variações significativas nos valores de CIM e CBM entre as cepas avaliadas, e na maioria dos casos, os valores permaneceram em concentrações muito altas, tornando-os significativamente menos eficientes quando aplicados separadamente. Isso é destacado ao compará-los com o produto de *pré-dipping*, que contém os extratos testados nas seguintes concentrações: babosa 2,5%, andiroba 2,5%, alecrim 15%, barbatimão 2%, mamão 3,2% e melaleuca 5%.

Com base nos resultados deste estudo, é evidente que os extratos de melaleuca e alecrim têm uma CIM menor do que a concentração desses extratos no produto de *pré-dipping*. Isso pode ser a principal razão para a alta eficácia na redução da concentração microbiana total. No entanto, não se pode descartar o possível efeito sinérgico desses compostos e outros na formulação. Uma exceção pode ser observada para a cepa de *S. aureus*, onde a CIM e CBM de melaleuca foram superiores do que as presentes no produto composto por todos os extratos. No entanto, semelhante a outras cepas, o produto de *pré-dipping* foi muito eficaz na redução de estafilococos, como visto nos resultados da contagem bacteriana.

Além disso, existem valores altamente discrepantes entre CIM e CBM para todos os extratos, exceto para o extrato de barbatimão (BT), que manteve valores consistentes para ambas as análises em todas as bactérias testadas na mesma concentração. Outro ponto a ser observado é a incapacidade do extrato de babosa (AV) de inibir isoladamente qualquer crescimento microbiano. Isso está alinhado com os resultados esperados, uma vez que o extrato de babosa foi adicionado à formulação do produto antisséptico natural por sua ação repelente, larvicida e hidratante (Subramaniam et al., 2012), e não por propriedades antimicrobianas.

4.4 Análise estatística

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as formulações, indicando que ambos os tratamentos foram igualmente eficazes na redução das concentrações microbianas em todas as coletas e grupos microbianos analisados, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4: resultado estatístico do teste f, revelando diferença não significativa entre ambos os produtos

Análise estatística teste f					
Resultado geral de todas as coletas					
Grupo Microbiano	Grupo	Resultado	Grupo	Resultado	Significância
Enterobacteriaceae	Controle	0.26	Tratamento	1.7	Não significativo
<i>Staphylococcus</i> spp.	Controle	1.02	Tratamento	0.94	Não significativo
<i>Streptococcus</i> spp.	Controle	3.94	Tratamento	2.42	Não significativo
Mesófilos Totais	Controle	1.34	Tratamento	0.64	Não significativo
Leveduras Totais	Controle	9.28	Tratamento	7.96	Não significativo

Os resultados apresentados confirmam que tanto os produtos à base de extrato vegetal quanto os produtos controle demonstraram eficácia antisséptica equivalente na redução de todos os agentes microbianos avaliados neste estudo, indicando ausência de significância estatística entre eles. Além disso, o produto natural, além de ter efeitos antissépticos comparáveis ao controle, seria economicamente mais viável, tornando-se uma alternativa futura potencial para os produtores de laticínios.

4.5 Análise Visual de Conformidade

Nos produtos testados, observou-se que a coloração se apresenta intensa imediatamente após a aplicação no teto, mantendo-se bem definida por até 10 minutos, com perda gradual de intensidade ao longo de 60 minutos. Após 12 horas,

o produto à base de extratos vegetais apresenta coloração residual mais visível em comparação ao produto à base de iodo.

Para ambos os produtos, verificou-se a formação de uma única gota estável imediatamente após a aplicação, sendo que a formação da gota foi mais lenta no produto à base de extratos vegetais. Ambos os produtos apresentaram cobertura uniforme do teto, com formação de uma película sobre a pele do teto; entretanto, essa cobertura foi mais evidente no Produto natural (Figura 5).

De acordo com a metodologia utilizada, o escore atribuído ao produto à base de extratos vegetais foi superior ao do produto controle, comumente utilizado em propriedades rurais. Vale destacar que, do ponto de vista macroscópico, durante todo o período de amostragem, observou-se ausência de moscas e melhoria nas fissuras e rachaduras dos tetos, bem como nas condições de coloração e ressecamento dos tetos imersos no produto à base de extratos vegetais.

Figura 5: foto dos produtos pós-dipping aplicados aos animais, a fim de realizar a avaliação visual de conformidade



5. CONCLUSÃO

Apesar de várias flutuações na redução dos grupos microbianos avaliados, a média final de redução total permaneceu a mesma para ambos os produtos avaliados. A média foi consistente entre cada propriedade e, consequentemente, permaneceu igual na média geral.

Dado que o produto é composto por extratos naturais, há também o fator ambiental, sazonal e o método de extração, que podem influenciar nos resultados, como mostrado em um experimento conduzido por Dragana Jakovljević et al. (2013). Os autores observaram uma diferença significativa em vários compostos presentes na planta celidônia (*Chelidonium majus*) dependendo da fase de desenvolvimento da planta, assim como fatores sazonais e o método de extração utilizado.

Da mesma forma, outro estudo conduzido por Paiva et al. (2018), também encontrou diferenças nos compostos da alga *Fucus spiralis* em duas ilhas diferentes nos Açores, Portugal. Isso indica que pode haver interferência em termos de compostos e, consequentemente, na capacidade antimicrobiana de diferentes extratos naturais, dependendo de como são extraídos, em qual fase de desenvolvimento e época do ano. No entanto, em geral, a alta taxa de redução microbiana observada neste estudo garante a eficácia do composto natural usado ao longo de todos os meses em que as análises foram conduzidas.

Esse resultado ainda assegura a semelhança do produto natural com o iodo em sua capacidade de reduzir grupos de microrganismos mais frequentemente associados a casos de mastite bovina, auxiliando na prevenção da doença e, assim, garantindo uma produção mais elevada.

Além disso, destaca-se a facilidade da utilização, não havendo a necessidade de adaptação nem treinamento diferenciado para a equipe responsável pela ordenha, visto que o protocolo de aplicação é o mesmo do produto comumente utilizado, o que facilita a sua adoção por fazendas leiteiras.

Outro ponto importante é a contribuição para o uso responsável dos antibióticos, visto que ao diminuir a incidência de casos de mastite bovina no rebanho, diminui-se também o uso de antibióticos, alinhando-se às tendências de produção sustentável, exigências de mercados internacionais e saúde pública.

Entretanto, vale reforçar que mais estudos precisam ser realizados para assegurar a segurança de produtos naturais para uso *in vivo*, questões como análise de citotoxicidade, reações, estabilidade, entre outros. Além disso, nota-se que é necessário o estabelecimento de métodos de padronização para soluções naturais, visto sua alta complexidade e número de variáveis, métodos como a escolha de matéria prima comum, protocolo de extração, entre outras.

O controle da mastite bovina depende principalmente da prevenção da doença em vez do tratamento após seu início. O uso de antibióticos é o método mais comumente empregado, e embora eficaz como tratamento, não deve ser usado como medida preventiva. Além disso, não há uma única alternativa para controlar essa doença, mas sim uma combinação de medidas que reduzam as chances de desenvolvimento da mastite bovina e dos danos associados. O uso de antibióticos, produtos à base de vegetais e outros métodos, quando utilizados individualmente, pode não ser tão eficaz quanto o uso consciente e combinado de todas essas medidas juntas, como apontado por Sharun et al. (2021).

6. REFERÊNCIAS

- Adkins PRF, Middleton JR (2018) Methods for Diagnosing Mastitis. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice** 34:479–491. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.003>
- Aiemsraad J, Borlace GN, Thongkham E, Jarassaeng C (2023) Antibacterial efficacy of essential oil spray formulation for post-milking disinfection in dairy cows. **Veterinary World** 16:1552–1561. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.1552-1561>
- Ashraf A, Imran M (2020) Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. **Animal Health Research Reviews** 21:36–49. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>
- Awandkar SP, Kulkarni MB, Khode NV (2022) Bacteria from bovine clinical mastitis showed multiple drug resistance. **Veterinary Research Communications** 46:147–158. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09838-8>
- Beuron D, Cristina C, Bruno B, Susana M, Juliano G, Maria B, Marcos S (2014) Risk factors associated with the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: Antibióticos em Rebanhos. **Pesq. Vet. Bras.** 10:947–952.
- Borena BM, Gurmesssa FT, Gebremedhin EZ, Sarba EJ, Marami LM (2023) *Staphylococcus aureus* in cow milk and milk products in Ambo and Bako towns, Oromia, Ethiopia: prevalence, associated risk factors, hygienic quality, and antibiogram. **International Microbiology** 26:513–527. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00317-x>
- Bradley AJ (2002) Bovine mastitis: An evolving disease. **Veterinary Journal** 164:116–128. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2002.0724>
- Brown ML, Aldrich HC, Gauthier JJ (1995) Relationship between Glycocalyx and Povidone-Iodine Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) Biofilms. **Applied And Environmental Microbiology** 61.
- Buldain D, Buchamer AV, Marchetti ML, Aliverti F, Bandoni A, Mestorino N (2018) Combination of cloxacillin and essential oil of *Melaleuca armillaris* as an alternative against *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Veterinary Science** 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00177>

- Campos B, Pickering AC, Rocha LS, Aguilar AP, Fabres-Klein MH, de Oliveira Mendes TA, Fitzgerald JR, de Oliveira Barros Ribon A (2022) Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. **BMC Veterinary Research** 18. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03197-5>
- Caneschi A, Bardhi A, Barbarossa A, Zaghini A (2023) Plant Essential Oils as a Tool in the Control of Bovine Mastitis: An Update. **Molecules** 28. MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules28083425>
- Castelani L, Martins T, Frizzarin A, Crisléia A, Monção R, Soldá De Azevedo H, Santos De Miranda M, Rodrigues J, Arcaro P, Pozzi CR (2013) Avaliação da prevalência e etiologia da mastite bovina de Oito fazendas leiteiras do Estado de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia** 20:370–371. <https://cabidigitallibrary.org>
- Cheng WN, Han SG (2020) Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 33:1699–1713. Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>
- de Nies L, Kobras CM, Stracy M (2023) Antibiotic-induced collateral damage to the microbiota and associated infections. **Nature Reviews Microbiology** 21:789–804. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00936-9>
- De Souza Rezende EJ (2017) Modelo de detecção de mastite em vacas leiteiras usando termografia infravermelho. **Tese de Doutorado** Unicamp.
- Deus RJA, Alves C, Arruda CN (2011) Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Rev. Bras. Pl. Med.**
- Dragana Jakovljević Z, Stanković SM, Topuzović DM (2013) Seasonal Variability of *Chelidonium majus* L. Secondary Metabolites Content and Antioxidant Activity. **EXCLI Journal** 12.
- Elgamoudi BA, Korolik V (2021) *Campylobacter* biofilms: Potential of natural compounds to disrupt *Campylobacter jejuni* transmission. **International Journal of Molecular Sciences** 22. MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222212159>
- El-Sayed A, Kamel M (2021) Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. **Tropical Animal Health and Production** 53:236. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02680-9>

- Eurya Kuramae-Izioka E (1997) A Rapid, Easy and High Yield Protocol For Total Genomic DNA Isolation Of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista UNIMAR** 19
- Fitzpatrick SR, Garvey M, Flynn J, O'Brien B, Gleeson D (2021) The effect of disinfectant ingredients on teat skin bacteria associated with mastitis in Irish dairy herds. **Irish Veterinary Journal** 74. <https://doi.org/10.1186/s13620-020-00179-7>
- Gelgie AE, Desai SE, Gelalcha BD, Kerro Dego O (2024) *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy cattle. **Frontiers in Veterinary Science** 11. Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1322267>
- Gomes F, Henriques M (2016) Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. **Current Microbiology** 72:377–382. Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>
- Iwarsson K, Ekman L (1973) The Effect of a Post-Milking Teat Dip on The Iodine Concentration of Bulk Herd Milk. **Acta Vet. Scand.** 14:338–340.
- Kennedy B, De Borba A, Pereira JB (2020) Eficácia de diferentes desinfetantes no manejo do pré-dipping Efficiency of different disinfectants in pre-dipping handling. **Revista Perquirere** 17. <https://revistas.unipam.edu.br/index.php/perquirere>
- Kybartas M, Virgailis M, Ruzauskas M, Klimienė I, Šiugždinienė R, Merkevičienė L, Štreimikytė-Mockeliūnė Ž, Mockeliūnas R (2023) A Study on the Stability and Antimicrobial Efficacy of a Newly Modeled Teat Dip Solution Containing Chlorhexidine. **Veterinary Sciences** 10. <https://doi.org/10.3390/vetsci10080510>
- Lagha R, Abdallah F Ben, AL-Sarhan BO, Al-Sodany Y (2019) Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients. **Molecules** 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24061161>
- Leung AM, Braverman LE (2012) Iodine-induced thyroid dysfunction. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity** 19:414–419. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3283565bb2>
- Lopes TS, Fontoura PS, Oliveira A, Rizzo FA, Silveira S, Streck AF (2020a) Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. **Research in Veterinary Science** 131:186–193. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>
- Lopes TS, Fontoura PS, Oliveira A, Rizzo FA, Silveira S, Streck AF (2020b) Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. **Research in Veterinary Science** 131:186–193. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>
- McEwen SA, Collignon PJ (2018) Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective. **Microbiology Spectrum** 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>

- Nascimento CF, Santos PM, Pereira-Filho ER, Rocha FRP (2017) Recent advances on determination of milk adulterants. **Food Chemistry** 221:1232–1244. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.034>
- Nostro A, Guerrini A, Marino A, Tacchini M, Di Giulio M, Grandini A, Akin M, Cellini L, Bisignano G, Saraçoğlu HT (2016) In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. **International Journal of Food Microbiology** 238:33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.024>
- Oliver SP, Murinda SE (2012) Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice** 28:165–185. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.005>
- Paiva L, Lima E, Neto AI, Baptista J (2018) Seasonal variability of the biochemical composition and antioxidant properties of *Fucus spiralis* at two Azorean Islands. **Marine Drugs** 16. <https://doi.org/10.3390/md16080248>
- Pasca C, Marghitas LA, Dezmirean DS, Matei IA, Bonta V, Pasca I, Chirila F, Cîmpean A, Iosif Fit N (2020) Efficacy of natural formulations in bovine mastitis pathology: Alternative solution to antibiotic treatment. **Journal of Veterinary Research** 64:523–529. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0067>
- Pasca C, Mărghitas L, Dezmirean D, Bobis O, Bonta V, Chirilă F, Matei I, Fit N (2017) Medicinal plant-based products tested on pathogens isolated from mastitis milk. **Molecules** 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22091473>
- Pedersen RR, Krömker V, Bjarnsholt T, Dahl-Pedersen K, Buhl R, Jørgensen E (2021) Biofilm Research in Bovine Mastitis. **Frontiers in Veterinary Science**. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.656810>
- Pereira PC (2014) Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition** 30:619–627. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>
- Roana J, Mandras N, Scalas D, Campagna P, Tullio V (2021) Antifungal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil (Tto) and its synergy with itraconazole or ketoconazole against *Trichophyton rubrum*. **Molecules** 26. <https://doi.org/10.3390/molecules26020461>
- Ruegg PL (2017) A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science** 100:10381–10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
- Sakarikou C, Kostoglou D, Simões M, Giaouris E (2020) Exploitation of plant extracts and phytochemicals against resistant *Salmonella* spp. in biofilms. **Food Research International** 128. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108806>

- Santiago GS (2013) Caracterização da resistência antimicrobiana e estudo fenogenotípico da produção de betalactamases em enterobactérias associadas à etiologia da mastite bovina. **Dissertação de Mestrado**.
- Sharun K, Dhama K, Tiwari R, Gugjoo MB, Iqbal Yatoo M, Patel SK, Pathak M, Karthik K, Khurana SK, Singh R, Puvvala B, Amarpal, Singh R, Singh KP, Chaicumpa W (2021) Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly** 41:107–136. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>
- Silanikove N, Leitner G, Merin U, Prosser CG (2010) Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research** 89:110–124. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.033>
- Sohn SY, Inoue K, Rhee CM, Leung AM (2024) Risks of Iodine Excess. **Endocrine Reviews**. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnae019>
- Song M, Liu Y, Li T, Liu X, Hao Z, Ding S, Panichayupakaranant P, Zhu K, Shen J (2021) Plant Natural Flavonoids Against Multidrug Resistant Pathogens. **Advanced Science** 8. <https://doi.org/10.1002/advs.202100749>
- Song X, Huang X, Xu H, Zhang C, Chen S, Liu F, Guan S, Zhang S, Zhu K, Wu C (2020) The prevalence of pathogens causing bovine mastitis and their associated risk factors in 15 large dairy farms in China: An observational study. **Veterinary Microbiology** 247. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108757>
- Subramaniam J, Kovendan K, Mahesh Kumar P, Murugan K, Walton W (2012) Mosquito larvicidal activity of *Aloe vera* (Family: Liliaceae) leaf extract and *Bacillus sphaericus*, against Chikungunya vector, *Aedes aegypti*. **Saudi Journal of Biological Sciences** 19:503–509. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.07.003>
- Tomanić D, Samardžija M, Kovačević Z (2023) Alternatives to Antimicrobial Treatment in Bovine Mastitis Therapy: A Review. **Antibiotics** 12:4 MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040683>
- Touza-Otero L, Landin M, Diaz-Rodriguez P (2024) Fighting antibiotic resistance in the local management of bovine mastitis. **Biomedicine and Pharmacotherapy** 170 Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115967>
- Ul Haq I, Kamal M, Swelum AA, Khan S, De los Ríos-Escalante PR, & Usman T (2024) Alarming multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk of cows with subclinical mastitis: Antibiotic resistance patterns and occurrence of selected resistance genes. **PLoS ONE** 19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0301200>

- Wang K, Cha J, Liu K, Deng J, Yang B, Xu H, Wang J, Zhang L, Gu X, Huang C, Qu W (2022) The prevalence of bovine mastitis-associated *Staphylococcus aureus* in China and its antimicrobial resistance rate: A meta-analysis. **Frontiers in Veterinary Science** 9 <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1006676>
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols** 3:163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Zhao X, Lacasse P (2008) Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. **Journal of animal science** 86:57–65. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0302>