



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

BRUNO INÁCIO CORRÊA DE OLIVEIRA

Uso intramamário de óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) em vacas bovinas e bubalinas leiteiras

Intramammary use of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) in dairy cows and buffaloes

CURITIBA
2021

BRUNO INÁCIO CORRÊA DE OLIVEIRA

Uso intramamário de óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) em vacas bovinas e bubalinas leiteiras

Intramammary use of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) in dairy cows and buffaloes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Patologia, clínica e cirurgia veterinária, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff

**CURITIBA
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Bruno Inácio Corrêa

Uso intramamário de óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) em vacas bovinas e bubalinas leiteiras. Curitiba, 29 de Março de 2021, 89 p.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

1. Mastite 2. Saúde do úbere 3. Terapia da vaca seca 4. Óleo essencial.
I. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Escola de Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Dedicatória

Aos meus pais, esposa, irmãs e amigos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de conquistar um sonho. Pela força concedida para que na desafiante trajetória eu pudesse superar todos os desafios que se apresentaram, sem perder a fé e confiança no Seu poder;

A minha esposa Daniela C. P. de Oliveira, por todo amor, compreensão e paciência, que nos dias difíceis com palavras de animo me auxiliou e me proporcionou condições de continuar em busca do objetivo;

A todos os meus familiares, principalmente aos meus pais, Adriano Corrêa e Tereza, pela educação, amor e carinho. As minhas irmãs, Raphaela Corrêa e Rebeca Corrêa pelo amor e carinho, preocupadas em oração pedindo pela minha felicidade !

A todos os meus amigos e irmãos na fé, os quais tenho certeza de que rogam por minha felicidade. Em especial ao Élcio de Almeida Costa, amigo, irmão e principal estimulante desse sonho. Por me fazer acreditar que todas as barreiras poderiam ser superadas e que o meu sonho poderia por Deus e meu esforço ser alcançado;

Ao meu orientador e exemplo, Prof. Rüdiger Daniel Ollhoff, que me despertou o grande amor pela Buiatria e a quem devo a gratidão pelo conhecimento conquistado durante os anos por sua orientação; Pela amizade, respeito e confiança !

A empresa Dexter Latina representada pela Dr.^a Francinea Souza e sua equipe, essenciais para a viabilidade desta pesquisa, destacando o Sr. Gustavo Dias e Bianca da Silva, por todo apoio, ensinamento e boa vontade para que pudéssemos desenvolver a ideia do medicamento. A todos os funcionários da PUC – Paraná, onde destaco o Sr. Alceu Miguel Grebogi, por todos os ensinamentos, apoio e amizade; Exemplo de amor e respeito aos animais. Aos Doutores José Lino Martinez e João Ari G. Hill pela oportunidade de condução dos trabalhos nas unidades experimentais nas quais são responsáveis. Pelas boas conversas, conselhos e ensinamentos que me proporcionaram em todos os momentos de convivência. A todos os funcionários que ajudaram a viabilizar o estudo.

A Capes – Fundação Araucária por disponibilização de bolsa de auxílio me proporcionou condições para dedicação no trabalho. Ao Programa de Pós-graduação da PUCPR (PPGCA) e todos os professores que me auxiliaram. Por fim, agradeço os animais que me proporcionaram a oportunidade da pesquisa. Agradeço a todos !

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
FORMATO DA DISSERTAÇÃO	1
RESUMO	2
ABSTRACT	4
CAPÍTULO 1	6
INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO	6
CAPÍTULO 2	9
Uso de um medicamento com óleo essencial de melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>) na secagem e tratamento intramamário de vacas leiteiras.....	9
CAPÍTULO 3	44
Uso do óleo essencial de melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>) para secagem de búfalas Murrah de uma fazenda orgânica.....	44
CAPÍTULO 4	63
CONCLUSÃO/IMPACTOS E PERSPECTIVAS FUTURAS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Medidas ultrassonográficas (em mm) realizadas no teto bovino.....	16
Figura 2.1	Esquema demonstrativo dos exames realizados dentro da alternância de período seco e lactação das vacas.....	17
Figura 2.3	Esquema demonstrativo dos exames realizados dentro do período experimental no tratamento de mastite inaparente durante a lactação.....	18
Figura 2.4	Medidas anatômicas em mm dos tetos (n=28) das vacas Jersey feitas por ultrassonografia apresentados em média e desvio padrão ($\bar{X} \pm \alpha$) para o GO _{MAS} (n=14) em comparação ao GP _{MAS} (n=14).....	23
Figura 2.5	Comparação de CCS ($\times \log^{10}$) intragrupo em controles leiteiros oficiais, sendo o primeiro no momento da secagem e três controles no pós-parto para o GO _{SEC} (n=11) e GC _{SEC} (n=09).....	24
Figura 2.6	Comparação de CCS ($\times \log^{10}$) em três controles leiteiros oficiais no pós-parto para GO _{SEC} (n=11) em comparação ao GC _{SEC} (n=09).....	25
Figura 2.7	Proporção (%) de cultura bacteriológica negativa nos dias de avaliação para o GO _{MAS} (n=14) e GP _{MAS} (n=14).....	26
Figura 3.1	Esquema demonstrativo dos exames realizados dentre a alternância de período seco e lactação das búfalas.....	47
Figura 3.2	Medidas ultrassonográficas (em mm) realizadas no D0 e D1 nas búfalas (GT; n=12).....	48
Figura 3.3	Características anatômicas peculiares em búfalas: a) Anel proeminente na mucosa (seta verde); b) camada muscular mais espessa, comprimindo a cisterna do teto (setas amarelas).....	52

Figura 3.4	Comparação de CCS ($\times \log^{10}$) intra e entre grupos em três controles leiteiros oficiais, no pós-parto em comparação ao momento da secagem para GT (n=12) e ano STVS (n=12).....	53
------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Avaliação termográfica de tetos para o estudo de secagem de vacas (n=80) com medidas em °C e média e desvio padrão ($\bar{X} \pm \alpha$) de três pontos de avaliação para o GO _{SEC} (n=44) e GC _{SEC} (n=36).....	21
Tabela 2.2	Medidas anatômicas em mm dos tetos (n= 80) de vacas Holandesas feitas por ultrassonografia apresentados em média e desvio padrão ($\bar{X} \pm \alpha$) para o GO _{SEC} (n=44) em comparação ao GC _{SEC} (n=36).....	22
Tabela 2.3	Quantidade e distribuição de patógenos causadores de mastite em 88 amostras positivas colhidas para o GO _{MAS} e GP _{MAS} (cultura microbiológica).....	27
Tabela 3.1	Avaliação termográfica de tetos bubalinos (n=48) com medidas em °C e média e desvio padrão ($\bar{X} \pm \sigma$) de três pontos de avaliação.	50
Tabela 3.2	Medidas anatômicas em mm dos tetos (n= 48) de búfalas Murrah feitas por ultrassonografia apresentados em média e desvio padrão ($\bar{X} \pm \sigma$) dos tetos.....	51
Tabela 3.3	Medidas anatômicas em mm dos tetos anteriores (n= 24) e tetos posteriores (n=24) de búfalas Murrah feitas por ultrassonografia apresentados em média e desvio padrão ($\bar{X} \pm \sigma$).....	51

LISTA DE SÍMBOLOS

$(\bar{X} \pm \alpha)$	Média e desvio padrão
>	Maior que
<	Menor que
$\mu\text{L/mL}$	Microlitros por mililitros
%	Porcentagem
% v/v	Porcentagem volume por volume
Kg	Quilograma

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC®	<i>American Type Culture Collection</i>
CEUA	Comitê de ética em pesquisa para o uso de animais
CBM	Concentração bactericida mínima
CCS	Contagem de células somáticas
CCT	Comprimento do canal do teto
CIM	Concentração inibitória mínima
CL	Controle leiteiro oficial
CLSI	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
CMT	<i>California mastitis test</i>
DEL	Dias em lactação
DRF	Diâmetro do teto
DTC	Diâmetro da cisterna do teto
EF	Exame físico específico
EMT	Espessura da mucosa do teto
EPT	Espessura da parede do teto
HPB	Holandesa preta e branca
HVB	Holandesa vermelha e branca
MAS	Estudo de tratamento de mastite inaparente
MC	Mastite clínica
OEM	Óleo essencial de melaleuca
M10	Medicamento com óleo essencial de melaleuca a 10%
M5	Medicamento com óleo essencial de melaleuca a 5%
PS	Período seco
PP	Produto placebo
SEC	Estudo de secagem
SIT	Selante interno para tetos
TBT	Temperatura da base do teto
TCB	Taxa de cura bacteriológica
TCT	Temperatura do centro do teto
TPT	Temperatura da ponta do teto
TRI	Termografia infravermelha

TVS	Terapia da vaca seca
UP	Última produção
US	Ultrassonografia de tetos

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por quatro capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral, justificativa e os objetivos de estudo. O capítulo 2 aborda, em formato de um artigo científico completo contendo referências, intitulado como “Uso de um medicamento com óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) na secagem e tratamento intramamário de vacas leiteiras” que está sendo formatado nas normas da revista *The Veterinary Journal* (anexo 1).

O capítulo 3 refere-se a artigo científico completo, intitulado como “Uso do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) para secagem de búfalas Murrah em uma fazenda orgânica”, contendo referências e formatado nas normas da revista *Australian Veterinary Journal* (anexo 2).

O capítulo 4 finaliza esta dissertação com conclusões e considerações finais, delineando os possíveis impactos e perspectivas futuras do conhecimento gerado. As referências do capítulo 1 encontram-se ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

A mastite é um dos principais problemas encontrados em propriedades pecuárias leiteiras, afetando diretamente a produção e a lucratividade da atividade pela perda da saúde. Para prevenir ou tratar as infecções da mama usam-se antibióticos, todavia, o uso sem critério contribui com a resistência antimicrobiana um problema de saúde única. Mediante a pressão para uma redução do uso de antibióticos, cresce a busca por alternativas, entre essas o uso de medicamentos derivados de extratos vegetais. Objetivou-se investigar a eficácia do uso óleo essencial de melaleuca (OEM), derivado da árvore *Melaleuca alternifolia* na secagem de vacas bovinas Holandesas e bubalinas Murrah, assim como para o tratamento de mastites em vacas bovinas Jersey em lactação. Formulou-se um medicamento com uma concentração de 5% de OEM (M5), equivalente a 200mg de OEM por aplicação para proteção de vacas bovinas e bubalinas durante o período seco, e uma concentração de 10% (M10), equivalente a 400mg de OEM por aplicação para tratamento da mastite em vacas Jersey em lactação. Para a avaliação do OEM 5% (M5) determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). Verificou-se a inocuidade por meio de exame físico específico (EF), ultrassonografia (US) e termografia infravermelha de tetos (TRI). A eficácia da proteção durante o período seco, foi avaliada pela comparação de exame de secreção por meio do California mastitis test (CMT) no momento da secagem (CMTs) e o CMT no pós-parto (CMTpp) e contagem de células somáticas (CCS) no momento antes da secagem (CCSs) e durante 100 dias de lactação (DEL) no pós-parto (CCSpp), assim como foi avaliada a ocorrência de mastite clínica (MC) durante os 100 DEL. Os valores experimentais foram comparados com grupo controle positivo (GC_{SEC}, n=9), com terapia da vaca seca (TVS) com antibiótico comercial a base de cefalônio anidro 0,25g e excipiente q.s.p. 3,00g (Cepravin®) e sulfato de neomicina 400 mg, bacitracina 5.000 UI e veículo q.s.p. (Neomastic®). No estudo com búfalas Murrah (n= 12), comparou-se os resultados de forma retrospectiva perante dados históricos de lactação anterior. As vacas foram examinadas físico-clinicamente, por ultrassonografia e termografia. A saúde do úbere foi também monitorada nos primeiros 100 DEL posterior ao tratamento e indiretamente por meio da CCS e o CMT. No uso do

óleo de melaleuca 10% (M10), em experimento duplo cego, no tratamento de vacas infectadas (CSS > 200.000 CCS/mL) no grupo com óleo de melaleuca (GO_{MAS}, n=9), grupo placebo (GP_{MAS}, n=10) e grupo controle negativo (GC_{MAS}, n= 9), a avaliação da eficácia do tratamento, foi determinada por meio das taxas de cura bacteriológica (TCB) avaliadas comparadas antes do início do tratamento, no dia 0 (D0), 24 horas após o fim do tratamento, no dia 3 (D3) e 14 dias após o início do tratamento (D14) com aplicação do M10. A comparação entre grupos em relação ao estudo de secagem de vacas bovinas, revelou uma diferença ($P < 0,05$) nos valores CCS, superiores para o grupo com OEM (GO_{SEC}, n= 11) em relação ao GC_{SEC}. Entretanto, o M5 demonstrou-se eficaz na prevenção de mastite clínica no pós-parto. Para o estudo de secagem de vacas bubalinas, não foram observadas diferenças de valores de CCS e CMT diferenças ($P > 0,05$) entre as lactações. Para o estudo de tratamento de mastite inaparente, o exame físico (EF) não apresentou diferenças ($P > 0,05$) na comparação entre e intragrupos; porém, observaram-se maiores ocorrências de MC para o GP ($P = 0,0019$). Para o M10 observou-se um efeito bacteriostático, verificado pelo aumento transitório da cultura negativa no D3 ($P = 0,0338$). O OEM, apesar de indicativos de inflamação aguda, mostrou-se seguro para uso por via intramamária nas concentrações testadas, sem efeitos adversos graves. O produto mostrou-se efetivo para proteção de vacas durante o período seco, porém ineficaz para o tratamento de vacas com mastite inaparente, apesar de observados uma ação bacteriostática, que deverá ser melhor investigada.

Palavras-chave: Mastite; Saúde do úbere; Concentração inibitória mínima (CIM); Concentração bactericida mínima (CBM); Terapia da vaca seca.

ABSTRACT

Mastitis is one of the main problems found in dairy farms, directly affecting the production and profitability of the activity due to loss of health. To prevent or treat intramammary infections, antibiotics are used, however the use without criteria, contributes to antimicrobial resistance a unique health problem. Through pressure to reduce the use of antibiotics, the search for alternatives is growing, including the use of medicines derived from plant extracts. The objective was to investigate the effectiveness of using tea tree oil (TTO), derived from the *Melaleuca alternifolia* tree in the dry-off Holstein-Friesian cattle and Murrah buffalo cows, as well as for the treatment of mastitis in lactating Jersey cows. A drug was formulated with a concentration of 5% of TTO (M5), equivalent to 200mg of TTO per application to protect bovine and buffalo cows during the dry period, and a concentration of 10% (M10), equivalent to 400mg of TTO by application for the treatment of mastitis in lactating Jersey cows. For the evaluation of the OEM 5% (M5) the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (CBM) were determined. Innocuousness was verified by means of specific physical examination (PE), ultrasound (US) and infrared teat thermography (IRT). The effectiveness of protection during the dry period was assessed by comparing the secretion exam using the *California mastitis test* (CMT) at the time of drying (CMTdry) and the postpartum CMT (CMTpp) and somatic cell count (SCC) in the moment before drying (SCCdry) and during 100 days in milking (DIM) in the postpartum period (SCCpp), as well as the occurrence of clinical mastitis (CM) during the 100 DIM. The experimental values were compared with a positive control group (GC_{DRY}, n = 9), with dry cow therapy (DCT) with commercial antibiotic based on 0.25g anhydrous cephalonium and excipient q.s.p. 3.00g (Cepravin®) and neomycin sulfate 400 mg, bacitracin 5,000 IU and vehicle q.s.p. (Neomastic®). In the Murrah buffalo study (n=12), the results were compared retrospectively against historical data on previous lactation. The cows were examined physically-clinically, by ultrasound and thermography. Udder health was also monitored in the first 100 DIM after treatment and indirectly through SCC and CMT. In the use of tea tree oil 10% (M10), in a double blind experiment, in the treatment of infected cows (SCC > 200,000 SCC/mL) in the group with tea tree oil (OG_{MAS}, n=9), placebo

group (PG_{MAS}, n=10) and negative control group (CG_{MAS}, n=9), the evaluation of treatment efficacy, was determined by means of the bacteriological cure rates (BTR) evaluated compared before the start of treatment, on day 0 (D0), 24 hours after the end of treatment, on day 3 (D3) and 14 days after the start of treatment (D14) with application of M10. The comparison between groups in relation to the drying study of bovine cows, revealed a difference ($P < 0.05$) in the SCC values, higher for the group with TTO (OG_{DRY}, n=11) in relation to the CG_{DRY}. However, M5 has been shown to be effective in preventing clinical mastitis in the postpartum period. For the study dry-off buffalo cows, no differences in SCC and CMT values were observed ($P > 0.05$) between lactations. For the study of treatment of subclinical mastitis, the physical examination (FE) showed no differences ($P > 0.05$) in the comparison between and within groups; however, there were higher occurrences of CM for the PG ($P = 0.0019$). For M10, a bacteriostatic effect was observed, verified by the transient increase of the negative culture in D3 ($P = 0.0338$). The TTO, despite being indicative of acute inflammation, proved to be safe for intramammary use at the concentrations tested, without serious adverse effects. The product proved to be effective for protecting cows during the dry period, but ineffective for the treatment of cows with subclinical mastitis, despite the observation of a bacteriostatic action, which should be further investigated.

Keywords: Mastitis; Udder health; Minimum inhibitory concentration; Minimum bactericidal concentration; Dry cow therapy.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

O início da década de 2010 apresentava um cenário promissor para a produção de leite no Brasil, confirmado por um crescimento de 16,1% até o ano de 2019 (Spers et al. 2013; IBGE, 2020). Em 2020, influenciado pelos efeitos da pandemia de SARS-Covid-19, o isolamento social implicou no aumento da demanda de leite e produtos derivados, potencializado pela sustentação por meio do programa de auxílio emergencial (CEPEA, 2020).

Porém sem saúde da vaca, não há produção de leite. A mastite é uma das principais enfermidades da pecuária leiteira (Aghamohammadi et al. 2018). A mastite afeta diretamente a saúde do úbere e a saúde geral da vaca. O uso sem critérios de antibióticos no tratamento das mastites, pode estimular o aparecimento de resistência antimicrobiana (Hogeveen et al. 2011), potencializando ainda mais os prejuízos econômicos causados pelas infecções intramamárias (Roboisson et al. 2020).

A partir da pressão realizada por consumidores, buscam-se alternativas para a utilização de antibióticos sintéticos (Patel et al. 2020). Dentre as alternativas, estão substâncias ativas derivadas de plantas, como óleos essenciais. Estima-se que existam mais de 3000 óleos essenciais obtidos por destilação, fermentação, prensagem, extração, hidrólise e aeração (Freires et al. 2015). Todavia, a principal forma de extração é a destilação por arraste de vapor, método pelo qual se obtém o óleo essencial de melaleuca (OEM), a partir das folhas da árvore *Melaleuca alternifolia* (Carson et al. 2002). O OEM possui potencial antimicrobiano e anti-inflamatório e é composto por hidrocarbonetos terpênicos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois associados (Carson et al. 2006).

Apesar de ser originária na Austrália, esta espécie apresenta boa adaptação ao clima brasileiro. As análises de padrão de qualidade do OEM, por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, não apresentam alteração na composição da planta no Brasil, garantindo concentrações semelhantes de Terpinen-4-ol, que confere ao OEM suas ações farmacológicas (Oliveira et al. 2015).

Em bovinos, as pesquisas ainda são incipientes. No entanto, estudos *in vitro* demonstram que o OEM apresentou ação antimicrobiana de seus componentes, principalmente contra *S. aureus* e *E. coli* obtidos de vacas com mastite (Buldain et al. 2018). Efeitos acaricidas foram testados inicialmente *in vitro* contra *Rhipicephalus microplus* e em seguida comprovados em vacas leiteiras (Pazinato et al., 2014; Boito et al., 2016). Tópicamente, o OEM ainda foi avaliado como agente cicatrizante e analgésico em bovinos queimados com ferro quente (Tucker et al., 2014) e na dermatite digital em vacas (Smith et al., 2014). Um produto intramamário com ação SIT a base de extratos vegetais incluindo o OEM, protegeu o sistema mamário, sem efeitos colaterais (Mullen et al., 2014).

A utilização do OEM pode ser valiosa, dado o considerável número de pesquisas *in vitro* e *in vivo* que têm avaliado suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (Cox et al. 2000; Carson et al. 2002; Mullen et al. 2014). Contudo, avaliações envolvendo aplicação intramamária ainda inexistem e precisam ser conduzidas para se confirmar seu potencial para o tratamento das mamites em vacas, tanto bovinas quanto bubalina.

Inexiste no mercado brasileiro um produto natural para uso intramamário para prevenção de mastites no período seco ou apto para o tratamento de mastites durante a lactação, e produtos disponíveis no mercado estadunidense e Canadá como Phytomast® e Cinatube® (Pinedo et al. 2013; Mullen et al. 2014) não estão disponíveis para comercialização no mercado interno. Em propriedades de produção orgânica, faz-se o uso de selantes internos para tetos, para proteger a glândula de uma infecção ascendente durante o período seco; porém, essa opção não apresenta ação antimicrobiana Meaney (1977).

O OEM para aplicação intramamária poderia preencher essa lacuna terapêutica, necessitando-se avaliar sua compatibilidade com a mucosa do teto, além da verificação do potencial do óleo para proteção contra infecções intramamárias e tratamento de vacas com mastites infecciosas.

Logo, esta dissertação objetivou:

1. Avaliar *in vivo* a compatibilidade e o potencial do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) para aplicação intramamária em vacas bovinas e bubalinas, como alternativa ao uso de antibióticos sintéticos.

2. Formular um medicamento a base de OEM, com ação antibacteriana para vaca seca e para uso em mastites ambos aplicados por via intramamária.

3. Comparar o medicamento natural com produtos comerciais intramamários para vaca seca nos aspectos físico clínicos, contagem de células somáticas (CCS), termográficos do teto, ultrassonográficos do teto e ocorrência de mastites.

4. Verificar a taxa de cura bacteriológica após término do protocolo terapêutico.

CAPÍTULO 2

Original Article

Uso de um medicamento com óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) na secagem e tratamento intramamário de vacas leiteiras

Resumo

Dois estudos, um com controle positivo e outro cego, com placebo e controle negativo, foram conduzidos para avaliar o efeito do tratamento intramamário com medicamento natural a base de óleo essencial de melaleuca - *Melaleuca alternifolia* (OEM) sobre a proteção contra mastite durante o período seco e tratamento de mastite bovina inaparente. Como ingrediente ativo o medicamento, possuía uma concentração de 5% de OEM (M5) para o estudo de secagem (SEC) e 10% de OEM (M10) para o estudo de tratamento de mastite (MAS). Empregando critérios restritivos, foram utilizadas para o SEC, vacas Holandesas (n=20) em estudo experimental longitudinal prospectivo com controle positivo. As vacas foram divididas em dois grupos, sendo um grupo óleo melaleuca (GO_{SEC}; n=11) e grupo controle positivo (GC_{SEC}; n=9), com terapia da vaca seca (TVS) com antibiótico comercial a base de cefalônio anidro 0,25g (Cepravin®) ou sulfato de neomicina 400mg, bacitracina 5000 UI (Neomastic®). A TVS foi comparada pela CCS no momento da secagem e após o parto, em 100 dias em lactação DEL, ocorrência de mastite clínica (MC), *California mastitis test* - CMT na secagem (CMTs) e CMT no pós-parto (CMTpp). Para o MAS, vacas Jersey foram consideradas com mastite quando apresentavam reação positiva no CMT. O tratamento de vacas Jersey intramamário diário por três dias foi comparado considerando contagem de células somáticas (CCS) pré tratamento, comparando o CMT no pré-tratamento e nos dias D1, D2, D3 e D14 pós-tratamento, produção de leite e temperatura do leite, colhidos nos quatorze dias após o início do tratamento para o grupo óleo de melaleuca (GO_{MAS}, n=9), grupo placebo (GP_{MAS}, n=10) e grupo controle negativo (GC_{MAS}, n=9). Variáveis como exame físico específico (EF) e ultrassonografia de tetos (US), foram comparados para os dois estudos, termografia somente para o SEC e taxa de cura bacteriológica para o MAS. Para o SEC, os valores médios de TRI de tetos foram maiores para GO_{SEC} no dia 1 (D1; P=0,0084) e no dia 7 (D7; P=0,0410) em comparação ao GC_{SEC}. Não foram observadas diferenças (P<0,05) pela US de tetos ou por meio do exame físico específico. A semelhança entre grupos em relação a ocorrência de mastite (P=0,1337), indicaram a proteção de vacas no período seco, mesmo mediante a variação em valores de CCS que apresentaram aumento

para o GO_{SEC} para o segundo CL (CCS2; P= 0,0210) e uma tendência de aumento significativo no primeiro CL (CCS 1; P= 0,0547) e para o terceiro CL (CCS3, P=0,0578) em comparação ao GC_{SEC}. No MAS o desfecho primário foi a evolução do CMT, taxa de cura bacteriológica e CCS. Em ambos os grupos avaliados, GO_{MAS} e GP_{MAS}, a bactéria mais encontrada foi *S. aureus*. Os valores para CCS, indicaram um perfil crônico de infecção intramamária das vacas avaliadas. Valores de CMT e produção de leite não se alteraram (P>0,05) entre os grupos e nos momentos observados, com a exceção da diminuição do CMT no D14 para o grupo GO_{MAS} (P=0,0022) e para o GP_{MAS} (P<0,001). Os resultados de cultura bacteriológica dos grupos GO_{MAS} e GP_{MAS} não foram afetados pelo tratamento (P>0,05). O medicamento foi de fácil aplicação intramamária, demonstrou não ser irritante e eficaz *in vitro* e na proteção de vacas, no que diz respeito a proteção durante o período seco. O tratamento implementado na lactação diante do perfil de infecção crônica da mama das vacas foi ineficaz para promover a cura bacteriológica.

Palavras-chave: Mastite; Saúde do úbere; Terapia da vaca seca (TVS); Concentração inibitória mínima (CIM); Concentração bactericida mínima (CMB).

Introdução

A mastite bovina representa um dos maiores motivos de perda da produção leiteira, antibioticoterapia e descarte involuntário de vacas nas criações de bovinos de leite (Aghamohammadi et al. 2018). Esta enfermidade apresenta-se de maneira inaparente ou subclínica, detectada somente por alterações da composição do leite (Gonçalves et al. 2018), ou por mastite clínica, em suas diferentes formas catarral, apostematosa e flegmonosa (Rosenberger, 1993), que por sua vez, além da diminuição da produção de leite, implica em outras perdas mediante o uso de medicamentos, mão de obra, diagnóstico, descarte do leite podendo culminar no descarte precoce ou até na morte da vaca (Aghamohammadi et al. 2018).

Um fator importante a ser considerado é a diminuição do grau de bem-estar apresentado pelas vacas doentes, uma vez que a mastite é pode ser dolorosa (Pol; Ruegg 2007). Pensando em reversão da situação clínica, o uso de antibióticos é utilizado faz muitos anos de maneira indiscriminada, resultando em sérios problemas de resistência antimicrobiana e conseqüentemente busca por controles alternativos da mastite (Gomes; Henriques, 2016). Para reverter esse prejuízo, o diagnóstico correto proporciona a

diminuição do uso de antibióticos sintéticos (Sanford et al. 2006), assim como o uso racional em momentos específicos, como na terapia da vaca seca (TVS), manejo determinante para a saúde do úbere, sendo estratégico para mitigar e prevenir a mastite (Japheth et al. 2016; Vasquez et al. 2017).

Contudo o uso de antimicrobianos na profilaxia e tratamento das mastites é controverso, pois acumulam-se casos de ineficácia pela resistência bacteriana, descarte prolongado do leite, bem como o custo elevado do tratamento (Hogeveen et al. 2011). Por isso, estratégias vêm sendo implantadas para um uso mais consciente, como a seleção criteriosa para prevenção e tratamento com o uso de antibióticos e a busca por tratamentos alternativos (Biggs et al. 2016; Krömker et al. 2019).

Nesse cenário, apresentam-se os produtos derivados de plantas (Gomes; Henriques 2016) e dentre estes os óleos essenciais (Enioutina et al. 2019; Sakkas; Papadopoulou; 2017). O óleo essencial de melaleuca (OEM), também conhecido como óleo da árvore do chá (Tea tree oil) é composto por hidrocarbonetos terpênicos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois associados derivado da destilação a vapor da planta nativa australiana *Melaleuca alternifolia* (*Myrtaceae*) (Carson et al. 2002). Este extrato vegetal, é considerado um antimicrobiano de amplo espectro (Carson et al. 2006; Singh et al. 2016) e juntamente com outros óleos essenciais foi usado como um selante intramamário (Mullen et al. 2014) com bons resultados. Seu uso foi eficaz contra bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* retirados de vacas com mastite (Buldain et al. 2018). Apesar destes resultados promissores, não foram encontrados na literatura consultada outras pesquisas abordando o OEM no controle e tratamento da mastite bovina.

Os objetivos deste trabalho foram formular e avaliar a eficácia de um medicamento a base de OEM para proteção de vacas Holandesas durante o período seco e para o tratamento intramamário de vacas Jersey com mastite inaparente.

Materiais e métodos

Local

O estudo para proteção de vacas durante o período seco (SEC), foi realizado entre novembro de 2019 e fevereiro de 2021 na Fazenda Experimental Gralha Azul (FEGA) no

setor de criação de vacas leiteiras, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), no município da Fazenda Rio Grande, Paraná, Brasil (latitude 25° 39' 31'' sul, longitude 49° 18' 32'' oeste, e 911 m de altitude). O clima da região é subtropical (Cfb) segundo a classificação de Köppen.

O estudo para tratamento de vacas com mastite inaparente (MAS), foi realizado entre dezembro de 2020 e fevereiro de 2021 no setor de bovinocultura leiteira na Estação de Pesquisa de Pato Branco (Latitude 25° 13'46'' sul, Longitude 52° 40'18'' Oeste e 765 m de altitude), Paraná, do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR – Paraná). O clima da região é subtropical (Cfa) segundo a classificação de Köppen.

Preparação dos medicamentos

O OEM, adquirido da empresa Ferquima®, passou por uma análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa revelando uma concentração de 42 % de seu principal componente ativo o terpinen-4-ol. Demais informações técnicas podem ser verificadas nos documentos anexos (anexo 3).

Foi formulado um medicamento para aplicação intramamária para proteção de vacas no estudo de secagem a 5% de OEM (M5) e avaliação de ação antibiótica com 10% de OEM (M10) para o estudo de tratamento de mastite inaparente. O medicamento foi formulado segundo os preceitos de boas práticas de manipulação, em laboratório parceiro da Empresa Dexter Latina, localizada no município de São José dos Pinhais, Paraná, Brasil.

Obteve-se uma substância coloidal de uso parenteral (intramamário), constituída por agente polimerizador Polaxamer etileno e dietileno glicol oxietileno (72,5% p/p) (Kolliphor®/BASF) como principal agente estruturador e fornecedor da estabilidade física do coloide. Polietilenoglicol (PEG1500) foi empregado como umectante e dispersante, e como o ingrediente ativo o óleo de Melaleuca (5 ou 10%). Os compostos mencionados formaram sistema emulsionado do tipo A/O (água em óleo). O medicamento final foi acondicionado em aplicadores do tipo seringa de uso convencional para aplicação intramamária.

Teste de suscetibilidade antimicrobiana

O OEM a 5% foi submetido a testes de susceptibilidade antimicrobiana, na comparação para CHX 2%, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), por meio de técnicas de micro-diluição em caldo para bactérias que crescem aerobicamente de acordo com os procedimentos da *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI, 2012).

Os testes foram realizados em análises em quadruplicata executado em dois tempos, para cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e duas cepas selvagens de *Staphylococcus aureus* oriundas da glândula mamária de vacas Holandesas. Em seguida, foram classificadas de acordo com os critérios de interpretação da CIM e CBM analisado em µg/mL e % (v/v) de cada bactéria (CLSI, 2012).

Animais e delineamento experimental

Estudo de secagem (SEC)

Dos trinta e cinco animais avaliados foram selecionadas para secagem vinte vacas da raça Holandesa preto e branco (HPB) e Holandesa vermelho e branco (HVB). Foram utilizados como critérios de inclusão: vacas sem lesões no teto ou úbere, sem mastite clínica ou com média de CCS dos últimos três meses pré secagem menor que 400.000 células/mL, de acordo com limite de aceitação de leite cru para fabricação de leite tipo A, imposta pela Instrução normativa nº 76 do MAPA (IN 76; MAPA, 2018). Foram selecionadas vacas adultas, com média de 3,6 anos e 1,6 lactações, porém estas características não foram utilizadas como critérios de exclusão. Todas as vacas estavam em fase final de lactação, permaneceram em rotina diária usual sem alteração do manejo, em regime de criação intensiva, por estabulação livre com dieta alimentar balanceada a base de silagem de milho, feno e concentrados. As vacas eram ordenhadas em sistema de ordenha robotizada e foram submetidas a secagem abrupta com aplicação intramuscular de cabergolina 0,112 g (Velactis®).

As vacas foram separadas em grupo OEM (GO_{SEC}; n=11) e grupo controle positivo (GC_{SEC}; n=09). As vacas selecionadas, todas identificadas por meio de brincos, foram direcionadas aos grupos de forma aleatória.

Para os dois grupos, previamente a ordenha, as vacas passaram no dia 0 (D0) por avaliação física específica, com inspeção e palpação da glândula mamária, com especial atenção ao parênquima e tetos, conforme descrito por Grunert (1993); ultrassonografia dos tetos (Will et al., 1990; Mulon, 2016; Martin et al. 2018) e termografia dos tetos (Sathiyabarathi et al., 2016; Tangorra et al. 2019). O medicamento com OEM a 5% (M5) foi aplicado no dia da secagem, após a realização de *California mastitis test* – CMT (Schalm e Noorlander, 1957), com desinfecção da ponta do teto com álcool 70% e introdução através de aplicador intramamário do M5 no volume de 4ml (D0). No dia um (D1) e dia sete (D7) foram repetidas a avaliação física específica, a ultrassonografia e a termografia. O CMT foi repetido em todos os animais sete dias após o parto (Barkema et al. 1998; Godden et al. 2017). Eventuais alterações foram anotadas em ficha clínica (anexo 4).

Foram analisados para ambos os grupos, vacas como unidade experimental, na avaliação do tempo total de secagem (em dias), CCS, e ocorrências de mastite clínica (MC) até os primeiros 100 dias em lactação (DEL) (Bradley et al. 2011; Krömker et al., 2014).

Para as análises de ultrassonografia e termografia de tetos e CMT, utilizou-se os quartos como unidade experimental (GO_{SEC}; n=44 e GC; n=36).

Estudo de tratamento de mastite inaparente (MAS)

De 33 animais avaliados, foram incluídas para o tratamento de mastite inaparente, 28 vacas da raça Jersey, divididas em grupo óleo de melaleuca (GO_{MAS}, n=9), grupo placebo (GP_{MAS}, n=10) e grupo controle negativo (GC_{MAS}, n=9), em qualquer estágio de lactação, permanecendo em rotina diária usual sem alteração do manejo, em regime de criação semiextensiva, com dieta alimentar a base de capim tifton, silagem de milho, concentrados.

Foram utilizados como critérios de inclusão para o GO_{MAS} e GP_{MAS}: vacas sem lesões no teto ou úbere, com mastite inaparente, caracterizada sem alterações visíveis no leite (Grunert, 1993) e detectadas pelo *California mastitis test* (CMT) levemente positivo (+), positivo (++) e fortemente positivo (+++) de acordo com Schalm e Noorlander, 1957. Os animais foram divididos nos grupos de maneira aleatória.

Para o GC_{MAS}, foram selecionadas vacas sem MC ou inaparente, com CMT negativo (-). Para todos os grupos, idade e ordem de lactação não foram utilizadas como critério de exclusão.

Os animais foram identificados por seus traços morfológicos e brincos numerados. As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia em sistema de ordenha mecânica fixo do tipo espinha de peixe em duplo seis.

Previamente a ordenha, considerando quartos como unidade experimental no dia 0 (D0), todas as vacas passaram por exame físico específico, incluindo inspeção e palpação do úbere e tetos, segundo descrito por Grunert (1993) e ultrassonografia dos tetos (US) (Will et al., 1990; Mulon, 2016; Martin et al. 2018; Pogliani, 2019). Foi realizado o CMT de todos os quartos de modo a selecionar os quartos possivelmente infectados (Schalm e Noorlander, 1957). Eventuais alterações foram anotadas em ficha clínica (anexo 5)

Imediatamente após a ordenha, foi realizado a colheita asséptica de leite para realização cultura bacteriana (Grunert, 1993) para o GO_{MAS} e GP_{MAS}, e por fim a aplicação do medicamento com OEM a 10% (M10) e produto placebo (PP), no volume de 4ml, após desinfecção da ponta do teto com álcool 70% e introdução através de aplicador intramamário. O tratamento consistiu em uma aplicação diária, após a ordenha da tarde, durante três dias consecutivos. O estudo foi conduzido as cegas, com os aplicadores intramamários codificados: 1 para M10 e 2 para PP, revelados somente após apresentação dos resultados.

O exame físico específico e US foram repetidos no dia um (D1) e dia 3 (D3) para o GO_{MAS} e GP_{MAS} colheita de leite para cultura bacteriológica foi repetida no D3 e dia 14 (D14). O CMT foi repetido em todos os dias de avaliação, inclusive para o GC_{MAS} (n=36). Foram colhidos dados de produção de leite nos quatorze dias de avaliação.

A eficácia foi avaliada de duas maneiras; primeiro, com ausência de patógenos nas amostras de D14 e, segundo com redução dos valores de CMT no D14.

Termografia infravermelha (TRI) do teto

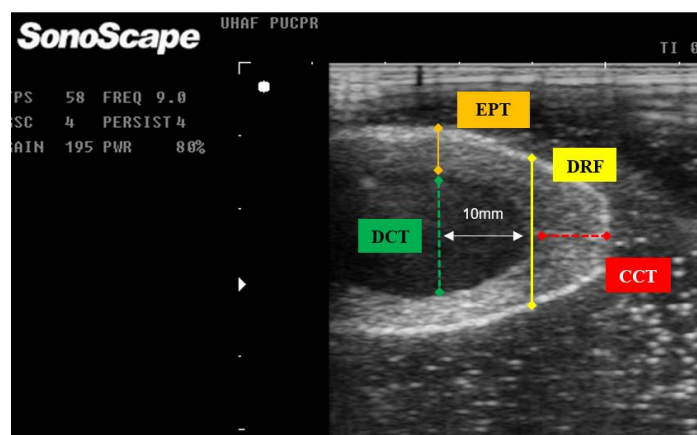
As avaliações de TRI dos tetos foram realizadas por conveniência somente para o SEC, no período da manhã, com registros individuais de temperatura (em °C) e umidade relativa do ar (URA%), em ambiente aberto com distância de 1 m em posições laterais para os tetos laterais e caudal para os tetos posteriores. A avaliação foi realizada com uma câmera infravermelha *FLIR* modelo E50® (Sathiyabarathi et al., 2016; Tangorra et al. 2019). Os termogramas foram analisados pelo programa *FLIR tools* com determinação da temperatura em três pontos do teto (base, centro e ponta) e média geral; e apresentados em média e desvio padrão.

Ultrassonografia (US) do teto

As ultrassonografias foram realizadas em SEC e MAS com um equipamento *Sonoscape* modelo A5V® com probe linear de 9 MHz e EASOTE modelo falco 100 OB GYN® com probe linear 8 MHz. Para avaliação das estruturas do teto sem compressão, o teto foi imerso em um copo plástico cheio de água morna, com colocação do transdutor na parede do copo revestida com gel de ultrassom. As medições foram realizadas no ato do exame “ao pé da vaca”.

As medidas ultrassonográficas foram (em mm): comprimento do canal do teto (CCT), medido da Roseta de Fürstenberg até a extremidade distal do canal do teto; Diâmetro do teto no mesmo eixo ortogonal no ponto da Roseta de Fürstenberg (DRF), diâmetro da cisterna do teto (DCT), espessura da parede do teto (EPT) medidos ortogonalmente ao canal do teto, 10 mm acima da Roseta de Fürstenberg (figura 2.1).

Fig.1. Medidas ultrassonográficas (em mm) realizadas no teto bovino.



Legenda CCT: comprimento do canal do teto; DRF: diâmetro do teto medido no eixo ortogonal a Roseta de Fürstenberg; EPT: espessura da parede do teto; DCT: diâmetro da cisterna do teto.

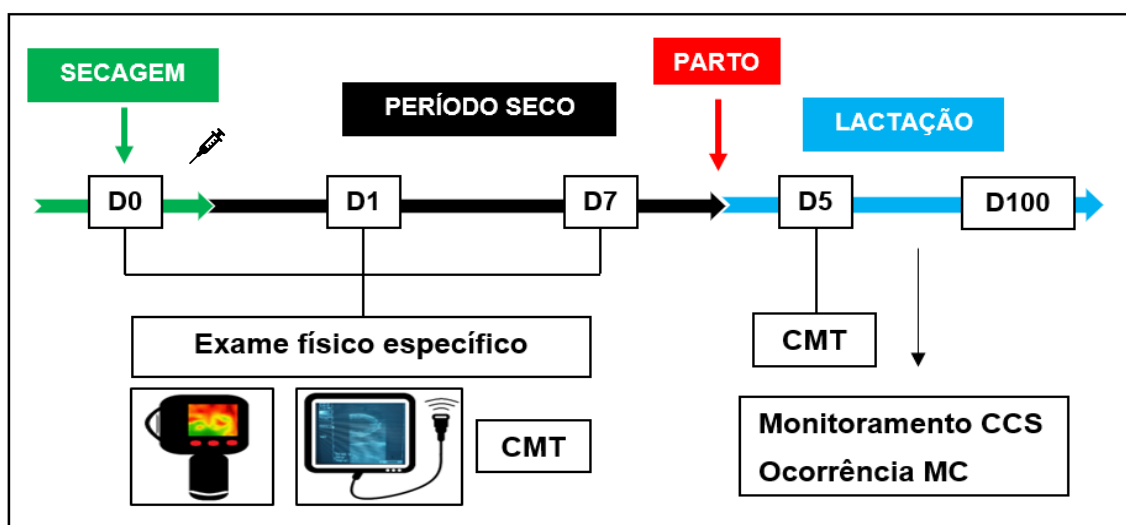
California mastitis test (CMT), Contagem de células somáticas (CCS) e ocorrência de mastites

Estudo de secagem (SEC)

Na secagem, todas as vacas tiveram CMT realizado em cada quarto funcional. A reação CMT de cada quarto foi registrada e classificada de acordo com Schalm e Noorlander (1957). O CMT (CMTpp) foi realizado cinco dias após o parto (Barkema et al. 1998; Godden et al. 2017) e a ocorrência de MC durante os 100 primeiros DEL (Krömker et al. 2014). A CCS foi realizada pela Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), disponibilizando informações via relatórios mensais mediante solicitação do produtor.

Para facilitar visualizar o cronograma de exames realizados, foi elaborado o um esquema apresentado na figura 2.

Fig. 2. Esquema demonstrativo dos exames realizados dentro da alternância de período seco e lactação das vacas.



Legenda: D – Dia; CMT – California Mastitis Test; CCS - Contagem de células somáticas; MC – mastite clínica.

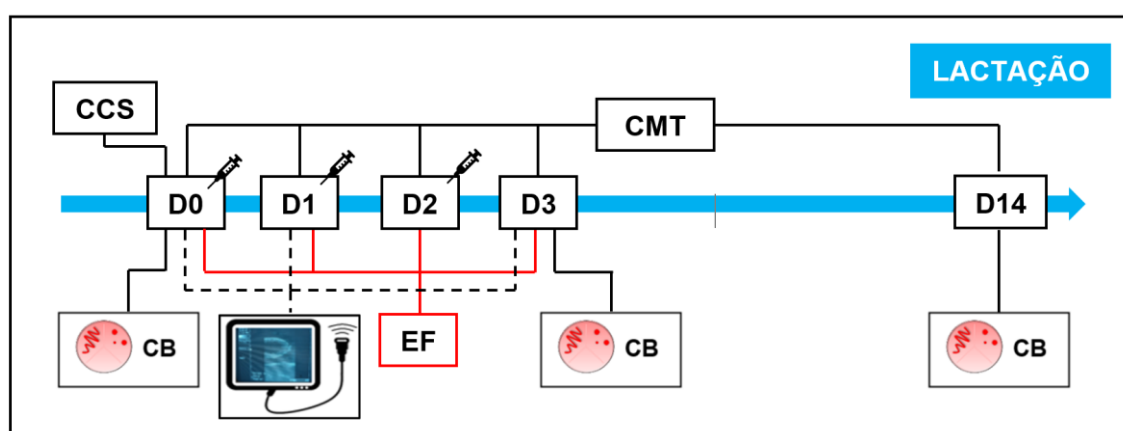
Estudo de tratamento de mastite inaparente (MAS)

No D0, todas as vacas passaram pelo CMT (CMT D0), realizado em cada quarto para identificação dos quartos possivelmente infectados (levemente positivo a fortemente positivo). O CMT repetido em todos os dias de avaliação, foi registrado a partir do D1,

para os quartos inclusos para o tratamento com o OEM (GO_{MAS}; n=14) e placebo (GP_{MAS}; n=14) e GC_{MAS} (n=36). A reação CMT de cada quarto foi registrada e classificada de acordo com Schalm e Noorlander, 1957. A CCS foi realizada pelo Laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa – APCBRH, com o retorno dos resultados via relatórios mensais mediante solicitação do produtor.

Como no SEC, para facilitar visualizar o cronograma de exames realizados, foi elaborado um esquema apresentado na figura 3.

Fig. 3. Esquema demonstrativo dos exames realizados dentro do período experimental no tratamento de mastite inaparente durante a lactação.



Legenda: D: Dia; CB: cultura bacteriológica; CMT: California Mastitis Test; CCS: Contagem de células somáticas.

Análise estatística

SEC configura um estudo experimental longitudinal prospectivo com controle positivo. MAS foi um estudo experimental cego, longitudinal prospectivo, com controle placebo e negativo. O M5 foi testado e sua eficácia foi avaliada por meio do exame físico específico, ultrassonografia e a termografia dos tetos, além, da CCS e a ocorrência de mastites, medidas durante os 100 primeiros dias de lactação. O M10, foi avaliado por meio da taxa de cura bacteriológica (TCC) com acompanhamento de eventuais reações inflamatórias, por meio do exame físico específico e US, CCS antes e após o tratamento.

Para a avaliação física, repetida por três vezes para os dois estudos, e o CMT, repetido por duas vezes no estudo de secagem, por cinco vezes no estudo de tratamento de mastite inaparente, foram utilizados os testes t de Student e Mann-Whitney,

respectivamente. As análises de ultrassonografia dos tetos foram realizadas por meio de Anova, seguida do teste de comparações múltiplas de médias de Tukey HSD, quando observado homogeneidade de variância pelo teste de Tukey e normalidade de dados pelo teste de Shapiro-Wilk.

Os valores de CCS foram transformados para log e comparados com o teste de t de Student. Para SEC, foram realizadas correlação de Pearson entre as variáveis CCS, ordem de lactação, tempo em dias do período seco, ocorrência de mastite no pós-parto e produção de leite. Os dados foram apresentados em média e desvio padrão, coeficiente de variação, mínimo e máximo. Para todas as análises foi utilizado o SPSS® 25.0 e nível de significância de 0,05.

Comitê de ética

Os experimentos foram iniciados após aprovação de pesquisa pelas comissões de ética em pesquisa no uso de animais (CEUA) da PUCPR, protocolo nº 01664 (anexo 4) e do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR), protocolo nº 02/2020 (anexo 5).

Resultados

CIM e CBM

Os testes de susceptibilidade antimicrobiana para determinação de CIM e CBM, foram realizadas para OEM puro a 5%, M5 e clorexidina a 2% (CHX). Afora os resultados para o CHX 2%, que foram iguais, sendo uma CIM e CBM de 0,1 µL/mL (0,2%), para *S. aureus* ATCC®25923™, *E. coli* ATCC®25922™ e para as cepas tipo selvagens de *S. aureus*, os resultados estão apresentados no quadro 1.

Quadro 1

Resultados para testes de susceptibilidade antimicrobiana por meio da determinação de Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) de OEM 5% e M5.

Cepas	CIM				CBM			
	OEM 5%		M5		OEM 5%		M5	
	µL/mL e % v/v							
<i>E. coli</i> ATCC®25922™	6,25	0,3125	6,25	0,3125	6,25	0,3125	25	1,25
<i>S. aureus</i> ATCC®25923™	6,25	0,3125	25	1,25	6,25	0,3125	100	5

<i>S. aureus</i> TS1	50	2,5	25	1,25	100	5	100	5
<i>S. aureus</i> TS2	50	2,25	SA	SA	50	2,25	SA	SA

Legenda: OEM 5%: Óleo essencial de melaleuca a 5%; M5: Medicamento a base de óleo essencial de melaleuca a 5%; CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima; TS1: Cepa tipo selvagem 1; TS2: cepa tipo selvagem 2; SA: Sem ação.

Exame físico específico (EF) do teto e úbere

Em SEC não foram observadas diferenças no exame físico específico das vacas entre os dias de avaliação ($P>0,05$).

Em MAS, durante o exame físico de tetos, consistência e elasticidade dos quartos avaliados, não foram observadas diferenças ($P>0,05$) nos dias de avaliação na comparação entre e intragrupos. Todavia, comparando a classificação de mastite em grau e avaliação de secreção, não foram observadas diferenças intragrupos ($P>0,05$), mas entre grupos no D3, onde foram observadas maiores ocorrências de mastite clínica (MC) de tipo catarral e grau leve de apresentação maiores para o GP_{MAS} quando comparado ao grupo GO_{MAS} ($P=0,0019$). Alguns achados importantes foram registrados durante o EF de tetos na comparação entre grupos ($P=0,2113$), como cisternite 7% para GO_{MAS}, 12% para GP_{MAS}, telite 7% para GO_{MAS}, sem ocorrências para o GP_{MAS}.

Termografia infravermelha (TRI) do teto

Os resultados obtidos pelos termogramas em três pontos de avaliação dos tetos (base, centro e ponta), realizados somente para SEC, demonstraram diferenças entre tratamentos para o teto anterior esquerdo (AE), no D1, sendo em média $32,6 \pm 1,15$ °C para o GO_{SEC} e $31,2 \pm 1,26$ °C para o GC_{SEC} ($P=0,0196$), no D7 em média $33,1 \pm 1,72$ °C para o GO_{SEC}, e $31,2 \pm 1,38$ °C para o GC_{SEC} ($P=0,0153$). A diferença entre grupos também foi detectada na comparação do teto PE no D1, revelando em média $33,1 \pm 1,43$ °C para o GO_{SEC} e $31,20 \pm 2,25$ °C para o GC_{SEC}. Os valores mencionados encontram-se na tabela 1.

Tabela 1

Avaliação termográfica de tetos para o estudo de secagem de vacas (n=80) com medidas em °C e média e desvio padrão ($\bar{X} \pm \alpha$) de três pontos de avaliação para o GO_{SEC} (n=44) e GC_{SEC} (n=36).

Tetos	TTO	Dia			P-Valor
		0	1	7	
		°C ($\bar{X} \pm \alpha$)			
$\bar{X}$ AE	GO _{SEC}	32,6 ± 2,03 ^a	32,6 ± 1,15 ^a	33,1 ± 1,72 ^a	0,7317
	GC _{SEC}	31,1 ± 1,4 ^b	31,2 ± 1,26 ^b	31,2 ± 1,38 ^b	0,9886
	P-Valor	0,0828	0,0196	0,0153	
$\bar{X}$ PE	GO _{SEC}	32,7 ± 2,20 ^a	33,1 ± 1,43 ^a	32,9 ± 2,01 ^a	0,8490
	GC _{SEC}	31,7 ± 1,87 ^b	31,0 ± 2,25 ^b	32,1 ± 1,20 ^b	0,4619
	P-Valor	0,3051	0,0199	0,2921	
$\bar{X}$ AD	GO _{SEC}	32,1 ± 1,93 ^a	32,9 ± 1,33 ^a	32,7 ± 2,17 ^a	0,6214
	GC _{SEC}	31,6 ± 2,16 ^b	30,1 ± 2,02 ^b	31,6 ± 0,96 ^b	0,1696
	P-Valor	0,5893	0,0023	0,1789	
$\bar{X}$ PD	GO _{SEC}	32,7 ± 2,22 ^a	33,2 ± 1,46 ^a	33,0 ± 2,04 ^a	0,8524
	GC _{SEC}	31,6 ± 2,17 ^b	32,1 ± 1,95 ^b	31,5 ± 1,95 ^b	0,8234
	P-Valor	0,2807	0,1633	0,1131	
Σ ($\bar{X} \pm \alpha$)	GO _{SEC}	32,5 ± 1,61 ^a	32,9 ± 1,14 ^a	32,9 ± 1,43 ^a	0,7591
	GC _{SEC}	31,5 ± 1,61 ^b	31,1 ± 1,61 ^b	31,6 ± 1,19 ^b	0,7571
	P-Valor	0,1647	0,0084	0,0410	

Legenda: TTO: tratamento; GO: grupo óleo de melaleuca; GC: grupo controle; AE: teto anterior esquerdo; PE: teto posterior esquerdo; AD: teto anterior direito; PD: teto posterior direito.
Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre as médias dos tratamentos.

Ultrassonografia de teto (US) do teto

Para SEC, após uma interrupção abrupta da lactação, não ocorreram diferenças entre os tratamentos e os dias de avaliação (tabela 2) para as médias dos valores obtidos por ultrassonografia, na comparação entre medidas para tetos anteriores (A) e posteriores (P; P>0,05).

No MAS, comparando valores de US entre as medidas avaliadas, afóra a diferença entre grupos para EPT (P=0,0075) com média para GO_{MAS} de 7,40 ± 1,57 mm e para GP_{MAS} de 6,08 ± 0,97 mm e diferença intragrupo para GO_{MAS} entre o primeiro e o terceiro dia de avaliação, com média de 6,00 ± 0,80 mm para o D0 e 7,40 ± 1,57 mm para o D3 (P=0,002). Para outras medidas anatômicas, não foram encontradas diferenças entre e intragrupos nos diferentes dias de avaliação (P>0,05) (figura 4).

Tabela 2

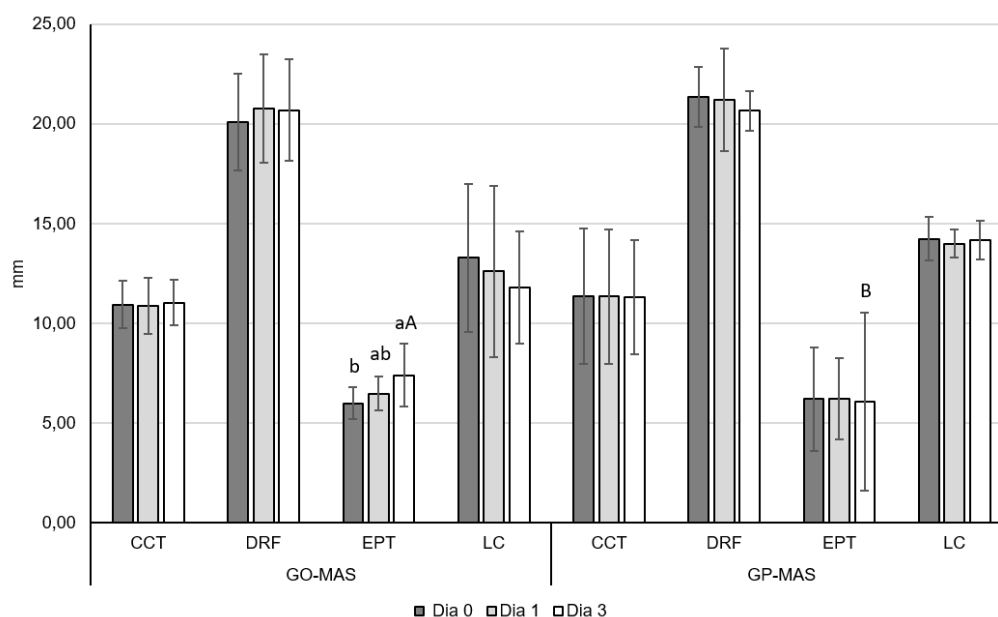
Medidas anatômicas em mm dos tetos (n= 80) de vacas Holandesas feitas por ultrassonografia apresentados em média e desvio padrão ($\bar{X} \pm \alpha$) para o GO_{SEC} (n=44) em comparação ao GC_{SEC} (n=36).

Parâmetros	Dia	0	1	7	P-valor (t)
	TTO	mm ($\bar{X} \pm \alpha$)			
CCT A	GO _{SEC}	11,0 ± 1,9	11,4 ± 1,7	10,6 ± 1,4	0,5564
	GC _{SEC}	11,3 ± 2,8	11,5 ± 2,5	11,3 ± 3,8	0,9885
	P-valor (g)	0,7465	0,9157	0,5661	
CCT P	GO _{SEC}	10,8 ± 1,8	11,2 ± 1,4	9,9 ± 1,7	0,1742
	GC _{SEC}	10,7 ± 2,5	10,2 ± 1,6	9,7 ± 1,8	0,5510
	P-valor (g)	0,8892	0,1492	0,7836	
DRF A	GO _{SEC}	21,7 ± 2,2	21,7 ± 1,7	21,1 ± 2,5	0,7898
	GC _{SEC}	20,6 ± 1,7	20,4 ± 1,6	20,5 ± 1,5	0,7318
	P-valor (g)	0,0867	0,1839	0,3353	
DRF P	GO _{SEC}	20,9 ± 1,7	21,5 ± 1,2	21,1 ± 1,7	0,6405
	GC _{SEC}	20,6 ± 1,1	20,4 ± 1,5	20,5 ± 1,7	0,9150
	P-valor (g)	0,6739	0,0717	0,4354	
EPT A	GO _{SEC}	6,33±1,6	6,55±1,7	6,08±1,3	0,4430
	GC _{SEC}	6,15±1,2	5,96±1,6	5,69±1,3	0,8505
	P-valor (g)	0,4147	0,7009	0,5393	
EPT P	GO _{SEC}	6,2±1,4	6,5±1,2	6,03±1,1	0,8560
	GC _{SEC}	6,06±0,9	6,14±0,7	5,62±0,8	0,7019
	P-valor (g)	0,5696	0,4282	0,2446	
DCT A	GO _{SEC}	13,4 ± 2,2	13,2 ± 2,2	14,2 ± 2,7	0,5725
	GC _{SEC}	12,4 ± 2,7	13,1 ± 3,2	14 ± 3,2	0,5422
	P-valor (g)	0,3767	0,9783	0,886	
DCT P	GO _{SEC}	13,6 ± 2,3	13,2 ± 2,0	14,3 ± 2,3	0,5173
	GC _{SEC}	12,5 ± 3,0	12,9 ± 2,1	14,2 ± 1,6	0,2760
	P-valor (g)	0,3444	0,7800	0,9311	

Legenda: TTO: tratamento; GO_{SEC}: grupo óleo de melaleuca; GC_{SEC}: grupo controle; AE: teto anterior esquerdo; PE: teto posterior esquerdo; AD: teto anterior direito; PD: teto posterior direito.

P-valor (t) obtido na comparação intragrupos (dias diferentes). P-valor (g) gerado na comparação entre grupos.

Fig. 4. Medidas anatômicas em mm dos tetos (n= 28) de vacas Jersey feitas por ultrassonografia apresentados em média e desvio padrão ($\bar{X} \pm \alpha$) para o GO_{MAS} (n=14) em comparação ao GP_{MAS} (n=14).



Legenda: CCT: Comprimento do canal do teto; DRF: diâmetro da Roseta de Fürstenberg; EPT: Espessura da parede do teto; DCT: diâmetro da cisterna do teto; GO_{MAS}: grupo óleo de melaleuca; GP_{MAS}: grupo placebo.

California mastitis test (CMT), contagem de células somáticas (CCS) e ocorrência de mastites

Estudo de secagem (SEC)

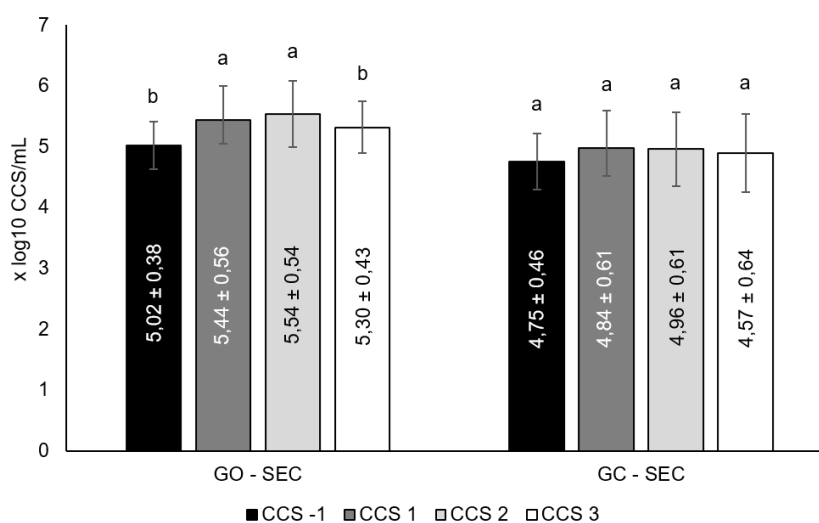
Realizado no momento da secagem (CMTs) e sete dias após o parto (CMTpp), não foram observadas diferenças na comparação intragrupos por avaliação de quartos do GO_{SEC}, quarto anterior esquerdo (QAE; P=0,1736), quarto posterior esquerdo (QPE; P=0,0898), quarto anterior direito (QAD; P=1,0) e quarto posterior direito (QPD; P=0,0890), assim como do GC_{SEC}, QAE (P=0,5862), QPE (P=0,3711), QAD (P=1,0) e QPD (P=0,3711).

O mesmo ocorreu na comparação entre grupos onde também não encontramos diferença em QAE para o CMTs (P=0,3918) e CMTpp (P=0,7898), QPE para o CMTs (P=1,0) e CMTpp (P=0,5937), QAD para o CMTs (P=1,00) e CMTpp (P=0,8960), QPD para o CMTs (P=1,0) e CMTpp (P=0,5937).

As vacas do GO_{SEC} permaneceram secas em média $52 \pm 6,15$ dias (entre 41 e 57 dias) e as vacas do GC_{SEC} por sua vez $59 \pm 5,36$ dias (entre 49 e 68 dias). Foi detectada uma correlação negativa ($r=-0,9731$) entre os dias que as vacas permaneceram secas e valores CCS do primeiro CL do pós-parto do GC_{SEC} ($P=0,0269$).

Na comparação intragrupos, o GO_{SEC} apresentou aumento da CCS no primeiro CL (CCS1; $P=0,0305$) e segundo CL (CCS2; $P=0,0097$) pós-parto, com aumento da média de CCS de $5,02 \pm 0,38 \times \log^{10}$ CCS/mL no momento da secagem (CCS-1) para $5,44 \pm 0,56 \times \log^{10}$ CCS/mL no primeiro CL e $5,54 \pm 0,54 \times \log^{10}$ CCS/mL para o segundo CL. Houve tendência de aumento significativo ($P=0,0560$) para o terceiro CL (CCS3; $5,30 \pm 0,43 \times \log^{10}$ CCS/mL). Não houve diferença na mesma comparação para o GC_{SEC} ($P>0,05$), conforme demonstra a (figura 5).

Fig. 5. Comparação de CCS ($\times \log^{10}$) intragrupo em controles leiteiros oficiais, sendo o primeiro no momento da secagem e três controles no pós-parto para o GO_{SEC} ($n=11$) e GC_{SEC} ($n=09$)



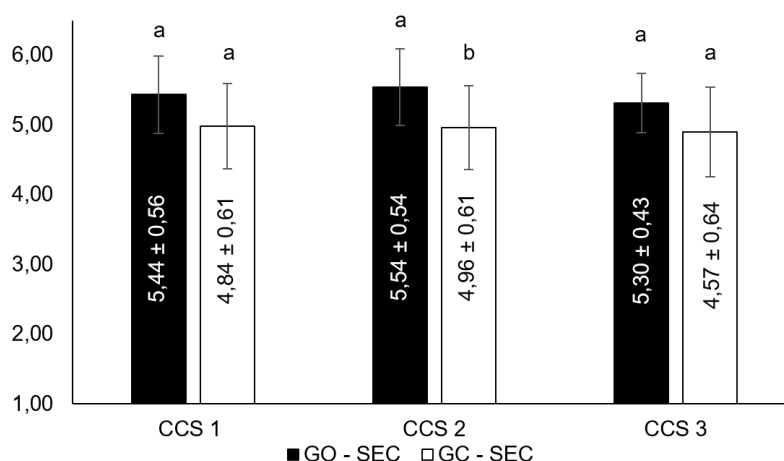
Letras diferentes em intragrupos indicam diferenças significativas. Legenda: GO_{SEC}: grupo óleo de melaleuca; GC_{SEC}: grupo controle; CCS-1: Controle leiteiro pré-secagem; CCS1: primeiro controle leiteiro pós-parto; CCS2: segundo controle leiteiro pós-parto; CCS3: terceiro controle leiteiro pós-parto.

Não foram detectadas correlações CCS com mastite clínica, PS, DEL antes da secagem ($P>0,05$).

Na comparação entre grupos foram detectadas diferenças no CL no segundo mês pós-parto, com aumento ($P=0,0210$) nos valores de $5,54 \pm 0,54 \times \log^{10}$ CCS/mL para o

GO_{SEC} e $4,96 \pm 0,61 \times \log^{10}$ CCS/mL para o GC_{SEC}. Houve uma tendência de aumento significativo para o mês 1 revelando uma média de $5,44 \pm 0,56 \times \log^{10}$ CCS/mL, para o GO_{SEC} e $4,84 \pm 0,61 \times \log^{10}$ CCS/mL para o GC_{SEC} ($P=0,0547$), e para o mês 3 com média de $5,30 \pm 0,43 \times \log^{10}$ CCS/mL para o GO_{SEC} e $4,57 \pm 0,64 \times \log^{10}$ CCS/mL para o GC_{SEC} ($P=0,0578$) (figura 6).

Fig. 6. Comparação de CCS ($\times \log^{10}$) em três controles leiteiros oficiais no pós-parto para GO (n=11) em comparação ao GC_{SEC} (n=09).



Letras diferentes em intragrupos indicam diferenças significativas. Legenda: GO_{SEC}: grupo óleo de melaleuca; GC_{SEC}: grupo controle; CCS1: primeiro controle leiteiro pós-parto; CCS2: segundo controle leiteiro pós-parto; CCS3: terceiro controle leiteiro pós-parto.

Em relação a ocorrência de mastite clínica avaliadas até os 100 DEL não foram observadas diferenças na comparação entre grupos de maneira geral ($P=0,1337$), assim como na comparação aos tetos tanto no GO_{SEC} e GC_{SEC} ($P>0,05$).

Estudo de tratamento de mastite inaparente (MAS)

O histórico de CCS até o momento do início do tratamento revelou 78% das vacas do GO_{MAS} com características de uma mastite inaparente crônica. No GP_{MAS} e no GC_{MAS} foram respectivamente 70% e 11% das vacas. Antes do início do estudo os valores de CCS do GO_{MAS} com $5,49 \pm 0,46 \times \log^{10}$ CCS/mL, foram menores ($P=0,0141$), que os do GP_{MAS}, com $5,74 \pm 0,54 \times \log^{10}$ CCS/mL. Ambos os grupos GO_{MAS} e GP_{MAS}, apresentavam valores maiores que o GC_{MAS} ($P<0,0001$), que apresentou em média $4,93 \pm 0,63 \times \log^{10}$ CCS/mL.

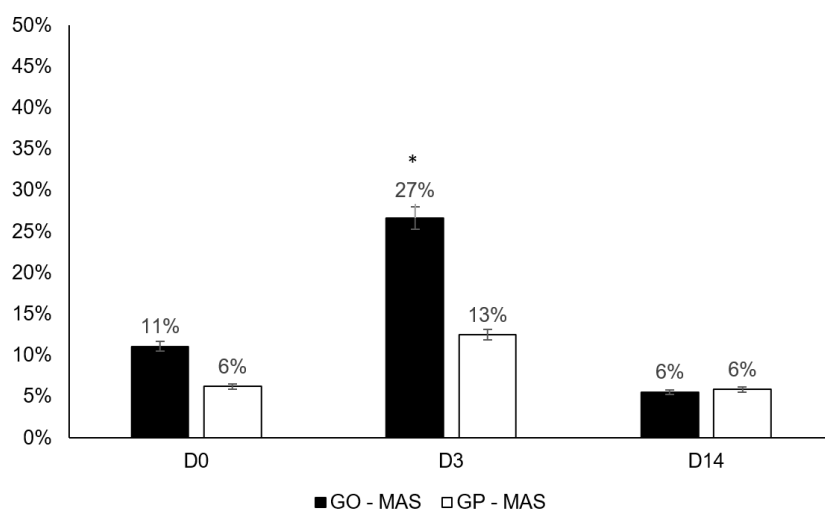
Foram observadas diminuição ($P<0,05$) dos valores de CMT para ambos os grupos no decorrer do período de observação (D0, D1, D2, D3 e D14). Para o GO_{MAS} observou-se diferenças nos valores de mediana com diminuição de CMT, de entre fortemente positivo e positivo, nos quatro primeiros dias de avaliação (D0 ao D3) para entre levemente positivo e positivo no D14 ($P=0,0022$). Para o GP_{MAS}, os valores de CMT não diminuíram entre os dias do tratamento (D0 a D2), mas diminuíram ($P<0,001$) na comparação entre o D3 (fortemente positivo) e D14 (levemente positivo). Essa mesma diferença não foi notada na comparação entre D2 e o D14 ($P=0,3616$).

Cultura bacteriológica

Os valores cultura bacteriológica expressos em porcentagem, realizada antes do início do tratamento (D0), 24 horas após o fim do tratamento (D3) e após 14 dias do fim do tratamento (D14), estão representados na figura 7. Notam-se semelhanças ($P>0,05$) dos resultados entre grupos e durante os dias de avaliação.

Entre os dois grupos de avaliação (GO_{MAS} e GP_{MAS}), a cepa bacteriana mais observada nos três dias de avaliação, foi *Staphylococcus aureus* com valor médio de 30% (13/43), para o GO_{MAS} e 22% (10/45) para o GP_{MAS} (tabela 3). Nota-se aumento ($P=0,0338$) no valor de GO_{SEC} (27%) no D3 em comparação ao GP_{MAS} (13%).

Fig. 7. Proporção (%) de cultura bacteriológica negativa nos três dias de avaliação para o GO_{MAS} (n=14) e GP_{MAS} (n=14).



Legenda: D: dia; GO: grupo óleo de melaleuca; GP: grupo placebo. *Diferença significativa entre grupos no D3.

Tabela 3

Quantidade e distribuição de patógenos causadores de mastite em 88 amostras positivas colhidas para o GO_{MAS} e GP_{MAS} (cultura microbiológica).

Resultado bacteriológico	GO _{MAS}		GP _{MAS}	
	n=43	Porcentagem (%)	n=45	Porcentagem (%)
<i>S. aureus</i>	13	30%	10	22%
<i>E. coli</i>	9	21%	5	11%
<i>Staphylococcus</i> sp.	7	16%	8	18%
<i>Bacillus</i> sp.	3	7%	6	13%
<i>Klebsiella</i> sp.	3	7%	2	4%
<i>S. dysgalactiae</i>	3	7%	1	2%
<i>S. agalactiae</i>	2	5%	5	11%
<i>Streptococcus uberis</i>	1	2%	6	13%
<i>Enterococcus</i> sp.	1	2%	0	0%
<i>Serratia</i> sp.	1	2%	0	0%
<i>Corynebacterium</i> sp.	0	0%	2	4%

Produção de leite

Estudo de secagem (SEC)

O GO_{SEC} ($48,81 \pm 9,11$ kg/dia) obteve uma produção de leite maior ($P=0,0053$) que o GC_{SEC} ($41,42 \pm 6,80$ kg/dia) nos 100 primeiros DEL.

Não foram encontradas correlações da ordem de lactação, tempo em dias do período seco e ocorrência de mastite no pós-parto sobre a produção de leite em nenhum dos grupos experimentais ($P>0,05$).

Estudo de tratamento de mastite inaparente (MAS)

Durante os dias de tratamento (D0 ao D14), o GO_{MAS} ($22,49 \pm 1,10$ kg de leite) e GC_{MAS} ($23,12 \pm 1,13$ kg de leite) foram semelhantes na produção de leite ($P=0,0818$). Entretanto, ambos os grupos produziram mais leite ($P<0,0001$) na comparação com o GP_{MAS} ($19,05 \pm 0,79$ kg de leite). Não houve diferença na comparação entre e intragrupos para a temperatura do leite ($P>0,05$).

Discussão

O uso de antibiótico intramamário tem como objetivo promover um ambiente hostil as bactérias (Bertulat et al. 2015). Todavia, a busca pela diminuição do uso de antimicrobianos sintéticos, abre espaço para a utilização de substâncias alternativas. Para o OEM possuir ação antimicrobiana, segundo a *International Organization for Standardisation*, ele deve possuir em sua composição uma quantidade acima de 30% de terpinen-4-ol (IOS, 2004). Segundo Carson et al. (2006), este componente é o principal responsável pela ação antimicrobiana do óleo essencial.

O efeito sobre as bactérias ocorre em decorrência a danos a membrana microbiana, com aumento de susceptibilidade a NaCl, formação de mesossomos e perda do material citoplasmático (Carson et al. 2002; Li et al. 2016). Além disso, Cox et al. (2000), trabalhando com *S. aureus* e *E. coli*, mostraram que o OEM induz perda de íons de potássio, inibe a respiração celular da bactéria e promove a captação de iodeto de propídio.

A concentração do OEM experimental com 41% de terpinen-4-ol é maior ao encontrado no estudo de Li et al. (2016), que atribuíram a atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* e *Candida albicans* aos 23% de terpinen-4-ol usados. Portanto, esperava-se obter uma ação antimicrobiana suficiente.

Como para os antibióticos sintéticos, pode-se exercer uma seleção sobre a microbiota dos animais a serem submetidos ao uso de OEM, uma vez que foram relatados casos de resistência antimicrobiana ao OEM (Singh et al. 2016). Para Vilar et al. (2018) a seleção para TVS, pode ser realizada, baseado no histórico de MC, no CMT no momento da secagem e no pós-parto, como realizado no SEC. Para o MAS, além dessas características, é indicada preferencialmente a identificação do agente bacteriano (Scott Wesse et al. 2013, Krömker et al. 2019).

Para Vasquez et al. 2017, os valores de CCS individual podem indicar a presença de uma infecção intramamária, quando os valores ultrapassam 200.000 células/mL, e o CMT pode ser utilizado como um teste rápido para identificação dos quartos afetados (Godden et al. 2017). Segundo a IN-76 do MAPA (2018) valores de CCS até 400.000 CCS/mL, como utilizado como ponto de corte para o estudo de SEC, seriam aceitáveis para o consumo humano (IN-76, MAPA). Todavia, entende-se que a medida que se ultrapassa os valores considerado um limiar saudável de 200.000 CCS/mL, aumentam-se

as chances da glândula estar infectada (Vasquez et al. 2017; Krömker et al. 2019), o que corrobora com os resultados de cultura bacteriológica do estudo de tratamento. Esse aspecto apresenta influência no sucesso do tratamento de mastite (Krömker et al. 2019) e a proteção no período seco (Vasquez et al. 2017).

O manejo correto no momento da secagem influencia positivamente a saúde do úbere com menor ocorrência de mastite e maximização da produção na próxima lactação (Hertl et al. 2018). As vacas permaneceram entre 41 e 68 dias em descanso, considerado suficiente para uma recuperação geral do úbere, com substituição das células alveolares e preparação para a lactação subsequente (Laven et al. 2014).

O aumento da CCS observado no GO_{SEC} comparado ao GC_{SEC} nos 100 DEL pode ser decorrente de uma ação menos prolongada residual do OEM em comparação aos antibióticos sintéticos, possivelmente permitindo um início de colonização bacteriana, o que explicaria as taxas de novas infecções de até 35 % observadas por Mullen et al. (2014), que avaliaram dois fitoterápicos intramamários também com ingredientes ativos de óleos essenciais. Os óleos essenciais usados nestes produtos do mercado norte-americano não foram capazes de garantir um ambiente hostil às bactérias duradouro, permitindo a eclosão de uma infecção logo na lactação seguinte. Possivelmente uma manipulação farmacológica, inserindo o OEM em um veículo de liberação lenta poderia transpor essas limitações.

Ao desafiarmos a ação do OEM em uma situação de grande contaminação microbiana, com infecções crônicas instaladas no ambiente intramamário, como no MAS, verificou-se uma ação momentânea, durante o período de tratamento, sobre os índices semiquantitativos como o CMT, sendo observado um efeito residual do OEM e portanto uma diminuição significativa dos resultados na cultura bacteriana no D3. Porém os efeitos da melhora na condição intramamária avaliados pelo CMT foram refletidos igualmente por uma maior produção leiteira do grupo com OEM. A relação direta entre uma diminuição na quantidade de células somáticas ou no CMT e um aumento de produção de leite é conhecido desde longa data (Forster et al. 1967; Casura et al. 1995; Berry; Hillerton, 2002; Dohoo et al. 2011; Godden et al. 2017; Franzoi et al. 2020).

Vacas infectadas de maneira inaparente, apresentam assim mesmo reflexos na saúde e no bem-estar, notado principalmente pela diminuição da produção

(Aghamohammadi et al., 2018). Estas infecções crônicas com alto CCS podem ser atribuídas principalmente aos patógenos considerados mais contagiosos como o *S. aureus* e o *S. agalactiae*, encontrados na cultura bacteriológica (Mesquita et al. 2019; Keefe et al. 2012).

Justamente a bactéria mais isolada foi o *S. aureus*, à semelhança de pesquisas realizadas tanto no Brasil (Mesquita et al., 2019) quanto na Alemanha (Krömker et al. 2019). Além do *S. aureus* que por meio da produção de toxinas e enzimas proteolíticas podem danificar irreversivelmente o tecido mamário (Vasudevan et al. 2003), a presença de crescimento em cultura de *S. agalactiae*, explica a alta CCS, e o aparecimento de sinais como cisternite e galactoflorite, uma vez que este agente é considerado altamente contagioso e um patógeno obrigatório do úbere (Keefe et al. 2012).

Para confirmação da capacidade antimicrobiana do OEM, os valores de CIM e CBM para as bactérias *S. aureus* e *E. coli* obtidos neste estudo, foram iguais (0,3125% v/v ou 6,25µL/mL). Testando cepas semelhantes, Cox et al. (2000), revelaram valores de CIM e MBC para *S. aureus* NCTC8325 e *E. coli* AG100 de 0,25% v/v e 0,5% v/v, respectivamente, indicando *in vitro* potencial antimicrobiano do OEM.

Todavia, o perfil crônico de mastite inaparente dos animais e o perfil patogênico das bactérias prevalente no rebanho, como o encontrado no estudo de MAS, influencia na eficácia da terapia intramamária e possibilitam a ocorrência de mastite clínica (Tomazi et al. 2015). Para Nagahata et al. 2020, as vacas infectadas com *S. aureus* cronicamente respondem muito pouco a tratamento, revelando baixas taxas de cura bacteriológica, o que pode explicar a ineficácia do tratamento intramamário com o OEM nesse estudo.

Semelhantemente aos resultados de campo, casos de ineficácia da ação bactericida, como ocorrido frente a bactéria selvagem tipo 2 na avaliação de MBC, pode ser explicado pela falha em lise celular da membrana das bactérias (Carson et al. 2002), que pode ser potencializado pela capacidade de produção de biofilmes para cepas de *S. aureus*, ou ainda por eventos de resistência antimicrobiana, relatado também para OEM para diferentes tipos de bactérias (Singh et al. 2016). Esses resultados justificam a ação momentânea (bacteriostática) no D3 que aumentou na cultura bacteriológica do D14.

O protocolo escolhido no estudo de tratamento, com três aplicações com intervalos de 24 horas durante 3 dias, mostrou-se portanto ineficaz para a taxa de cura

bacteriológica. Todavia, como houve diminuição dos valores de CMT para o D14, uma diminuição no intervalo de aplicações e um aumento nos dias de tratamento, assim como realizado por Pasca et al. (2020), que sugeriram boa eficácia utilizando extrato de própolis duas vezes ao dia durante cinco dias para tratamento de vacas com mastite por bactérias gram-positivas, poderiam revelar melhora dos resultados.

Para Scott Wesse et al. (2013), os antibióticos sintéticos devem ser utilizados por períodos mínimos, porém para casos de patógenos específicos como *S. aureus* e *S. uberis*, como encontrado neste estudo, indica-se o tratamento mais prolongado.

As mastites clínicas observadas no GO_{MAS} e no GP_{MAS}, porém em maior número no GP_{MAS}, podem ser explicadas também pelo isolamento de agentes microbianos contaminantes do ambiente destas vacas, como *E. coli* e *Staphylococcus* não aureus (ENA; *Staphylococcus* sp.). Apesar da *E. coli*, ser responsável por muitos casos de mastite severa, o status de defesa do hospedeiro atua como um fator fundamental na determinação do resultado das infecções, podendo-se atribuir a está bactéria o aparecimento de sinais clínicos observados em D1 e D3 (Burvenich et al. 2003), aqui classificados como mastite catarral (Grunert, 1993), também observados pela ultrassonografia.

Para Kaur et al. (2018), as alterações anatômicas indicam diretamente o comprometimento da saúde do úbere, sendo que modificações na cisterna do teto, com espessamento da mucosa e musculatura do teto, são sinais relevantes de inflamação (Franz et al. 2009). Apesar das vacas do estudo MAS apresentarem cronicamente infectadas, explicando sinais de inflamação, o espessamento da parede do teto para o GO_{MAS} no estudo de MAS, pode indicar uma inflamação aguda.

Corroborando com os achados de ultrassonografia, a termografia do estudo de SEC, revelou uma elevação da temperatura (em °C) no D1 e D7 na comparação entre grupos, que poderiam indicar uma inflamação. Não foram encontrados relatos de monitoramento termográfico após aplicação de algum produto intramamário. Contudo, algumas investigações com a influência da ação das teteiras em vacas lactantes, demonstram que na avaliação pré ordenha, a média da temperatura da superfície da pele dos tetos, variam entre $35,8 \pm 0,87$ °C (entre 32,8 °C e 37,6 °C) para tetos AE e PE e $35,8 \pm 0,93$ °C (entre 32,16 °C a 38,1 °C) para tetos AD e PD (Yang et al. 2018), valores superiores aos detectados para o GO_{SEC} do estudo de SEC.

Resultados semelhantes ao estudo de Yang et al. (2018) foram relatados na avaliação pré-ordenha por Paulrud et al. 2005 e Tangora et al. 2019, em tetos sem sofrer estresse pelas teteiras, ou qualquer tipo de manipulação, similar ao realizado nesta pesquisa, com registros de termografia antes da ordenha no D0, e sem manipulação para os dias 1 e 7 de avaliação pós secagem.

Avaliando tetos por meio de ultrassonografia Power Doppler, Wieland et al. (2017), associou o estágio de lactação à intensidade da perfusão sanguínea do teto, de modo que os animais em meio de lactação apresentaram maior circulação sanguínea em comparação com as vacas em fim de lactação. Esses resultados podem explicar a diferença dos valores médios de temperatura das vacas avaliadas em nosso estudo pré-ordenha em comparação ao estudo de Yang et al. (2018), e demonstram que a técnica Power Doppler poderia nos auxiliar a encontrar explicações na diferença observada entre grupos nesta pesquisa.

Apesar dos resultados de termografia apresentarem valores semelhantes aos estudos citados anteriormente, as alterações ultrassonográficas, como cisternite e telite sugerem a presença de inflamação após a aplicação do M10 no estudo de MAS, o que corrobora com os resultados encontrados por Macedo et al. (2006) que relatou reações alérgicas do OEM em contato com mucosa oral em seres humanos.

Estudos com OEM para uso em bovinos e em especial na saúde do úbere são raros. Todavia, um produto contendo óleo de melaleuca e outros fitoterápicos, foi testado para a proteção de vacas no período seco (Pinedo et al. 2013; Mullen et al 2014). Semelhante a outros estudos com produtos usando outros extratos vegetais e OEM (Mc Phee et al. 2011; Pinedo et al. 2013; Mullen et al. 2014; Mason et al. 2018), não foram identificadas reações adversas graves, apesar de um indicativo inflamatório que foi verificado pelo uso de exames complementares como ultrassonografia realizada no estudo de SEC e MAS, e, termografia de tetos realizado no estudo de SEC.

Enquanto antibióticos para o período seco, possuem segundo fichas técnicas um tempo de permanência de até 54 dias para cefalônio anidro 0,25g (Cepravin®) e 30 dias para sulfato de neomicina 400mg, bacitracina 5.000 UI (Neomastic®) no ambiente do úbere, desconhece-se o tempo de permanência e ação do OEM neste mesmo ambiente.

Possivelmente, a manipulação farmacológica aumentando o tempo de ação ou combinando sistemas de liberação lenta, microencapsulamento (Pazinato et al. 2014) ou em microemulsão (Biju et al. 2005), poderiam contribuir para a melhoria da ação protetora do OEM. Além disso, é provável que volumes e concentrações maiores poderiam também melhorar nossos resultados, tanto para o tratamento de vacas infectadas, como para a proteção de vacas no período seco, no que se diz respeito aos valores de CCS.

Conclusões

Conclui-se que o medicamento a base de OEM pode ser usado na formulação intramamária. O medicamento mostrou-se eficaz para proteção do úbere de vacas no período seco. No tratamento da mastite crônica inaparente, seu uso melhora a produção de leite mas é incapaz de promover uma cura clínica ou microbiológica com o protocolo terapêutico usado, apesar de demonstrar potencial antimicrobiano inclusive com cepas isoladas de casos de mastite. Pioneiro o medicamento oriundo deste estudo, possui potencial para se tornar uma alternativa ao uso de antibióticos sintéticos sem causar efeitos adversos.

Declaração de conflito de interesse

Nenhum dos autores tem relações financeiras ou pessoais que possam influenciar ou distorcer de forma inadequada o conteúdo do artigo.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da empresa Dexter Latina, pelo apoio na preparação dos produtos experimentais. Ao Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, pela oportunidade de pesquisa na instituição. A CAPES – Fundação Araucária pela disponibilidade de bolsa de auxílio para o primeiro autor da pesquisa.

Referências

- Aghamohammadi, M., Haine, D., Kelton, D.F., Barkema, H.W., Hogeveen, H., Keefe, G.P., Dofour., 2018 Herd-level mastitis-Associated Costs on Canadian Dairy Farms. *Frontier. Veterinary. Science* 14.
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., Beiboer, M.L., Wilmink, H., Benedictus, G., Brand, A., 1998. Incidence of Clinical Mastitis in Dairy Herds Grouped in Three Categories by Bulk Milk Somatic Cell Counts. *Journal Dairy Science* 81, 411–419.
- Bertulat, S., Fischer-Tenhagen, C., Heuwieser, W., 2015. A survey of drying-off practices on commercial dairy farms in northern Germany and a comparison to science-based recommendations. *The Veterinary. Record* 2, e000068.
- Biggs, A., Barrett, D., Reyher, K., Bradley, A., Green, M., Zadoks, R., 2016. Routine antibiotic dry cow therapy. Where next? *The Vet. Record*, 178, 174.
- Biju, S.S., Alka, A., Khar, R.K. 2005. Tea Tree Oil concentration in follicular casts after topical delivery: determination by high-performance thin layer chromatography using a perfused bovine udder model. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94, 240–245.
- Boito, J.P., Santos, R.C., Vaucher, R.A., Raffin, R., Machado, G., Tonnin, A.A., Da Silva A. Evaluation of tea tree oil for controlling *Rhipicephalus microplus* in dairy cows. 2016. *Veterinary Parasitology* 225, 70–72.
- Bradley, A.J., Breen, J.E., Payne, B., Green, M.J.A. 2011. Comparison of broad-spectrum and narrow-spectrum dry cow therapy used alone and in combination with a teat sealant. *Journal of Dairy Science* 94, 692–704.
- Buldain, D., Buchamer, A.V., Marchetti, M.L., Aliverti, A.B., Mestorino N. Combination of Cloxacillin and Essential Oil of *Melaleuca armillaris* as an alternative against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers Veterinary Science* 5, 177.
- Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., 2003. Severity of *Escherichia coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research* 34, 521–64.
- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother* 48, 1914–1920.

- Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V., 2006 *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 50–62.
- Casura, C., Schukken, Y.H., Rüschi, P., 1995. Quality assessment of California mastitis test as a diagnostic tool in quarter somatic cell count estimation. *Proc. IDF Int. Mastitis Seminar, Tel Aviv*, 3.57-3.58.
- Church, J.S., Hegadoren, P.R., Paetkau, M.J., Miller, C.C., Regev-Shoshani, G., Schaefer A.L., Schwartzkopf-Genswein, K.S., 2012. Influence of environmental factors on infrared eye temperature measurements in cattle. *Research in Veterinary Science* 96, 220–226.
- CLSI – 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. 32:2
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal Applied Microbiology* 88, 170–175.
- Dohoo, I., Andersen, S., Dingwell, R., Hand, K., Kelton, D., Leslie, K., Schukken, Y., Godden, S., 2011. Diagnosing intramammary infections: Comparison of multiple versus single quarter milk samples for the identification of intramammary infections in lactating dairy cows. *Journal Dairy Science*. 94, 5515-5522.
- Enioutina, E.Y., Teng, L., Fateeva, T.V., Brown, J.C.S., Job, K.M., Bortnikova, V.V., Krepkova, L.V., Gubarev, M.I., Sherwin, M.T., 2019. Phytotherapy as an alternative to conventional antimicrobials: combating microbial resistance. *Expert Rev Clin Pharmacol* 10, 1203-1214.
- FAO. 2019 – Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/water-buffaloes/en/> Acesso em 05 de agosto de 2019.
- Franz, S., Floek, M., Hofmann-Parisot, M., 2009. Ultrasonography of the Bovine Udder and Teat. *Veterinary Clinical Food Animal*. 25: 669–685
- Franzoi, M., Manuelian, C.L., Penasa, M., De Marchi, M., 2020. Effects of somatic cell score on milk yield and mid-infrared predicted composition and technological traits of Brown Swiss, Holstein Friesian, and Simmental cattle breeds 103, 791-804.

- Forster, T.L., Ashworth, U.S., Luedeck, L.O., 1967. Relationship between California Mastitis test reaction and production and composition of milk from opposite quarters 50, 675–82.
- Godden, S.M., Royster, E., Timmerman, J., Rapnicki, P., Green, H., 2017. Evaluation of an automated milk leukocyte differential test and the California Mastitis Test for detecting intramammary infection in early- and late-lactation quarters and cows. *Journal Dairy Science*. 100:6527–6544.
- Gomes, F., Henriques, M., 2016. Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology*. 72,4, 377–382.
- Gonçalves, J.L., Cue, R.I., Botaro, B.G., Horst, J.A., Valloto, A.A., Santos, M.V., 2018. Milk losses associated with somatic cell counts by parity and stage of lactation. *Journal Dairy Science*, 101:1–10.
- Grando, T.H., Baldissera, M.D., Gressler, L.T., de Sá, M.F., Bortoluzzi, B., Schafer, A.S., Ebling, R.C., Raffin, R.P., Santos, R.C.V., Stefani, L.M., Vaucher, R., Leal, M.R.L., Monteiro, S.G., 2016. *Melaleuca alternifolia* anthelmintic activity in gerbils experimentally infected by *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology* , 190.
- Grando, T.H., de Sá, M.F., Baldissera, M.D., Oliveira, C.B., de Souza, M.E., Raffin, R.P., Santos, R.C.V., Domingues, R., Minho, A.P., Leal, M.L.R., Monteiro, S.G., 2016. In vitro activity of essential oils of free and nanostructured *Melaleuca alternifolia* and of terpinen-4-ol on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. *Journal of Helminthology* 90, 377–382.
- Grunert, E. 1993. Sistema genital feminino. In: Grunert G. Exame clínico dos bovinos. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 3, 299-309.
- Hertl, J.A., Schukken, Y.H., Tauer, L.W., Welcome, F.L., Gröhn, Y.T., 2018. Does clinical mastitis in the first 100 days of lactation predict increased mastitis occurrence and shorter herd life in dairy cows? *Journal Dairy Science*. 101, 2309–2323.
- Hogeveen, H., Huijps, K., Lam, T.J., 2011; Economic aspects of mastitis: new developments. *New Zealand Veterinary Journal*. 59, 16–23.

- IN nº76. 2018. Instrução normativa nº76. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076. Acesso em: 10 de fevereiro de 2021.
- International Organization for Standardisation. 2004. ISO 4730:2004. Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (tea tree oil). International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- Japheth, K.P., Mehla, R.K., Singh, M., Gupta, A.K., Das Ramendra A., Bharti, P., Chandrasekar, T., 2016. Optimization of dry period in Karan Fries cow. Veterinary world 9, 648-52.
- Javale, P., Sabnis, S., 2010. Antimicrobial properties and phytochemical analysis of *Phyllanthus emblica*, Asian. J. Experimental Biology Science 3, 91–95.
- Kaur, G., Bansal, B.K., Singh, R.S., Kashyap, N., Sharma, S., 2018. Associations of teat morphometric parameters and subclinical mastitis in riverine buffaloes. Journal of Dairy Research 85, 303–308.
- Keefe, G., 2012. Update control *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of Mastitis. Vet. Clinically North American Production 28, 203-216.
- Khan, A., Ahmedb, T., Rizwanc, M., Khanc, N., 2018. Comparative therapeutic efficacy of *Phyllanthus emblica* (Amla) fruit extract and procaine penicillin in the treatment of subclinical mastitis in dairy buffaloes. Microbial Pathogenesis. 115, 8–11.
- Kiesner, K., Wente, N., Volling, O., Krömker, V., 2016. Selection of cows for treatment at dry-off on organic dairy farms. Journal of Dairy Research 83, 468–475.
- Krömker, V., Grabowski, N.T., Friedrich, J., 2014 New infection rate of bovine mammary glands after application of an internal teat seal at dry-off. Journal of Dairy Research 81, 54–58.
- Krömker, V., Wente, N., Zhang, Y., Bolte, J., Renner, R., Schmenger, A., Titze, I., Wallis, J., Mayer, P., Klocke, D., 2019. Comparison of a non-antibiotic treatment with an antibiotic treatment of chronic mastitis. Milk Science International 72, 34-38.

- Laven, R.A., Balcomb, C.C., Tulley, W.T., Lawrence, K, E., 2014. Effect of dry period length on the effect of an intramammary teat sealant on the risk of mastitis in cattle treated with antibiotics at drying off. *New Zealand Veterinary Journal* 62, 214–220.
- Li, Wen-Ru, Li, Hai-Ling, Shi, Qing-Shan, Sun, Ting-Li, Xie, Xiao-Bao, Song, B, Huang Xiao-Mo., 2016. The dynamics and mechanism of the antimicrobial activity of tea tree oil against bacteria and fungi. *Applied Microbiology Biotechnology* 100, 8865–8875.
- Macedo, D.R.V., Mendes, A., Moraes, A.U., Thiele, M.M.C., Rosa, R.T., Rosa, E.A.R., 2006. Concentração inibitória mínima e concentração candidicida mínima de *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil) para cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite proteica. *Estudos de biologia* 28, 95-100.
- Marcolongo, M., Moorehead, C., Prudnikova, K., 2019. The regulatory effects of proteoglycans on collagen fibrillogenesis and morphology investigated using biomimetic proteoglycans. *Journal of Structural Biology* 206, 204–215.
- Martin, L.M., Stöcker, C., Sauerwein, H., Büscher, W., Müller, U., 2018. Evaluation of inner teat morphology by using high-resolution ultrasound: Changes due to milking and establishment of measurement traits of the distal teat canal. *Journal. Dairy Science* 101, 1–12.
- Mason, S.E., Mullen, K.A.E., Washburn, S.P., Anderson, K.L., Baynes, R.E., 2018. Comparison of the pharmacokinetics of plantbased treatments in milk and plasma of USDA organic dairy cattle with and without mastitis. *Food Additives & Contaminants*.
- McPhee, C.S., Anderson, K.L., Yeatts, J.L., Mason, S.E., Barlow, B.M., Baynes, R.E., 2011. Hot topic: Milk and plasma disposition of thymol following intramammary administration of a phytoceutical mastitis treatment. *Journal Dairy Science* 94, 1738–1743.
- Mesquita, A.A., Rocha, C.M.B.M., Bruhn, F.R.P., Custódio, D.A.C., Braz, M.S., Pinto, S.M., Silva, M.P., Silva, D.B., Costa, G.M., 2019. *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*: prevalência, resistência aos antimicrobianos e suas relações com a qualidade do leite em rebanhos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 39, 5.

- Mullen, K.A.E., Anderson, K.L., Washburn, S.P., 2014. Effect of 2 herbal intramammary products on milk quantity and quality compared with conventional and no dry cow therapy. *Journal Dairy Science* 97, 3509–3522.
- Mulon, P.Y., 2016. Surgical Management of the Teat and the Udder. *Veterinary Clinical Food Animal* 32, 813–832.
- Nagahata, H., Mukai, T., Natsume, Y., Okuda, M., Ando, T., Hisaeda, K., Gondaira, S., Higuchi., 2020. Effects of intramammary infusion of *Bifidobacterium breve* on mastitis pathogens and somatic cell response in quarters from dairy cows with chronic subclinical mastitis. *Animal Science Journal* 91, e13406.
- Odorcic, M., Blau, U., L., Bruckmaier, R.M., 2020. Short communication: Teat wall diameter and teat tissue thickness in dairy cows are affected by intramammary pressure and by the mechanical forces of machine milking. *Journal Dairy Science* 103, 884–889.
- Oliveira, C.S.F., Hogeveen, H., Botelho, A.M., Maia, P.V., Coelho, S.G., Haddad, J.P.A., 2015. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle 121, 297-305.
- Ozenc, E., Bozkurt, M.F., Yazici, E., Seker, E., Bayraktaroglu, A.G., Ozcinar, U., Dogan N., 2020. Teat characteristics in relation to animal temperament during milking in buffaloes, and comparison of buffalo and cow teat morphology. *Reproduction Domestic Animal* 55, 559–566.
- Pasca, C., Mărghițaș, L.A., Dezmiorean, D.S., Matei, I.A., Bonta, V., Pasca, I., Chirilă, F., Cîmpean, A., Losif, N., 2020. Efficacy of natural formulations in bovine mastitis pathology: alternative solution to antibiotic treatment. *Journal Veterinary Research*. 64, 523-529.
- Paulrud, C.O., Clausen, S., Andersen, P.E., Rasmussen, M.D., 2005. Infrared thermography and ultrasonography to indirectly monitor the influence of liner type and overmilking on teat tissue recovery. *Acta Veterinaria Scandinavica* 46, 137–147.
- Pazinato, R., Klauck, V., Volpato, A., Tonin, A.A., Santos, R.C., de Souza, M.E., Vaucher, R.A., Raffin, R., Gomes, P., Felippi, C.C., Stefani, L.M., Da Silva, A.S.,

2014. Influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Experimental Applied Acarology*. 63, 77–83.
- Pol, M., Ruegg, P.L., 2007. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *Journal Dairy Science* 90, 249–61.
- Pinedo, P., Karreman, H., Bothe, H., Velez, J., Risco, C., 2013. Efficacy of a botanical preparation for the intramammary treatment of clinical mastitis on an organic dairy farm. *Canadian Veterinary Journal* 54, 479–484.
- Roboisson, D., Ferchiou, A., Pinior, B., Gautier, T., Sa, P., Lhermie, G., 2020. The use of Meta-analysis for the Measurement of Animal Disease Burden: Losses Due to Clinical Mastitis as an Example. *Frontier Veterinary Science* 18, 149.
- Sá Silva, C., Figueiredo, H.M., Stamford, T.L.M., Silva, L.H.M., 2019. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil in ground beef. *International Journal of Food Microbiology* 293, 79–86.
- Sakkas, H., Papadopoulou, C., 2017. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *Journal Microbiology Biotechnology* 27, 429–438.
- Sanford, C.J., Keefe, G.P., Sanchez, J., Dingwell, R.T., Barkema, H.W., Leslie, K.E., Dohoo, I.R., 2006. Test characteristics from latent-class models of the *California Mastitis Test*. *Preventive Veterinary Medicine* 77, 96–108.
- Santos, S.K., Oliveira, M.G., Noriler, E.P., Vrisman, D.P., Borges, L.P.B., Santos, V.J.C., Coutinho, L.N., Teixeira, P.P.M., 2016. Mammary Gland Ultrasound Evaluation of Jersey Cattle Breed. *Acta Scientiae Veterinariae* 44, 1410.
- Sathiyabarathi, M., Jeyakumar, S., Manimaran, A., Jayaprakash, G., Pushpadass, A.H., Sivaram, M., Ramesha, K.P., Das, D.N., Kataktalware, M.A., Arul Prakash, M. Kumar, R.D., 2016. Infrared thermography: A potential noninvasive tool to monitor udder health status in dairy cows. *Veterinary World* 6, 1075-1081.
- Schalm, O.W., Noorlander, D.O., 1957. Experiments and Observations Leading to Development of the California Mastitis Test. *Journal American Veterinary Association* 130, 199.
- Scott Wesse, J., Page, S.W., Prescott, J.F., 2013. Antimicrobial stewardship in Animals. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*.

- Sharma, N., Rho, G.J., Hong, Y.H., Kang, T.Y., Lee, H.K., Hur, T.Y., Jeong, D.K., 2012. Bovine mastitis: an Asian perspective, *Asian Journal Animal Veterinary Advances* 7, 454–476.
- Singh, B.R., Vadhana, P., Bhardwaj, M., Kumar, V., Sinha, D.K., Singh, S.V., 2016. Comparative Antimicrobial Activity of Tea Tree Oil (Melaleuca Oil) and Common Topical Antimicrobials against Bacteria Associated With Wound and Topical Infections. *Pharmceutica Analytica Acta* 7,11.
- Singh, M., Ludri, R.S., 2001. Somatic cell counts in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of lactation, parity, and season. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 14, 189-192.
- Smith, A.C., Wood, C.L., McQuerry, K.J., Bewley, J.M., 2014. Effect of a tea tree oil and organic acid footbath solution on digital dermatitis in dairy cows. *Journal Dairy Science*. 97, 2498–2501.
- Tangorra, F.M., Redaelli, V., Luzi, F., Zaninelli, M., 2019. The Use of Infrared Thermography for the Monitoring of Udder Teat Stress Caused by Milking Machines. *Animals* 9, 384.
- Tomazi, T., Gonçalves, J.L., Barreiro, J.R., Arcari, M.A., dos Santos, M.V., 2015. Bovine subclinical infection caused by coagulase-negative Staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk. *Journal Dairy Science* 98, 3617-3612.
- Tucker, C.B., MIntline, E.M., Banuelos, J., Walker, K.A., Hoar, B., Drake, D., Weary, D.M., 2014. Effect of a cooling gel on pain sensitivity and healing of hot-iron cattle brands. *Journal Animal. Science* 92:5666–5673.
- Vasquez, A.K., Nydam, D.V., Foditsch, C., Wieland, R., Lynch, R., Eicker, S., Virkler, P.D., 2017. Use of a culture-independent on-farm algorithm to guide the use of selective dry-cow antibiotic therapy. *Journal Dairy Science* 101, 5345-5361.
- Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K.S., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology* 92, 179-85.
- Venkitanarayanan, K., Kollanoor-Jhony, A., Darre, M.J., Donoghre, A.M., Donoghue, D.J., 2013. Use of plant-derived antimicrobials for improving the safety of poultry products. *Poultry Science Association Inc.* 92: 493-501.

- Vilar, M.J., Hovinen, M., Simojoki, H., Rajala-Schultz, P.J., 2018. Short communication: Drying-off practices and use of dry cow therapy in Finnish dairy herds. *Journal Dairy Science*. 101, 7487–7493.
- Vilar, M.J., Rajala-Schultz, P.J., 2020. Dry-off and dairy cow udder health and welfare: Effects of different milk cessation methods. *The Veterinary Journal* 262, 105-503.
- Wang, W., Huang, X., Yang, H., Niu, X., Li, D., Yang, C., Li, L., Zou, Z., Wu, S., Li, Y., 2019. Antibacterial Activity and Anti-Quorum Sensing Mediated Phenotype in Response to Essential Oil from *Melaleuca bracteata* Leaves. *International Journal Molecular Science* 20, 5696.
- Wieland, M., Nydam, D.V., Virkler, P.D., 2017. A longitudinal field study investigating the association between teat-end shape and two-minute milk yield, milking unit-on time, and time in low flow rate. *Livestock Science* 205, 88–97.
- Will, S., Wu'rgau, S.T., Fraunholz, J., 1990. Ultrasonographic findings of the bovine teat. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 97, 403–6.
- Yang, C., Li, G., Zhang, X., Gu, X., 2018. Udder skin surface temperature variation pre- and post- milking in dairy cows as determined by infrared thermography. *Journal of Dairy Research* 85, 201–203.

Uso do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) para secagem de búfalas Murrah em um sistema orgânico de criação

Abstract

Background

Dry cow therapy is a common management practice to treat subclinical mastitis and prevent new infections during the nonlactating period. Studies addressing dry cow therapy under organic farming practice are unavailable and for the buffalo cow inexistent.

Objectives

To evaluate the efficacy of an intramammary dry cow therapy based upon a medicament with 5 % *Melaleuca alternifolia* oil (TTO) in Murrah cows.

Materials and methods

After applying exclusion criteria upon a herd of 20 dairy Murrah cows, twelve were used in a longitudinal prospective and retrospective negative control study, where the cow was control of herself. Previously the pure oil and the medicament with 5 % MO passed by *in vitro* antimicrobial tests for Minimum inhibitory concentration (MIC) and Maximum inhibitory concentration (MBC). The cows were clinically examined, and the teats passed through thermographic and ultrasonographic examination. Udder health was monitored during the first 100 days in lactation (DIM) through somatic cell count (SCC) in the milk and the California mastitis test (CMT).

Results

Laboratory tests against standard strains *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™ and *Escherichia coli* ATCC®25922™ and wild bacterial strains showed MIC values of a maximum of 50 µL/mL for the oil 5% and MO 5 %. One wild *S. aureus* strain had no MBC. No adverse effects were observed after the intramammary application of MO. CMT and SCC values were similar ($P>0,05$) during all observations. Particular ultrasound characteristics of the teat were observed. One case of mastitis occurred during postpartum.

Conclusion

The medicament with 5 MO is effective *in vitro* and compatible with the intramammary tissue *in vivo* of Murrah cows. It was able to protect the buffalo cow during the dry period under natural conditions in an organic farm.

Key words: dry cow therapy; udder health, buffalo, intramammary medicament, organic farming.

Abbreviations: MIC, Minimum inhibitory concentration; MBC, Minimum bactericidal concentration.; SCC, Somatic cell count; CMT, *California mastitis test*.

A população mundial de búfalos é de cerca de 168 milhões de animais, sendo que 95% estão na Ásia (Índia, Paquistão e China), 2% na África (Egito), 2% na América do Sul e no Caribe, 1% na Europa e Oceania. As búfalas produzem entre 1500 e 4500 litros de leite por lactação.¹ As raças bubalinas produtoras de leite no Brasil são Murrah, Mediterrâneo e Jaffarabadi. Além do leite, estes animais apresentam aptidão para produção de carne.²

No final da gestação, as búfalas necessitam de um período de descanso, onde as vacas passam por uma interrupção da lactação denominado de secagem. O período seco varia de acordo com a característica de sazonalidade e época de parição, entretanto é essencial para a involução do tecido glandular, importante para a saúde, produção de leite e colostro das vacas.³⁻⁵

O período seco também é um momento estratégico para o tratamento de mastites.⁶ Uma opção apresentada em bovinos para o tratamento e prevenção desta enfermidade, é o uso de antibióticos sintéticos, por via intramamária.⁷ Apesar de existirem poucos para uso específico em búfalas,⁸ a inclusão legal dos bubalinos na espécie bovina pela União Europeia (UE) no ano de 2009, promoveu inicialmente a utilização sem comprovação de sua eficácia.⁸

Além das preocupações com o uso indiscriminado de antibióticos, em propriedades em sistema orgânico de produção, a antibioticoterapia em geral é proibida, somente permitida em casos excepcionais mediante justificativa pertinente ao organismo de avaliação da conformidade, do Ministério da agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).⁹ No entanto, para Kiesner et al.,⁶ casos com valores acima de 100.000 células somáticas/mL nos últimos três meses consecutivos de controle leiteiro (CL) oficial, indica-se a intervenção convencional.

Uma escolha para substituir o uso de antibiótico em sistemas orgânicos, pode ser a utilização de substâncias ativas derivadas de plantas¹⁰⁻¹². Entre estas substâncias está o óleo essencial de melaleuca (OEM), derivado da destilação a vapor da planta australiana *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae).¹³

Em animais, o OEM apresentou ação antibacteriana após aspiração de abscessos prostáticos e fungicidas contra *Malassezia pachydermatis* em cães^{14,15} e contra *Trichophyton equinum* em equinos.¹⁶ Em ovinos foi testado e aprovado contra piolhos da

espécie *Bovicola ovis*¹⁷ e na avaliação ovicida *in vitro* contra *Haemonchus contortus*, comprovada em Gerbils (*Meriones unguiculatus*), e como antiparasitário no combate da mesma espécie de nematódeos.^{18,19} Em pesquisas mais recentes o óleo de melaleuca foi capaz de prevenir o desequilíbrio bioenergético do baço de bagres infectados naturalmente por *Ichthyophthirius multifiliis*.²⁰

Não há registros da utilização do óleo de melaleuca em búfalos, porém Singh et al.²¹, relataram que somente 20% de cepas bacterianas isoladas de búfalo eram sensíveis *in vitro* ao OEM. Em bovinos um produto intramamário com ação selante interno para teto (SIT), a base de extratos vegetais incluindo o OEM, protegeu o sistema mamário de vacas bovinas sem apresentar efeitos colaterais.²² Estudos *in vitro* demonstraram que o OEM apresentou ação antimicrobiana contra bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, oriundas de vacas com mastite.²³

Os objetivos deste trabalho foram formular e avaliar a eficácia de um medicamento intramamário formulado a base de OEM para proteção de búfalas Murrah durante o período seco.

Materiais e métodos

Local

O estudo foi realizado entre dezembro de 2019 e outubro de 2020 na fazenda do Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR de criação de búfalas leiteiras, produção certificada orgânica pelo Instituto de tecnologia do Paraná – TECPAR, no município da Lapa - PR, Brasil (25° 47' latitude, 49° 46' longitude oeste, 910m de altitude). O clima da região é subtropical (Cfb) segundo a classificação de Köppen.

Preparação do produto e testes susceptibilidade antimicrobiana

O OEM (Ferquima®), passou por uma análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa revelando uma concentração de 42 % de seu principal componente ativo, o terpinen-4-ol. Demais informações técnicas podem ser verificadas no documento anexo 3.

Com composição conhecida, o óleo foi avaliado para sua concentração inibitória mínima (CIM) e sua concentração bactericida mínima (CBM), em comparação a Clorexidina 2%

(CHX), por meio de técnicas de micro-diluição em caldo de acordo com os procedimentos da *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI),²⁴ para testes de susceptibilidade antimicrobiana para bactérias aeróbicas. Para tanto, foram realizadas duas análises em quadruplicata executado em dois momentos, sendo avaliadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™ e *Escherichia coli* ATCC®25922™ e duas cepas selvagens de *S. aureus* originárias de vacas Holandesas. Em seguida, foram classificadas de acordo com os critérios de interpretação da CIM e CBM analisado em µg/mL e % (v/v) de cada bactéria.²⁴

Em paralelo aos exames laboratoriais, foi formulado um medicamento intramamário com ação antibiótica a base de OEM 5% (M5). A substância foi manipulada segundo os preceitos de boas práticas de manipulação, em laboratório da Dexter Latina, localizada em São José dos Pinhais, Paraná, Brasil.

Utilizou-se uma substância coloidal de uso parenteral (intramamário) constituída por agente polimerizador Polaxamer etileno e dietileno glicol oxietileno (72,5% p/p) (Kolliphor®/BASF) como principal agente estruturador e fornecedor da estabilidade física do coloide. Polietilenoglicol (PEG1500) foi empregado como umectante e dispersante, e como o ingrediente ativo farmacêutico óleo de melaleuca (5%). Os compostos mencionados formaram sistema emulsionado do tipo A/O (água em óleo). O produto foi acondicionado em aplicadores intramamário convencionais estéreis. Em cada teto foi aplicado um volume de 4 ml de produto contendo 0,2 g de OEM, equivalente a 5% da concentração total da fórmula.

A fórmula com OEM, apresentou capacidade adaptativa as cavidades mucosas de forma não oclusiva, sendo aplicada na forma de coloide de baixa adesividade, ação tópica e penetração percutânea. Para tanto levou-se em consideração características como teor de acidez, densidade e solubilidade para as variáveis de incorporação e sua influência no pH e viscosidade da formulação.

Animais e design

Em relação ao número de animais investigados, foram aplicados critérios de exclusão, reduzindo o grupo experimental de vinte vacas no total para doze búfalas da raça Murrah (GT; n=12) em fase final de lactação, que permaneceram em rotina diária usual sem alteração do manejo, em regime de criação semi-intensiva, em pastagens consorciadas de

Hemartria (*Hemarthria altissima*) e Amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*), além do fornecimento em cocho de capim Elefante (*Pennisetum purpureum*) e concentrados.

Somente foram incluídas vacas sem lesões no teto ou úbere, com média de CCS dos últimos três meses pré secagem menor que 100.000 células/mL, usando a indicação para bovinos.⁶ Idade e ordem de lactação não foram utilizadas como critério de exclusão. Os animais foram identificados por brincos numerados. As vacas eram ordenhadas em sistema de ordenha mecânica móvel, com bezerro ao pé, e foram secas abruptamente com desmame concomitante.

Todas as vacas passaram no dia 0 (D0), antes da primeira ordenha, por avaliação física específica, com inspeção e palpação do úbere e tetos;²⁵ Ultrassonografia dos tetos²⁶⁻²⁹ e termografia dos tetos.^{30,31} O M5, com volume de 4ml foi aplicado no dia da secagem, após a realização de *California mastitis test* (CMT),³² com desinfecção da ponta do teto com álcool 70% e introdução através de aplicador intramamário convencional (D0). No dia um (D1) foram repetidas a ultrassonografia e a termografia. O CMT foi repetido em todos os animais cinco dias após o parto.^{33,34} Todos os achados foram registrados em ficha clínica (anexo 8), assim como o tempo total de secagem em dias. Foram colhidos os dados históricos de CCS e ocorrências de mastite clínica (MC) dos três controles leiteiros oficiais pós-parto da lactação anterior, sem terapia para vaca seca (STVS); e dos três controles leiteiros oficiais da lactação pós secagem com o M5.^{35,36} Um esquema geral do desenho experimental pode ser observado na figura 1.

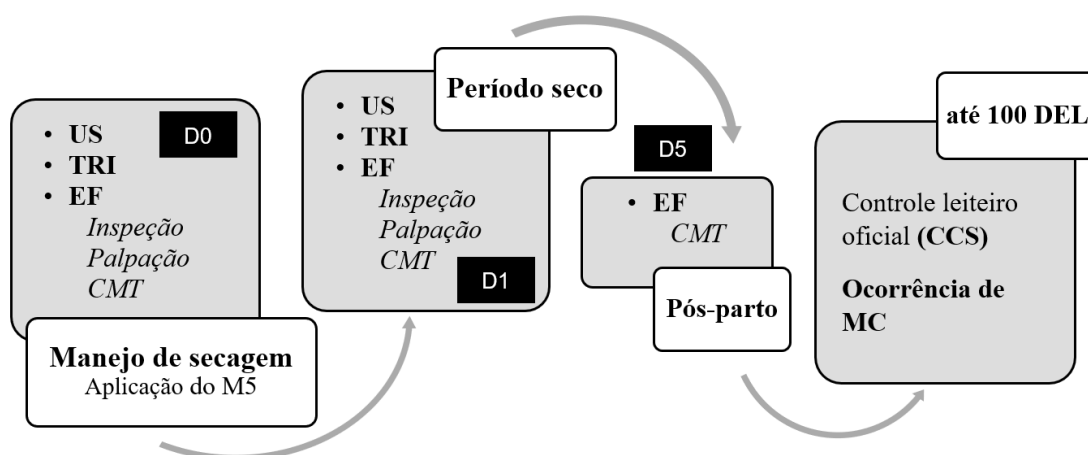


Figura 1. Esquema demonstrativo dos exames realizados dentro da alternância de período seco e lactação das búfalas.

Legenda: D: dia; M5: Produto com óleo essencial de melaleuca a 5%; US: ultrassonografia dos tetos; TRI: termografia infravermelha dos tetos; EF: Exame físico específico; DEL: Dias em lactação; CCS: contagem de células somáticas; MC: mastite clínica.

Termografia infravermelha (TRI) do teto

As avaliações de TRI dos tetos foram realizadas no período da manhã, previamente a ordenha com registros individuais de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (URA%), em ambiente fechado com distância de um metro lateralmente aos tetos anteriores e em posição caudal para os tetos posteriores. A avaliação foi realizada com uma câmera infravermelha *FLIR* modelo E50. Em seguida, os termogramas foram analisados pelo programa *FLIR tools* com determinação da temperatura em três pontos do teto (base, centro e ponta) e média geral, apresentados em média e desvio padrão.

Ultrassonografia (US) do teto

As ultrassonografias foram realizadas com um equipamento *Sonoscape* modelo A5V com probe linear de 9 MHz. Para avaliação das estruturas, sem compressão, o teto foi imerso em um copo plástico cheio de água morna, com colocação do transdutor na parede do copo revestida com gel de ultrassom. O processamento das imagens ocorreu ao pé da vaca com utilização do software do próprio equipamento.

As medidas ultrassonográficas foram (em mm): comprimento do canal do teto (CCT), medido da Roseta de Fürstenberg até a extremidade distal do canal do teto; diâmetro do teto no mesmo eixo ortogonal no ponto da Roseta de Fürstenberg (DRF), diâmetro da cisterna do teto (DCT), espessura da parede do teto (EPT), medidos ortogonalmente ao canal do teto, 10 mm acima da Roseta de Fürstenberg (figura 2).

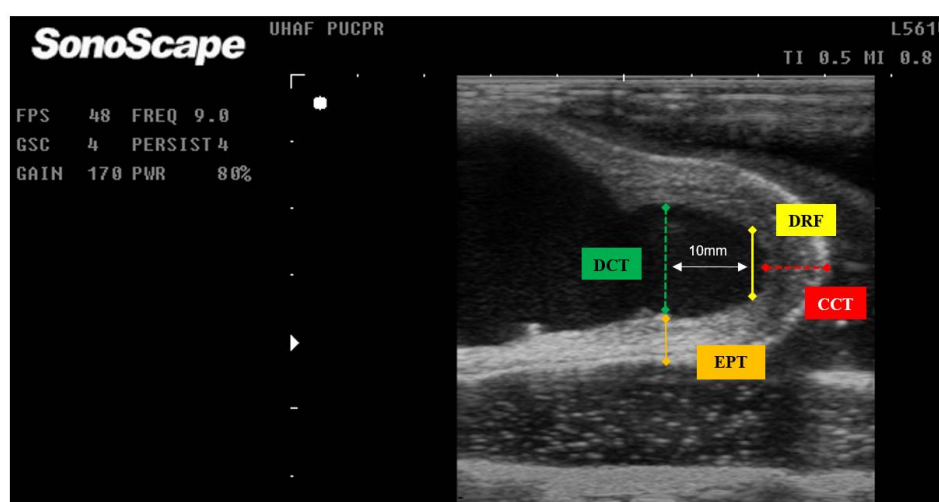


Figura 2. Medidas ultrassonográficas (em mm) realizadas no D0 e D1 nas búfalas (GE; n=12).
Legenda: CCT: comprimento do canal do teto; DRF: diâmetro do teto medido no eixo ortogonal a Roseta de Fürstenberg; EPT: espessura da parede do teto; DCT: diâmetro da cisterna do teto.

California mastitis test (CMT), Contagem de células somáticas (CCS) e ocorrência de mastites

Na secagem, todas as vacas tiveram CMT realizado pelo primeiro autor em cada quarto funcional. A reação ao CMT de cada quarto foi registrada e classificada de acordo com Schalm e Noorlander.³² Após o parto, o CMT foi realizado pelos colaboradores da fazenda, previamente treinados, que também realizaram avaliações de secreção previamente a todas as ordenhas para ocorrência de MC durante os 100 primeiros dias de lactação (DEL). A CCS foi realizada por laboratório oficial da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa – APCBRH, disponibilizando informações via relatórios mensais mediante solicitação do produtor.

Análise estatística

A pesquisa configura um estudo experimental longitudinal prospectivo e retrospectivo com controle negativo (vaca controle dela mesma).

Os dados da avaliação clínica foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. As medidas de ultrassonografia e termografia dos tetos, bem como a CCS observada nos 100 primeiros dias de lactação, foram comparadas pelo teste de t de Student. Os valores de CCS foram transformados para log₁₀. Os dados estão apresentados em média, desvio padrão e coeficiente de variação. Para todas as análises foi utilizado o SPSS®, versão 25 e nível de significância de 0,05.

Comitê de ética

O experimento foi iniciado após aprovação de pesquisa pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da IAPAR, protocolo nº 02/2019 (anexo 9).

Resultados

CIM e CBM

Os testes de susceptibilidade antimicrobiana para determinação de CIM e CBM foram realizadas para OEM puro a 5%, M5 e Clorexidina (CHX) a 2%, para cepas *S. aureus* ATCC®25923™ *E. coli* ATCC®25922™, e para duas cepas selvagens de *S. aureus* oriundas de vacas Holandesas. Afora os resultados para o CHX 2%, que foram iguais, sendo uma CIM e CBM de 0,1 µL/mL (0,2%), para *S. aureus* ATCC®25923™, *E. coli*

ATCC®25922TM e para as cepas tipo selvagens de *S. aureus*, os resultados obtidos estão apresentados no quadro 1.

Quadro 1. Resultados para testes de susceptibilidade antimicrobiana por meio da determinação de Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) de OEM 5% e M5.

Cepas	CIM				CBM			
	OEM 5%		M5		OEM 5%		M5	
	µL/mL e % v/v							
<i>E. coli</i> ATCC®25922™	6,25	0,3125	6,25	0,3125	6,25	0,3125	25	1,25
<i>S. aureus</i> ATCC®25923™	6,25	0,3125	25	1,25	6,25	0,3125	100	5
<i>S. aureus</i> TS1	50	2,5	25	1,25	100	5	100	5
<i>S. aureus</i> TS2	50	2,25	SA	SA	50	2,25	SA	SA

Legenda: OEM 5%: Óleo essencial de melaleuca a 5%; M5: Medicamento a base de óleo essencial de melaleuca a 5%; CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima; TS1: Cepa tipo selvagem 1; TS2: cepa tipo selvagem 2; AS: Sem ação.

Exame físico do úbere

Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) no exame físico específico do úbere e tetos das búfalas entre os dias de avaliação. As vacas não manifestaram em nenhum momento sinais de dor local.

Termografia infravermelha (TRI) do teto

Os resultados obtidos pelos termogramas em três pontos de avaliação dos tetos (base, centro e ponta), demonstraram aumentos ($P<0,001$) em todos os pontos de avaliação de em média 3,5°C entre o D0 e D1 de avaliação (tabela 1).

Tabela 1. Avaliação termográfica de tetos bubalinos ($n=48$) com medidas em °C e média e desvio padrão ($\bar{X} \pm \sigma$) de três pontos de avaliação.

Parâmetros	D0	D1	P-valor
	$(\bar{X} \pm \sigma)$		
TBT	30,98±2,64 ^b	34,50±1,02 ^a	<0,001
TCT	30,41±3,09 ^b	33,91±1,63 ^a	<0,001
TPT	30,23±4,30 ^b	33,90±0,97 ^a	<0,001
$\Sigma (\bar{X} \pm \sigma)$	30,54±3,40 ^b	34,11±1,27 ^a	<0,001

Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas entre os dias D0 e D1, pelo teste t de Student ($P<0,05$). TBT: temperatura da base do teto; TCT: temperatura do centro do teto; TPT: temperatura da ponta do teto.

Ultrassonografia

Com exceção dos valores de DRF ($P=0,3697$), o US demonstrou entre D0 e D1, pós secagem, uma diminuição dos valores de CCT, EPT e um aumento dos valores do diâmetro da cisterna do teto (DCT) (tabela 2).

Tabela 2. Medidas anatômicas em mm dos tetos ($n= 48$) de búfalas Murrah feitas por ultrassonografia apresentados em média e desvio padrão ($\bar{X} \pm \sigma$) dos tetos.

Parâmetros	D0	D1	P-valor
	$(\bar{X} \pm \sigma)$		
CCT	11,75 ± 1,82 ^a	8,88 ± 1,34 ^b	<0,0001
DRF	22,19 ± 2,57 ^a	22,28 ± 2,46 ^a	0,3697
EPT	9,54 ± 2,05 ^a	7,15 ± 1,84 ^b	<0,0001
DCT	5,74 ± 1,88 ^b	13,25 ± 3,49 ^a	<0,0001

Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas entre os dias D0 e D1, pelo teste t de Student ($P<0,05$). CCT: comprimento do canal do teto; DRF: diâmetro da Roseta de Fürstenberg; EPT: espessura da parede do teto; EMT: espessura da mucosa do teto; DCT: diâmetro da cisterna do teto.

Comparando tetos anteriores (TA) e posteriores (TP) (tabela 3), verificou-se no D1 para DRF um valor médio dos TP superior aos TA ($P=0,0006$), EPT, um valor médio de TA superior aos TP ($P=0,0033$) e DTC com um valor médio de TP superior aos TA ($P=0,005$).

Tabela 3. Medidas anatômicas em mm dos tetos anteriores ($n= 24$) e tetos posteriores ($n=24$) de búfalas Murrah feitas por ultrassonografia apresentados em média e desvio padrão ($\bar{X} \pm \sigma$).

Parâmetros		D0	D1	P-valor	
		$(\bar{X} \pm \sigma)$		TA vs. TP D0	TA vs. TP D1
CCT	TA	$12,0 \pm 2,2^a$	$8,9 \pm 1,4^a$	$0,1618$	$0,4354$
	TP	$11,5 \pm 1,3^a$	$8,9 \pm 1,3^a$		
DRF	TA	$21,7 \pm 2,7^a$	$21,4 \pm 2,6^b$	$0,0722$	$0,0006$
	TP	$22,6 \pm 2,5^a$	$23,1 \pm 2,0^a$		
EPT	TA	$9,5 \pm 0,8^a$	$7,7 \pm 0,9^a$	$0,1624$	$0,0033$
	TP	$9,9 \pm 0,8^a$	$7,0 \pm 0,7^b$		
DTC	TA	$5,8 \pm 1,8^a$	$12,0 \pm 3,1^b$	$0,4044$	$0,0005$
	TP	$5,7 \pm 2,0^a$	$14,4 \pm 3,5^a$		

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas entre os dias D0 e D1, pelo teste t de Student ($P<0,05$). CCT: comprimento do canal do teto anterior; DRF: diâmetro da Roseta de Fürstenberg; EPT: espessura da parede do teto; DTC: diâmetro da cisterna do teto; TA: tetos anteriores; TP: tetos posteriores.

Não foram encontradas alterações compatíveis com uma inflamação. Entretanto, foram detectadas características anatômicas peculiares nas búfalas conforme pode ser observado na figura 3.

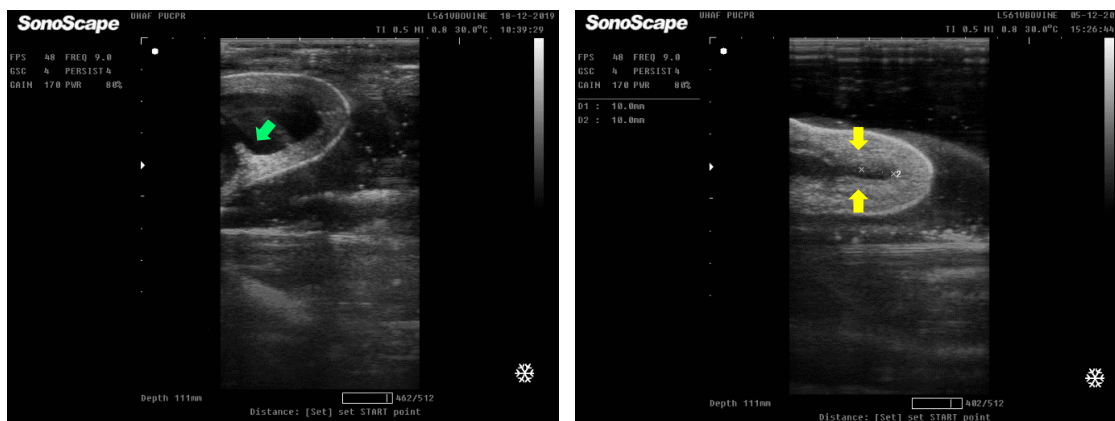


Figura 3. Características anatômicas peculiares em búfalas: a) Anel proeminente na mucosa (seta verde); b) camada muscular mais espessa, comprimindo a cisterna do teto (setas amarelas).

California mastitis test (CMT), Contagem de células somáticas (CCS) e ocorrência de mastites

Realizado no momento da secagem e cinco dias após o parto, não foram observadas diferenças do CMT, anterior esquerdo ($P=0,5862$), posterior esquerdo ($P=0,7728$), anterior direito ($P=1,00$) e posterior direito ($P=0,7728$).

As vacas permaneceram secas em média 120 dias (entre 96 e 149 dias). Não foi observada correlação entre a duração do período seco (dias seca) e a CCS ($P>0,05$).

Valores de CCS no momento da secagem e nos três meses pós-parto, apresentaram diferenças na comparação intragrupos ($P<0,05$), com diminuição no terceiro CL ($4,24 \pm 0,47 \times \log^{10}$ CCS/mL em comparação ao momento da secagem ($4,57 \pm 0,25 \times \log^{10}$ CCS/mL). Por outro lado, no GT, foi observado aumento dos valores de CCS no pós-parto ($P<0,05$), no primeiro ($4,29 \pm 0,28 \times \log^{10}$ CCS/mL), segundo ($4,36 \pm 0,35 \times \log^{10}$ CCS/mL) e terceiro CL ($4,47 \pm 0,36 \times \log^{10}$ CCS/mL), quando comparado ao momento da secagem ($4,00 \pm 0,24 \times \log^{10}$ CCS/mL) (figura 3).

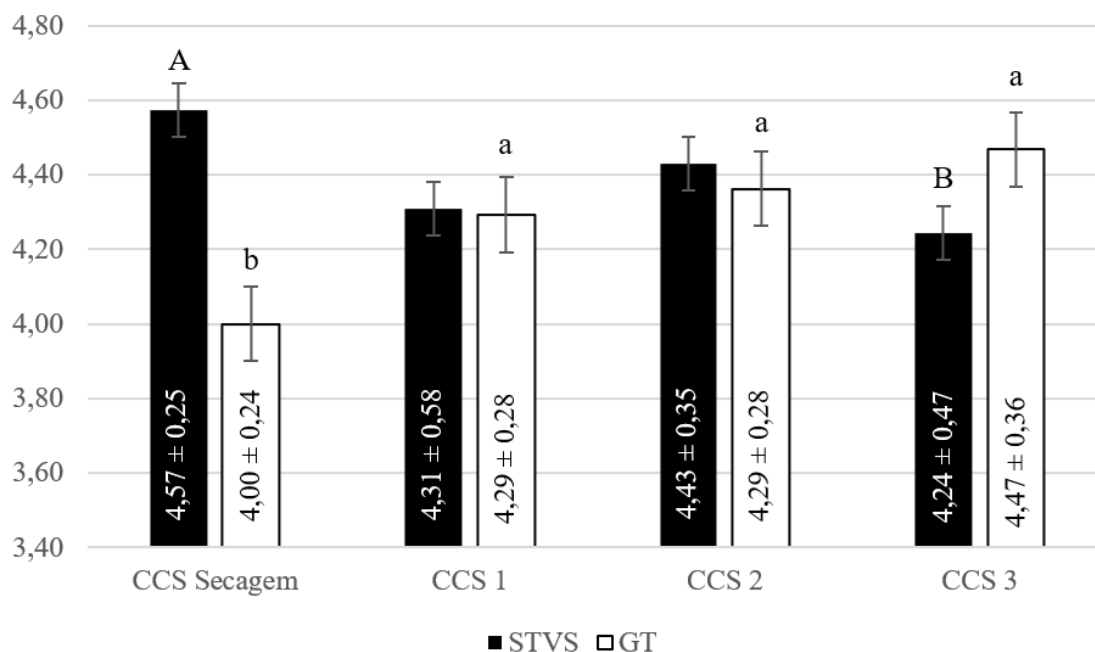


Figura 4. Comparação de CCS ($\times \log^{10}$) intra e entre grupos em três controles leiteiros oficiais no pós-parto em comparação ao momento da secagem para GT (n=12) e ano STVS (n=12). Letras maiúsculas diferentes nas barras indicam diferenças significativas entre os controles leiteiro do ano STVS, e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os controles leiteiros para o GT, pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

Não foram observadas diferenças nos valores de CCS nos três meses de CL pós-parto na comparação entre anos ($P = 0,3208$). Três búfalas no grupo STVS apresentaram valores de CCS acima de 100.000 CCS/mL (mínimo 146.000 CCS/mL e máximo 243.000 CCS/mL) no grupo com GT, um animal (262.000 CCS/mL). Em cada momento de avaliação, uma vaca apresentou mastite clínica no pós-parto imediato ($P > 0,05$).

Produção de leite

Não foram observadas diferenças entre os valores de produção de leite nos três primeiros meses após o parto registrados durante o CL, com (GT) e sem terapia da vaca seca (STVS; $P = 0,1985$), assim como também não encontramos correlação entre a ordem de lactação e a produção de leite ($P < 0,05$) em nenhum dos momentos de avaliação.

Discussão

Os resultados demonstraram que o medicamento formulado, conservou a capacidade antimicrobiana do OEM puro, que pode ser atribuída pela presença de terpinel-4-ol,³⁷⁻³⁹

principal componente que propicia principalmente ação antibacteriana^{23,40-42} e anti-inflamatória³⁷⁻³⁹ ao OEM. Entretanto, também foram descritas ações antifúngicas,^{14,15} repelentes,⁴³ antiparasitárias,^{18,19} entre outras.

Os óleos essenciais podem sofrer variações em sua composição,⁴⁴ portanto estabeleceu-se como norma internacional para o OEM, que uma quantidade acima de 30% de terpinen-4-ol, é considerado um óleo com maior potencial antimicrobiano;⁴⁵ portanto, como o M5 contém 42% de terpinen-4-ol, esperava-se obter uma ação antimicrobiana suficiente.

CIM e CBM

Os valores de CIM e CBM para *S. aureus* ATCC®25923™ *E. coli* ATCC®25922™, obtidos neste trabalho foram iguais (0,3125% v/v ou 6,25µL/mL). Esses valores foram muito próximos aos resultados obtidos por Cox et al.⁴⁴, com 0,25% v/v de CIM e 0,5% v/v de CBM de OEM contra cepas de *S. aureus* (NCTC 8325) e *E. coli* (AG 100). Variações observadas estão relacionadas com a resistência da cepa bacteriana,²¹ mas também podem ser consequência da variabilidade na taxa pela qual os componentes ativos do OEM se difundem através da parede celular bacteriana e nas regiões fosfolipídicas das estruturas da membrana celular.⁴⁴

Em estudo com óleo essencial de *M. armillaris*, analisando ação contra cepa padrão de *S. aureus* ATCC®25913™, os valores de CIM foram de 25 µL/mL, respectivamente, maiores em comparação as cepas laboratoriais desse estudo. Essas variações podem ser atribuídas a uma maior atividade antimicrobiana do OEM pela maior concentração de Terpinen-4-ol na planta *M. alternifolia* em relação a *M. armillaris*.²³

A ação antimicrobiana oriunda do OEM é causada por danos à membrana microbiana, estabelecida por um aumento de susceptibilidade a NaCl, formação de mesossomos e perda do material citoplasmático.⁴⁴⁻⁴⁶ Estes efeitos podem ser atribuídos a 42% de terpinen-4-ol, principal constituinte do OEM do M5,^{45,47} valores superiores ao encontrado no estudo de Li et al.⁴⁸ que atribuiu a atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* e *Candida albicans* para 23% de terpinen-4-ol em uma amostra de OEM.

As concentrações finais usadas na bisnaga de 5% (200mg) com um volume total de 4ml foram menores que o volume total de 9ml de CINATUBE® que contém OEM.²² Ainda assim foram suficientes para proteger a cisterna do teto da búfala. Isso pode ser explicado

pela capacidade de dissolução do óleo, que envolve a desintegração do veículo e dispersão do ingrediente ativo na cisterna da glândula e no sistema de ductos da glândula mamária.⁴⁹

Exame físico- clínico e exames por ultrassonografia e termografia

Durante as avaliações ultrassonográficas, foram identificadas algumas características anatômicas específicas, as dobras anulares, observadas na transição entre a cisterna do teto e cisterna da glândula e um colapso em região de ponta do teto, atributo peculiar para búfalas de rio. Essas peculiaridades descritas anteriormente como pregas anulares proeminentes,²⁹ presumiu que estas pregas podem interferir na retenção do leite e regular o tamanho da cisterna, o que as caracteriza como um mecanismo de proteção de glândula, principalmente em uma espécie que permanece muito tempo na água, como os búfalos.

Como as búfalas foram avaliadas após o desmame dos bezerros no D0, alguns tetos estavam mais colapsados na região da ponta do teto. Esta característica, antes descrita como parte do canal do teto,³¹ representa uma estrutura muscular mais forte, possivelmente pela presença de uma estrutura de colágeno mais densa, que garantem as búfalas uma maior proteção contra fatores ambientais e comportamento de permanecer em pântanos e banhados⁵⁰⁻⁵².

Para Sharma et al.⁵³ os tetos são considerados a primeira linha de defesa contra infecções intramamárias, correlacionando o aumento da CCS com um maior diâmetro da ponta do teto. Segundo Kaur et al.⁵⁴ os parâmetros morfológicos estão diretamente associados a saúde do úbere. Os mecanismos de proteção naturais da búfala podem permitir que ela seja menos vulnerável no período seco comparado com a vaca bovina, porém não garantem uma proteção efetiva durante todo o período seco conforme verificado por Guccione et al..⁵⁵

O aumento da temperatura média nos tetos no D1 em comparação ao D0 de avaliação, podem ser atribuídos ao desmame e secagem abrupta com consequente preenchimento e ingurgitamento da cisterna do teto, com valores semelhantes ao encontrado por Yang et al. ⁵⁶ ao estabelecer o valor médio antes da ordenha de vacas Holandesas para AE e PE ($35,8 \pm 0,93$ °C) e para AD e PD ($35,8 \pm 0,87$ °C). Portanto, o abastecimento com leite assim como o próprio aumento de volume, tornou a região mais sensível à variação, com aumento da temperatura.

Uma mastite estabelecida provoca modificações nos tecidos e lesões na mucosa.⁵⁷ Isso indica que o produto a base de OEM 5% não induziu reações inflamatórias locais ou gerais suficientes para a detecção clínica de uma cisternite, telite, galactoforite ou alteração na granulação de tecido glandular^{25, 58} por nenhum dos meios de exame físico e complementares usados.

CMT, CCS e ocorrência de mastite

O período seco apresenta grande influência na saúde do úbere. Segundo Gree et al.⁵⁹ 60% das mastites clínicas, durante as duas primeiras semanas no pós-parto foram adquiridas no período seco. O manejo correto no momento da secagem garante a diminuição da ocorrência de mastite e maximiza a produção da próxima lactação. Neste momento, busca-se, a eliminação das infecções existentes e prevenção de novas infecções.⁶⁰

Este período de “descanso” apresenta-se como um momento estratégico e muito importante para vacas bovinas.⁴ Em búfalas, as pesquisas são incipientes, entretanto Guccione et al.⁵⁵ na Itália publicaram a primeira avaliação de 600mg de cloxaciclina benztatina para terapia de secagem em búfalas da raça Mediterrâneo, com resultados encorajadores na redução da incidência de mastites.

Em fazendas bovinas orgânicas, Kiesner et al.⁶ apontaram uma maior chance de novas infecções para vacas sem proteção intramamária após o período seco. A saúde do úbere pode ser calculada por meio do CCS e CMT. Assim como em vacas bovinas, em búfalas, valores de CCS também podem ser indicativos para diagnóstico de mastite, sendo 200.000 CCS/mL um valor indicativo de infecção intramamária em animais da raça Murrah.²¹ Possivelmente os 100.000 CCS/mL estabelecidos como limiar saudável para produção orgânica em vacas bovinas⁶ podem ser utilizados para búfalas igualmente.

O CMT é utilizado para realização de testes rápidos no momento da secagem e após o início da lactação. A identificação de vacas e quartos, apresentam como propósito a tomada de decisões seletivas de tratamento.^{33,34} Em nosso estudo, além do CMT no momento da secagem, ele foi repetido cinco dias após o parto e os resultados de avaliação foram semelhantes. Para Sanford et al.⁶¹ o CMT não pode ser usado como critério único na seleção das vacas para o uso ou não do tratamento de vaca seca. Devem ser associados parâmetros mais objetivos como a CCS. Ao usarmos ambos os parâmetros tentamos ser

muito criteriosos, para garantirmos a detecção o mais precocemente possível de qualquer infecção intramamária.

A mastite detectada, apesar de ser rara, ocorreu justamente no momento do pós-parto que pode ser justificado pelo tempo prolongado do período seco da búfala, com a cessação da atividade do OEM,⁶² estresse do período pós-parto, e aumento do risco de contaminação pela abertura diária do canal do teto, durante as ordenhas.⁶³

Como proteção natural, testando um produto vegetal de aplicação intramamária em vacas, produzido nos EUA (PHYTOMAST®) não foram observadas diferenças significativas para valores de CCS, entretanto foram observadas taxas de curas bacteriológicas de 41,7% em comparação ao grupo controle negativo 29,2%, no tratamento de mastite clínica,⁶⁴ no tratamento de secagem, com resultados semelhantes a terapia antibiótica convencional.²² Como no nosso estudo, também não se observou a ocorrência de efeitos adversos.

Khan et al.¹¹ comparando a eficácia terapêutica de extrato de fruto *Phyllanthus embilica* (Amla) com penicilina procaína para tratamento de mastite subclínica em búfalas sem especificação de raça, a taxa de cura porcentual de quartos com mastite subclínica com o extrato de fruto foi de 64,7% e 80,95% para a penicilina procaína. O extrato da fruta Amla, assim como a *Melaleuca alternifolia*, produto ativo da fórmula desta pesquisa, apesar de verificadas taxas de resistência bacteriana,⁶⁵ apresenta-se como uma boa alternativa para o uso de antibióticos sintéticos, apresentando comprovadas potenciais antimicrobianos.⁶⁶ Não foram encontrados estudos para utilização em búfalas durante o período seco, característica inédita ao medicamento originário desta pesquisa.

Conclusões

O OEM é eficaz *in vitro* contra cepas padrão de *E. coli* e *S. aureus* e contra cepas selvagens de *S. aureus* proveniente de vacas bovinas com mastite. O OEM pode ser usado em aplicações intramamárias em búfalas, não irritando os tecidos. Os resultados de CCS revelam proteção durante o período seco.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da empresa Dexter Latina, pelo apoio na preparação dos produtos experimentais. Ao Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR, pela oportunidade de pesquisa na instituição. A CAPES – Fundação Araucária pela disponibilidade de bolsa de auxílio para o primeiro autor da pesquisa.

Referências

1. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019 <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/water-buffaloes/en/> Acesso em 05 de agosto de 2019.
2. Albarella S, Ciotola F, D’Anza E, Colleta A, Zicarelli L, Peretti V. Congenital Malformations in River Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim* 2017, 7: 9.
3. Bashir MK, Khan MS, Lateef M, Mustafa MI, Khalid MF, Shahid-ur- Rehman, Farooq U. Environmental factors affecting productive traits and their trends in Nili-Ravi buffaloes. *Park. J. Life Soc Sci* 2015; 13:137–144.
4. Vilar MJ, Rajala-Schultz PJ. Dry-off and dairy cow udder health and welfare: Effects of different milk cessation methods. *The Vet J* 2020; 262: 105-503.
5. Hassan FAM, Ali MA, El-Tarabany MS. Economic impacts of calving season and parity on reproduction and production traits of buffaloes in the sub-tropics. *Environ Sci Pollut Res* 2017.
6. Kiesner K, Wente N, Volling O, Krömker V. Selection of cows for treatment at dry-off on organic dairy farms. *J of Dairy Res* 2016, 83:468–475.
7. Golder HM, Hodge A, Lean IJ. Effects of antibiotic dry-cow therapy and internal teat sealant on milk somatic cell counts and clinical and subclinical mastitis in early lactation. *J Dairy Sci* 2016; 99:1-11.
8. Cagnardi P, Guccione J, Villa R, D’Andrea L, Di Loria A, Ferrante MC, Borriello G, Zicarelli L, Ciaramella P. Clinical efficacy, and pharmacokinetics of meloxicam in Mediterranean buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *PLoS One* 2017;12:e0187252.
9. IN nº 46, 2011. Instrução normativa nº46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em: [file:///C:/Users/mvbri/Downloads/instrucao-normativa-no-46-de-06-de-outubro-de-2011%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/mvbri/Downloads/instrucao-normativa-no-46-de-06-de-outubro-de-2011%20(3).pdf). Acesso em 18 de outubro de 2020.
10. Enioutina EY, Teng L, Fateeva TV, Brown JCS, Job KM, Bortnikova VV, Krepkova LV, Gubarev MI, Sherwin MT. Phytotherapy as an alternative to conventional antimicrobials: combating microbial resistance. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2019; 10,11: 1203-1214.
11. Khan A, Ahmedb T, Rizwanc M, Khanc N. Comparative therapeutic efficacy of *Phyllanthus emblica* (Amla) fruit extract and procaine penicillin in the treatment of subclinical mastitis in dairy buffaloes. *Microb Pathog* 2018; 115: 8–11
12. Sakkas H, Papadopoulou C. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *J Microbiol Biotechnol* 2017; 27,3: 429–438.

13. Saller R, Berger T, Reichling J, Harkenthal M. Pharmaceutical, and medicinal aspects of Australian tea tree oil. *Phytomed* 1998; 6,5:489-495.
14. Weseler A, Geiss HK, Saller R, Reichling J. Antifungal effect of Australian tea tree oil on *Malassezia pachydermatis* isolated from canines suffering from cutaneous skin disease. *Originalarb* 2002; 215–221.
15. Kawakami E, Washizu M, Hirano T, Sakuma M, Takano M, Hori T, Tsutsui T. Treatment of prostatic Abscesses by Aspiration of the Purulent Matter and Injection of Tea Tree Oil into the Cavities in Dogs. *J Vet Med Sci* 2006; 68,11:1215-1217.
16. Pisseria F, Bertoli A, Nardoni F, Pinto L, Pistelli L, Guidi G, Mancianti F. Antifungal activity of tea tree oil from *Melaleuca alternifolia* against *Trichophyton equinum*: An *in vivo* assay. *Phytomed* 2009; 16:1056–1058.
17. James PJ, Callander JT. Dipping, and jetting with tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil formulations control lice (*Bovicola ovis*) on sheep. *Vet Parasitol* 2012; 189: 338– 343.
18. Grando TH, Baldissera MD, Gressler LT, de Sá MF, Bortoluzzi B, Schafer AS, Ebling RC, Raffin RP, Santos RCV, Stefani LM, Vaucher R, Leal MRL, Monteiro SG. *Melaleuca alternifolia* anthelmintic activity in gerbils experimentally infected by *Haemonchus contortus*. *Exper Parasitol* 2016; 190.
19. Grando TH, de Sá MF, Baldissera MD, Oliveira CB, de Souza ME, Raffin RP, Santos RCV, Domingues R, Minho AP, Leal MLR, Monteiro SG. *In vitro* activity of essential oils of free and nanostructured *Melaleuca alternifolia* and of terpinen-4-ol on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. *J of Helminthol* 2016; 90:377–382.
20. Baldissera MD, Souza CF, Baldisserotto L. *Melaleuca alternifolia* essential oil prevents bioenergetics dysfunction in spleen of silver catfish naturally infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Microb Pathog* 2018; 123: 47–51 21.
21. Singh, M, Ludri RS. Somatic cell counts in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of lactation, parity, and season. *Asian-Austral J Ani Sci* 2001; 14, 2: 189-192.
22. Mullen KAE, Anderson KL, Washburn SP. Effect of 2 herbal intramammary products on milk quantity and quality compared with conventional and no dry cow therapy. *J Dairy Sci* 2014; 97:3509–3522.
23. Buldain D, Buchamer AV, Marchetti ML, Aliverti AB, Mestorino N. Combination of Cloxacillin and Essential Oil of *Melaleuca armillaris* as an Alternative Against *Staphylococcus aureus*. *Front Vet Sci* 2018; 5:177.
24. CLSI - Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. 2012, 32:2
25. Grunert E. Sistema genital feminino. In: Grunert G. Exame clínico dos bovinos. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, 3: 299-309.
26. Will S, Würgau ST, Fraunholz J, et al. Ultrasonographic findings of the bovine teat. *Dtsch Tierärztl Wochr* 1990; 97, 10:403–6.
- Mulon PY. Surgical Management of the Teat and the Udder. *Vet Clin Food Anim* 2016; 32: 813–832.
27. Mulon PY. Surgical Management of the Teat and the Udder. *Vet Clin Food Anim* 2016; 32: 813–832.
28. Martin LM, Stöcker C, Sauerwein H, Büscher W, Müller U. Evaluation of inner teat morphology by using high-resolution ultrasound: Changes due to milking and establishment of measurement traits of the distal teat canal. *J Dairy Sci* 2018; 101:1–12

29. Bittner L, Ollhoff RD, Barbosa Neto JD, Spilke J, Pogliani FC, Martinez JL, Starke A. Ultrasonographic Evaluation of Teat Structure and Detection of Proeminent Annular Folds in Brazilian Dairy Buffaloes. *J Buffalo Sci* 2019; 8:55-61.
30. Sathiyabarathi M, Jeyakumar S, Manimaran A, Jayaprakash G, Pushpadass AH, Sivaram M, Ramesha KP, Das DN, Kataktalware MA, Arul Prakash M, Kumar RD. Infrared thermography: A potential noninvasive tool to monitor udder health status in dairy cows. *Vet World* 2016; 6:1075-1081.
31. Tangorra FM, Redaelli V, Luzi F, Zaninelli M. The Use of Infrared Thermography for the Monitoring of Udder Teat Stress Caused by Milking Machines. *Anim* 2019; 9: 384.
32. Schalm OW, Noorlander DO. Experiments and Observations Leading to Development of the California Mastitis Test. *J Am Vet Ass* 1957; 130: 199.
33. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJGM, Beiboer ML, Wilmink H, Benedictus G, Brand A. Incidence of Clinical Mastitis in Dairy Herds Grouped in Three Categories by Bulk Milk Somatic Cell Counts. *J Dairy Sci* 1998; 81:411–419.
34. Godden SM, Royster E, Timmerman J, Rapnicki P, Green H. Evaluation of an automated milk leukocyte differential test and the California Mastitis Test for detecting intramammary infection in early- and late-lactation quarters and cows. *J Dairy Sci* 2017; 100:6527–6544.
35. Bradley AJ, Breen JE, Payne BE, Williams P, Green MJ. The use of a cephalonium containing dry cow therapy and an internal teat sealant, both alone and in combination. *J Dairy Sci* 2010; 93:1566–1577.
36. Krömker V, Grabowski NT, Friedrich J. New infection rate of bovine mammary glands after application of an internal teat seal at dry-off. *J of Dairy Res* 2014; 81: 54–58.
37. Brand C, Townley SL, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. *Inflam Research* 2002; 51:283–289.
38. Koh KJ, Pearce AL, Marshman G, Finaly-Jones JJ, Hart PH. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *Brit J of Dermatol* 2002; 147:1212–1217.
39. Hammer KA. Treatment of acne with tea tree oil (melaleuca) products: A review of efficacy, tolerability, and potential modes of action. *Intern J of Antim Agents* 2015; 45:106–110.
40. Venkitanarayanan K, Kollanoor-Jhony A, Darre MJ, Donoghre AM, Donoghue DJ. Use of plant-derived antimicrobials for improving the safety of poultry products. *Poult Sci Association Inc* 2013; 92: 493-501
41. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceut* 2013; 6:1451–74.
42. Kamath NP, Tandon S, Nayak R, Naidu S, Anand PS, Kamath YS. The effect of aloe vera and tea tree oil mouthwashes on the oral health of school children. *European Archi of Paediat Dent* 2019.
43. Thomas J, Davey R, Peterson GM, Carson C, Walton SF, Spelman T, Calma T, Dettwiller P, Tobin P, McMillan F, Collis P, Naunton M, Kosari S, Christenson JK, Bartholomaeus A, McEwen J, Fitzpatrick P, Baby KE. Treatment of scabies using a tea tree oil-based gel formulation in Australian Aboriginal children: protocol for a randomised controlled trial. *BMJ open* 2018; 8: e018507.
44. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 2000; 88:170–175.

45. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 48:1914–1920.
46. Wang W, Huang X, Yang H, Niu X, Li D, Yang C, Li L, Zou Z, Wu S, Li Y. Antibacterial Activity and Anti-Quorum Sensing Mediated Phenotype in Response to Essential Oil from *Melaleuca bracteata* Leaves. *Int J Mol Sci* 2019; 20, 5696.
47. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil): a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinic Microbiol Rev* 2006; 50–62.
48. Li Wen-Ru, Li Hai-Ling, Shi Qing-Shan, Sun Ting-Li, Xie Xiao-Bao, Song B, Huang Xiao-Mo. The dynamics and mechanism of the antimicrobial activity of tea tree oil against bacteria and fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 100:8865–8875.
49. Ziv G. Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy – 3: intramammary treatment. *Vet Med Small Ani Clinician* 1980; 75: 657–670.
50. Ambord S, Stoffel MH, Bruckmaier RM. Teat anatomy affects requirements for udder preparation in Mediterranean buffaloes. *J Dairy Res* 2010; 77 468–473.
51. Ozenc E, Bozkurt MF, Yazici E, Seker E, Bayraktaroglu AG, Ozcinar U, Dogan N. Teat characteristics in relation to animal temperament during milking in buffaloes, and comparison of buffalo and cow teat morphology. *Reprod Dom Anim* 2020; 55:559–566.
52. Marcolongo M, Moorehead C, Prudnikova K. The regulatory effects of proteoglycans on collagen fibrillogenesis and morphology investigated using biomimetic proteoglycans. *J of Struct Biol* 2019; 206, 204–215.
53. Sharma N, Rho GJ, Hong YH, Kang TY, Lee HK, Hur TY, Jeong DK. Bovine mastitis: an Asian perspective, *Asian J Anim Vet Adv* 2012; 7: 454–476.
54. Kaur G, Bansal BK, Singh RS, Kashyap N, Sharma S. Associations of teat morphometric parameters and subclinical mastitis in riverine buffaloes. *J of Dairy Res* 2018;85: 303–308.
55. Guccione LA, Pesce A, Toni F, Borriello G, Salzano C, Diuccio F, Pascale M, Ciaramella. Antibiotic dry buffalo therapy: effect of intramammary administration of benzathine cloxacillin against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy water buffalo. *BMC Vet Res* 2020; 16:191.
56. Yang C, Li G, Zhang X, Gu X. Udder skin surface temperature variation pre- and post-milking in dairy cows as determined by infrared thermography. *J Dairy Res* 2018; 85, 201–203.
57. Odorcic M, Blau U, Löfstrand; Bruckmaier RM. Short communication: Teat wall diameter and teat tissue thickness in dairy cows are affected by intramammary pressure and by the mechanical forces of machine milking. *J Dairy Sci* 2020; 103:884–889.
58. Santos SK, Oliveira MG, Noriler EP, Vrisman DP, Borges LPB, Santos VJC, Coutinho LN, Teixeira PPM. Mammary Gland Ultrasound Evaluation of Jersey Cattle Breed. *Acta Sci Vet* 2016. 44: 1410.
59. Green MJ, Green LE, Medley GF, Schukken YH, Bradley AJ. Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci* 2002.; 85:2589–2599.
60. Hertl JA, Schukken YH, Tauer LW, Welcome FL, Gröhn YT. Does clinical mastitis in the first 100 days of lactation predict increased mastitis occurrence and shorter herd life in dairy cows? *J Dairy Sci* 2018; 101:2309–2323
61. Sanford CJ, Keefe GP, Sanchez J, Dingwell RT, Barkema HW, Leslie KE, Dohoo IR. Test characteristics from latent-class models of the California Mastitis Test. *Prevent Vet Med* 2006; 77: 96–108.

62. Sá Silva C, Figueiredo HM, Stamford TLM, Silva LHM. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil in ground beef. *Int J of Food Microbiol* 2019; 293: 79–86.
63. Oliveira CSF, Hogeveen H, Botelho AM, Maia PV, Coelho SG, Haddad JPA. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. *Prev Med Prev* 2015; 121: 297–305.
64. Pinedo P, Karreman H, Bothe H, Velez J, Risco C. Efficacy of a botanical preparation for the intramammary treatment of clinical mastitis on an organic dairy farm. *Can Vet J* 2013; 54:479–484.
65. Singh BR, Vadhana P, Bhardwaj M, Kumar V, Sinha DK, Singh SV. Comparative Antimicrobial Activity of Tea Tree Oil (Melaleuca Oil) and Common Topical Antimicrobials against Bacteria Associated With Wound and Topical Infections. *Pharm Anal Acta* 2016, 7:11.
66. Javale P, Sabnis S., Antimicrobial properties, and phytochemical analysis of *Phyllanthus emblica*, *Asian J Exp Biol Sci* 2010; 3: 91–95.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO/ IMPACTO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os problemas de resistência antimicrobiana, ineficácia do tratamento das mastites e consequências na saúde da vaca, desencadeia um forte clamor da sociedade, pelo uso de substâncias alternativas na substituição de antibióticos sintéticos e incentiva a busca por um produto de procedência mais natural e livre de resíduos de antibióticos.

A presente pesquisa apresentou um medicamento, a base de OEM, e que demonstrou compatibilidade na aplicação intramamária para proteção de vacas e búfalas durante o período seco, e tratamento de mastite na lactação. Obteve-se resultados promissores em testes de susceptibilidade antimicrobiana, e na proteção de vacas secas no período seco.

Pelo pioneirismo do estudo nacionalmente, e pelo potencial farmacológico apresentado em estudos clínicos, o produto desta pesquisa, concorreu em um programa de inovação oferecido pelo governo do Paraná, o Programa Centelha. A iniciativa foi promovida pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI) e pela Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), ambos do governo federal, em parceria com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o Conselho Nacional das Fundações Estaduais de Amparo à Pesquisa (Confap), operada pela Fundação CERTI e, no Paraná, foi executado pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FA).

Concorrendo entre outras 802 ideias inscritas, o tema desta dissertação foi inscrito no Programa Centelha com o título de “Fitoterápico intramamário para vacas de leite (FITOEM)” e após três fases classificatórias obteve a 36ª colocação. Integrou com este resultado a lista de suplente com demanda qualificada, com subvenção aprovada de R\$ 43.673,99 na categoria de Química e novos materiais (anexo 10).

Esses resultados nos garantem boas perspectivas, na busca da exploração dos potenciais farmacológicos do OEM. Para tanto, é necessária uma pesquisa mais aprofundada, para novas revelações sobre aspectos de

farmacocinética e farmacodinâmica do óleo essencial, especialmente visando a proteção da saúde de bovinos e bubalinos, assim como a saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS

- Agahamohammadi M, Haine D, Kelton DF, Barkema HW, Hogeveen H, Keefe GP, Dufour S. Herd-level Mastitis-Association Costs on Canadian Dairy Farms. *Front. Vet. Sci.*, 14 May 2018 | DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00100>
- Boito JP, Santos RC, Vaucher RA, Raffin R, Machado G, Tonnin AA, Da Silva A. Evaluation of tea tree oil for controlling *Rhipicephalus microplus* in dairy cows. *Vet. Parasitol.* 2016; 225: 70–72. | DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.05.031
- Buldain D, Buchamer AV, Marchetti ML, Aliverti AB, Mestorino N. Combination of Cloxacillin and Essential Oil of *Melaleuca armillaris* as an Alternative Against *Staphylococcus aureus*. *Front. Vet. Sci.* 2018; 5:177. | DOI: 10.3389/fvets.2018.00177
- Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 50–62. | DOI: 10.1128/CMR.19.1.50-62.2006.
- Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 48:1914–1920. | DOI: 10.1128/AAC.46.6.1914–1920.2002.
- CEPA: Esalq – USP. Boletim do leite: Dez. 2020; ano 26. Nº 306 > Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/revista/pdf/0163608001608229202.pdf>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2021.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 2000; 88:170–175. | DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x.
- Freires IA, Denny C, Benso B, de Alencar SM, Rosalen PL. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules.* 2015; 20: 7329-7358. | DOI: 10.3390/molecules20047329
- Hogeveen H, Huijps K, Lam TJ, Economic aspects of mastitis: new developments. *N. Z. Vet. J. New. Zeal. Vet. J.* 2011; 59:1, 16–23. | DOI: 10.1080/00480169.2011.547165.

Meaney, W. J. Effect of a dry period teat seal on bovine udder infection. *Isr. J. Agric. Res.* 1977; 16:293–299. | DOI: 10.1136/vr.99.2.30

Mullen KAE, Anderson KL, Washburn SP. Effect of 2 herbal intramammary products on milk quantity and quality compared with conventional and no dry cow therapy. *J. Dairy Sci.* 2014; 97:3509–3522. | DOI: 10.3168/jds.2013-7460

Oliveira MI, Schneider M, Rosa MG, Silva CM, Moraes MSA, Schneider RCS, Kist LT. Extração e caracterização do óleo essencial de melaleuca e desenvolvimento de uma formulação semi-sólida de uso tópico. *Rev. Jov. Pesq.* 2015; 5, 1: 50-59. | DOI: <http://dx.doi.org/10.17058/rjp.v5i1.5806>

Patel SJ, Wellington M, Shah RM, Ferreira MJ. Antibiotic Stewardship in Food-producing Animals: Challenges, Progress, and Opportunities. *Clinical Therapeutics.* 2020; 42, 9:16491658. | DOI: 10.1016/j.clinthera.2020.07.004.

Pazinato R, Klauck V, Volpato A, Tonin AA, Santos RC, de Souza ME, Vaucher RA, Raffin R, Gomes P, Felippi CC, Stefani LM, Da Silva AS. Influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.* 2014; 63: 77–83. | DOI: 10.1007/s10493-013-9765-8

Pinedo P, Karreman H, Bothe H, Velez J, Risco C. Efficacy of a botanical preparation for the intramammary treatment of clinical mastitis on an organic dairy farm. *Can Vet J* 2013; 54:479–484. | PMID: PMC3624917

Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMCComplement. Altern. Med.* 2006; 6: 39-50. | DOI: 10.1186/1472-6882-6-39

Roboisson D, Ferchiou, Pinior B, Gautier T, Sa P, Lhermie G. The Use of Meta-Analysis for the Measurement of Animal Disease Burden: Losses Due to Clinical Mastitis as an Example. *Front. Vet. Sci.* 2020; 18. | DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00149>

Spers RG, Wright JTC, Amedomar AA. Scenarios for the milk production chain in Brazil in 2020. *R. Adm.* 2013; 48,2: 54-267. | DOI: 10.5700/rausp1086

Tucker CB, McIntline EM, Banuelos J, Walker KA, Hoar B, Drake D, Weary DM. Effect of a cooling gel on pain sensitivity and healing of hot-iron cattle brands. *J. Anim. Sci.* 2014; 92:5666–5673. | DOI: 10.2527/jas.2014-7860

ANEXOS

Anexo 1. Normas revista "The veterinary Journal" Capitulo 2.



THE VETERINARY JOURNAL

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.1
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 1090-0233

DESCRIPTION

The Veterinary Journal (established 1875) publishes worldwide contributions on all aspects of veterinary science and its related subjects. The journal regularly commissions topical reviews and commentaries on features of major importance. Articles with an emphasis on novel information of excellent scientific and/or clinical quality and importance, relevant to domestic animal species, will be considered.

First published in 1875 as *The Veterinary Journal*, the journal was known as the *British Veterinary Journal* from 1949 to 1997, when it reverted to its original title.

AUDIENCE

Veterinary Research Workers and Clinicians

IMPACT FACTOR

2019: 2.115 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus
Embase
Science Citation Index
Current Contents - Agriculture, Biology & Environmental Sciences
Focus on: Veterinary Science and Medicine
PubMed/Medline

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Annette L. Litster, United States

Scientific Editors

Emi Barker, United Kingdom

Marijke Beltman, Ireland

interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

If possible authors are asked to refrain from sending email chasers to the journal asking about the status of their paper under review. The Editors aim to review your paper as efficiently as possible and the enquiry is unlikely to speed up the process.

Use of Word Processing Software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, please use a table grid, (however use only one grid for each individual table and not a grid for each row). The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Authors submitting papers that are suitable for consideration but do not comply fully with this Guide will be asked to amend the text and re-submit. Model article formats in WORD are available in the introduction section of this guide, above (click to follow the links as appropriate).

Original Articles should be no longer than 3,000 words in length, excluding the Title page, Abstract, Acknowledgements, Tables, Figures and References. Reviews should be about 4,000 words in length and Short Communications up to 1,000 words.

Articles

Original Articles (word limit 3,000 words) should be arranged as follows: (1) Title page; (2) an Abstract of up to 250 words (with no sub-headings), which should emphasise objectives, the experimental procedure, results and conclusions; up to five alphabetically arranged Keywords in Sentence case should be supplied below the Abstract; (3) the main text must be sub-divided into Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, and Conclusions; (4) Conflict of interest statement; (5) Acknowledgements; (6) Appendix: Supplementary material (where this is provided; see below); (7) References; (8) Tables; (9) Figure legends; (10) Figures (uploaded as separate files); (11) Highlights (uploaded as a separate file). The sections should not be numbered. Please see the model article provided in the introduction section above.

Please note: Insert a page break only after the Title page, after the Abstract with Keywords, after the References section, between each Table, and before the Legends to figures. The Results and Discussion sections must be distinct and not combined. Avoid sub-headings in the Discussion section. References must not be included within the Conclusions section. The first person (I, we, our) must be avoided in the Abstract, but may be used elsewhere in the paper.

Tables should be included within the article and placed sequentially after the References, but before the Figure legend(s), with one Table per page.

Figure legends should be included in the main manuscript file after any Tables. Each figure should be uploaded as a separate file (Fig. 1, Fig. 2 etc.).

Short Communications should follow the requirements for full manuscripts, but the text must not exceed 1,000 words and the paper should not be divided into conventional sections. Headings for the Abstract, Keywords, Acknowledgements, Conflict of interest statement and References should be included, but there should be no other headings or subheadings in the main text. An Abstract is required and up to five alphabetically arranged Keywords in Sentence case should be supplied below it. Please see the model article provided in the introduction section above.

Anexo 2. Normas "Australian veterinary Journal" Capítulo 3.

Scientific

Australian Veterinary Journal

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The *Australian Veterinary Journal* publishes original articles, case reports, short contributions and review articles. Please contact the Editors if you plan to write a review.

Send manuscripts for the Scientific Section to:

Professor Colin Wilks, Scientific Editor, AVA House,
272 Brunswick Road, Brunswick Vic 3056.

Send articles for the Clinical Section to:

Dr Maureen Revington, Clinical Editor, AVA House,
272 Brunswick Road, Brunswick Vic 3056.

In cases where it is not clear in which Section the article would be best placed, the Editors will decide after considering the authors' preference. A non-refundable handling charge of \$33 (including GST) must accompany all manuscripts.

All submissions are peer-reviewed. The *Journal* reserves the right to reject any manuscript.

Covering letter

Manuscripts must be accompanied by a letter to the Editor, signed by all coauthors. It must include:

- information on prior or duplicate publication or submission elsewhere of any part of the paper;
- a statement of financial or other relationships that might lead to a conflict of interests;
- a statement that the manuscript has been read and approved by all authors; and
- the name of and contact information for the corresponding author, who is responsible for communicating with the other authors about revisions and final approval of the proofs.

The letter should give any additional information that may be helpful to the Editor, such as the number of words and which one of the four types of article is intended.

Copyright

Submission of a manuscript will be held to imply that it is the unpublished original work of the author(s) and, if accepted, will not be published elsewhere in whole or in part without permission. It will also be held to imply that all authors have read the manuscript and have consented to its submission for publication. Copyright, including the right to reproduce the article in all forms and media, is assigned exclusively to the *Australian Veterinary Journal*. The Editors will not refuse any reasonable request by the author(s) seeking to reproduce part or all of any article, provided that the source is appropriately acknowledged.

Animal welfare

The handling and use of animals in experiments must conform to the *Australian code of practice for the care and use of animals for scientific purposes, 6th edn*, National Health and Medical Research Council, 1997.

Authorship

Eligibility for authorship should be based only on substantial contributions (a) to conception and design, or analysis and interpretation of data; (b) to drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and (c) on final approval of the version to be published. Conditions (a), (b) and (c) must all be met. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the article. General supervision of the research group or participation in the acquisition of funding or the collection of data do not in themselves justify authorship.

Manuscript

Submit the manuscript in triplicate. Type it on one side of A4 paper, with 10 cpi font, leaving a left-hand margin of 3 cm and numbering every fifth line. Use double spacing throughout, including title page, abstract, text, acknowledgments, references, tables and legends for illustrations. Do not underline anything. Number all pages. Keep copies of everything submitted.

Once the *Journal* has accepted and edited the manuscript, the author will be required to send a copy of the finalised manuscript as an email attachment to avisc@ava.com.au (Scientific) or desktop@ava.com.au (Clinical). Alternatively a version can be provided on a computer diskette, preferably in PC format. Acceptable word processing programs are WordPerfect and MS Word. If you use a Macintosh send your manuscript as an email attachment or on a PC formatted disc.

Language

Use concise English without jargon or colloquialisms. Avoid repetitive use of long sentences and the passive tense. Reading the text aloud helps with punctuation and finding the right syntax. The spelling should conform to that of the *Concise Oxford Dictionary*. It is recommended that the text be run through computer spelling and grammar programs. Pay attention to the readability index available in word processing programs. It is important to have the manuscript critically read by a senior colleague, who is not directly involved in the study, before submitting it to the *Journal*. Poorly presented manuscripts reflect badly on the submitter and their host institution.

Title

The title should be short, specific and informative but should not make an assertive claim about the conclusions of the study. Avoid including locations unless they are of epidemiological significance. Type the title in bold letters at the head of the first page with only the initial letter capitalised.

Authors' names and addresses

Give initials and surnames in capitals without stops. Separate the authors' names with a comma, except the names of the penultimate and ultimate author, which are separated with 'and' in lower case letters. Type a single full postal address below the authors' names. If there is more than one address, provide all as footnotes. An address for reprint requests may be given as a footnote. Footnotes are separated from the text with a horizontal line and marked with superscript lower case letters.

Layout

Refer to specific instructions for each type of article. Do not number subheadings, paragraphs or itemised lists in the text. Do not end headings with stops. Headings are typed in bold. Subheadings should be brief. Only the first letter is capitalised. First-order subheadings are typed on a separate line. They are positioned at the left margin and italicised. Second-order subheadings are indented, italicised and followed by a dash to separate them from the text, which follows on the same line. Mention the manufacturer and the essential information on drugs, reagents and equipment in parentheses within the text. Details on commonly used and well-known materials may not be necessary.

Tables

Type each table on a separate page double-spaced. Number tables in Arabic in the order they are referred to in the text. Each table should have a brief title that describes its content adequately. Information in the table must not be repeated in detail in the text. Tables should contain sufficient information to be understood without reference to the text.

Do not use vertical lines. Use horizontal lines to separate the table from the title, and footnotes and headings from data. Type the electronic presentation of data across the rows, not down the columns. Capitalise only the initial letter of column and line headings. Use superscript lower case letters to mark footnotes and superscript capital letters to mark statistical significance.

Figures

Both black and white and colour photographs are acceptable. Colour illustrations are produced at no cost to the author. Figures, including graphs, drawings and photographs may be provided as directly reproducible glossy prints or colour transparencies. Prints should be vertically orientated and in single or double column widths. Standard widths are 85 and 177 mm. Submit figures in duplicate, except slides. Enclose two print copies of each slide.

Figures can be submitted in digital form as separate files. They should be saved as TIFF, JPEG or EPS files in at least 300 dpi density. Enclose two paper copies of each figure.

Use a consistent style of lay-out, lettering, symbols and thickness of lines. Lettering should be sans-serif, preferably Helvetica. Include photographs if they are informative and necessary for the understanding of the text. Magnification may be shown by a scale bar. Mark the name of the author and the number and orientation of the figure on the back using a self-adhesive label. Write legends for figures and explanations of symbols on a separate page. Legends should contain enough information to make the figure comprehensible without reference to the text.

Digital manipulation of an image is only acceptable if it is done to enhance photographic density or to eliminate artefacts. Any digital manipulation must be mentioned in the legend of the figure. The author(s) must also state in the covering letter that the scientific content of the image has not been altered. The *Journal* may need to examine the original image.

References

Please use references judiciously. Cite only those publications that are essential for the understanding of the study. It is often practical to cite a review, instead of listing several publications with similar findings. Ten references should suffice for a short study. Usually only a review article needs to contain

more than 25 references. Number text references consecutively, in the order in which they are mentioned, by superscript Arabic numerals. References cited only in tables or in figure legends are numbered according to the first identification of the table or figure in the text. Write and number the reference list in the sequence of the references in the text. References to journals, books, conference proceedings, organisational papers, anonymous editorials, foreign language articles and internet web sites, respectively, are written as follows:

1. Gibson KT, Hodge H, Whitten T. Inflammatory mediators in equine synovial fluid. *Aust Vet J* 1996;73:148-151.
2. Peterson ME, Randolph JF, Mooney CT. Endocrine diseases. In: Sherding RG, editor. *The cat: diseases and management*. 2nd edn. Churchill Livingstone, New York, 1994:1403-1506.
3. Rhodes AP. Infectious bovine keratoconjunctivitis vaccination. In: *Proceedings of the 23rd Seminar, Sheep and Beef Cattle Society*, New Zealand Veterinary Association, June 1993.
4. Australian Veterinary Association. Tethering of sows and sow stalls. In: Greenwood PE, editor. *Members' directory and policy compendium*. 1997:B5.
5. Where do we stand on manpower? [editorial] *Vet Rec* 1995;137:1.
6. Homberger FR. Mäusehepatitis-Virus. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1996;138:183-188.
7. Council of Docked Breeds. *The case for docking*. <http://www.cdb.org>. 1992. Retrieved 15 October 2001.

List all authors if there are five or fewer. When there are more than five authors, list only the first three and add 'et al'. Write titles of books, journals and other publications in italics. Capitalise only the first letter of the book titles. Do not underline or use bold letters.

The abbreviation of journals follows that of *Serial sources for the BIOSIS previews database*. Cite references to unpublished work only in the text, with a notation of (personal communication) or (unpublished). Please send a copy of any cited work that is included in the reference list as 'in press'. It is the authors' responsibility to check the accuracy of reference citations.

Units and numbers

Use SI units.

Write dates in the form 10 April 1996.

Spell out one-digit numbers if they are used for counting (three sheep, five paddocks) but not those used with a SI (5 mL, 9 m) or time unit (5 days, 7 weeks) or as an attribute (farms 7 and 9). If you start a sentence with a number, spell it out.

Acknowledgments

Acknowledge significant intellectual, technical and financial contributions. A short work warrants short acknowledgments.

Types of articles

Original articles

Original articles for both the Scientific and Clinical sections should have a structured abstract of no more than 250 words. The subdivision is up to the author, but should encompass the Objective, Design, Procedure, Results and Conclusion. Write subheadings in lower case bold letters, followed by the text on the same line. List nonstandard abbreviations and their explanations after the abstract. Use only the abbreviated form in the text. Avoid use of abbreviations in the abstract.

The main headings, following an untitled introduction, are Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgments and References. The introduction should

state the purpose of the study. The contents of Materials and methods should enable others to reproduce the work. Present the findings in Results concisely and logically. Evaluate and interpret the findings in the Discussion, but do not present new data. If possible, write the main conclusions at the end of the Discussion. Headings may vary from standard if the variation makes the article more informative.

Case reports

Provide a concise, unstructured summary of no more than 200 words. The main headings, following an untitled introduction, are Case report, Discussion, Acknowledgments and References.

An untitled introduction should indicate the importance of the case and why it is worth reporting. This rationale of what is interesting and relevant may contain some evidence from published articles to substantiate the claim that the case is important, however a full review of the literature is not warranted.

A description of the case should include:

- History and description of animals
- Clinical features
- Diagnosis
- Interventions and procedures
- Outcome

Description should be adequate, brief and clear. The clinical features should be only those needed to convince readers that the case is what it is claimed to be and that other plausible diagnoses have been excluded. Normal range of values for any laboratory tests conducted must be included.

The case should be discussed in the light of relevant published work. The width and depth of the search of publications should be described but only findings that are relevant to the case should be discussed. If authors think a full review is necessary, then they should consider two manuscripts — a case report and a review. However, initial submission of a synopsis of a review is required.

Authors should discuss:

- The evidence that the case is what they believe it to be
- How their observations and the results of tests support their diagnosis, treatment and recommendations
- Are other plausible explanations considered and refuted?
- Are other contradictory observations or evidence explained?
- Implications and relevance of the case
- Lessons learnt from the case for investigation or management of similar cases.

Submissions will be subject to the *Journal's* usual peer review and editorial process. A submission by a student who is the sole author of a case report should be accompanied by a letter from the Head of Department or Dean, who verifies that the report has been generated by the student's endeav-

ours. Students are advised to consult with all clinicians who have responsibility for the case during its time in the university clinic and those staff who contributed in any significant way to case management.

Review articles

Reviews on a specific topic are either invited or offered by an author or a group of authors. In the latter case we recommend that the author(s) contact the editor to inquire if the topic is of interest to the *Journal* and often request a synopsis of the review to be sent for scrutiny before the author(s) undertake writing the full version.

A review article may be a critical review, where the author(s) draw totally new conclusions on the basis of previously published information, a state-of-the-art review, where current literature on a topic is surveyed and analysed, or a combination of the two.

A review should articulate a clear question or a set of questions. Pertinent published (sometimes unpublished) evidence should be found, selected and presented in an unbiased and reproducible way. If pooling of data is possible and needed, it should be determined if there is enough consistency in the studies to warrant such an approach. Characterise findings in a way that is statistically valid and present a conclusion that readers can verify for themselves. Thus the reviewer should adhere to the same scientific principles in summarising studies that are required of authors of original papers. A review should include the following information: objective, data sources, data extraction (methods of assessing the quality, validity and application of the data), data synthesis (main results) and conclusions.

A review should be written mainly in the present tense since it predominantly surveys published, and therefore established, information.

Short contributions

The length of a short contribution should not exceed one printed page (about 1350 words) including any figures and tables. Short contributions do not have an abstract or subheadings, except References. Short contributions may be submitted to either the Scientific or Clinical sections. They are appropriate for reporting prospective studies or case reports in which the scope of the study does not justify a full article. The concise nature of short contributions may enable faster publication following acceptance.

Invited contributions

Editors will from time to time invite and provide specific guidelines for contributions to the following:

- Editorials
- Leading articles
- Viewpoints
- Diagnosis and therapy
- Book reviews

Anexo 3. Análises OEM.

 FERQUIMA	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA
ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA (*)	

Nome do Componente	% (**)
Terpinen-4-ol	42
γ -terpineno	21
α -terpineno	10
α -terpineol	4
Terpinoleno	3
α -pineno	3
p-cimeno	3
1,8-cineol	1
Limoneno	1

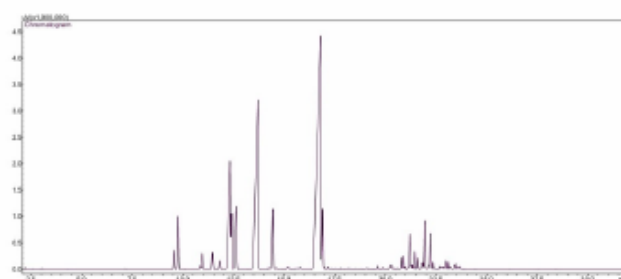


Tabela 1 – Resultados analíticos para o material.

Compostos	Fórmula Molecular	Teor (%)
alfa-tujeno	C ₁₀ H ₁₆	0,88
alfa-pineno	C ₁₀ H ₁₆	2,59
sabineno	C ₁₀ H ₁₆	0,15
beta-pineno	C ₁₀ H ₁₆	0,70
beta-mirceno	C ₁₀ H ₁₆	0,81
alfa-felandreno	C ₁₀ H ₁₆	0,46
alfa-terpineno	C ₁₀ H ₁₆	9,63
p-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	2,39
eucaliptol (1,8-cineol)	C ₁₀ H ₁₈ O	1,50
limoneno	C ₁₀ H ₁₆	0,50
gamma-terpineno	C ₁₀ H ₁₆	20,50
alfa-terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	3,37
Terpineno-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	41,00
alfa-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	2,78
alfa-gurjuneno	C ₁₅ H ₂₄	0,43
beta-cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	0,44
aromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	2,00
isoleodeno	C ₁₅ H ₂₄	0,44
aloaromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	0,25
viridiflorene	C ₁₅ H ₂₄	1,81
delta-cadineno	C ₁₅ H ₂₄	1,54
globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	0,33
viridiflorol	C ₁₅ H ₂₆ O	0,30

(*) Extraído por destilação a vapor das folhas da "*melaleuca alternifolia*"

(**) Valores Aproximados.

Anexo 4. Ficha de campo para experimento de secagem.

Número da ficha

EXPERIMENTO PUC – PARANÁ: SEC

FICHA DE CAMPO

DADOS DO DIA

D0 DATA: ____/____/____

D1 DATA: ____/____/____

D7 DATA: ____/____/____

IDENTIFICAÇÃO:

Nome:				Nº	
Idade:					
Lactação:					
Tempo de gestação:					
Tempo de secagem:					
Identificação do produto utilizado:					

DADOS DO DIA:

D0	Temperatura ambiente:	
	Umidade (%):	

D1	Temperatura ambiente:	
	Umidade (%):	

D7	Temperatura ambiente:	
	Umidade (%):	

FICHA PARA EXAME FÍSICO DO SISTEMA MAMÁRIO

PELE **D0**: _____

PELE **D1**: _____

PELE **D7**: _____

Número da ficha

TETOS: [] Supramamários [] Lesões [] NDN / Coloração **D0**: _____ Coloração **D1**: _____ Coloração **D7**: _____

Score de tetos: [] 1 [] 2 [] 3 [] 4 [] 5

Descrições: _____

Consistência e elasticidade p/ cada quarto: AE **D0**: _____ **D1**: _____ **D7**: _____

AD **D0**: _____ **D1**: _____ **D7**: _____

PE **D0**: _____ **D1**: _____ **D7**: _____

PD **D0**: _____ **D1**: _____ **D7**: _____

CMT: AE: _____ AD: _____ PE: _____ PD: _____

Anotações complementares: _____

US

DADOS:	MEDIDAS D0				MEDIDAS D1				MEDIDAS D7			
	AE	PE	AD	PD	AE	PE	AD	PD	AE	PE	AD	PD
CCT												
DRF												
EPT I												
EPT S												
DCT												

Número da ficha

Anotações complementares:

TERMOGRAFIA

	MEDIDAS D0				MEDIDAS D1				MEDIDAS D7			
DADOS:	AE	PE	AD	PD	AE	PE	AD	PD	AE	PE	AD	PD
Temperatura da base do teto												
Temperatura centro do teto												
Temperatura da ponta do teto												

Anotações complementares:

Anexo 5. Ficha de campo para o estudo de MAS

Dia	
-----	--

FICHA DE CAMPO – ESTUDO MAS

Identificação:

Vaca:		Produto:	
-------	--	----------	--

Temperatura corporal: _____ Peso: _____ ECC: _____

Tetos:

Cisternite leve ☐ Cisternite ☐ Telite ☐ Galactoflorite ☐

Hiperqueratose: ☐ n ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3

Supramamários: ☐ AE/PE ☐ PE/PD ☐ AD/PD

Úbere:

Escore de sujidade: ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4

Consistência e elasticidade:

AE	PE	AD	PD

Obs: _____

Classificação da mastite clínica:

Leve	Moderada	Grave

Catarral	Apostematosa	Flegmonosa

CMT:

AE	PE	AD	PD

Odor	Coloração

US:

	AE	PE	AD	PD
CCT				
DRF				
EPI				
EMI				
LC				
EPS				
EMS				
LT				

Obs: _____

Coleta leite: ☐ sim ☐ não

Anexo 6. Aprovação CEUA PUC-Paraná.



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA

TÍTULO DA PESQUISA	SELANTE COM ANTIBIÓTICO NATURAL PARA VACAS SECAS / INFLUÊNCIA DA ORDENHA ROBOTIZADA SOBRE OS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DO TETO BOVINO AVALIADOS PELA ULTRASSONOGRAFIA		
Nº DO PARECER / VERSÃO	01664 – 3ª VERSÃO		
PESQUISADOR RESPONSÁVEL	Rüdiger Daniel Ollhoff		
ESPECIE DO ANIMAL	<i>Bos taurus</i>	Nº DE ANIMAIS	80
NOME COMUM DO ANIMAL	Bovino / Vacas Holandesas preto e branco (HPB)/vermelho e branco (HVB)	Nº SISBIO (animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO / IDADE / PESO	Acima de 3,5 anos / $\geq$ 650kg	ATIVIDADES (animais de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	FEGA	GP TAXONÔMICOS (animais de vida livre)	Não se aplica
DATA DE INÍCIO DA PESQUISA	Abril /2019	LOCAL (IS) (animais de vida livre)	Não se aplica
DATA DE TÉRMINO DA PESQUISA	Agosto/2020	Nº SISGEN	Não se aplica
APRESENTAÇÃO DO PROJETO	No último trimestre de 2018, a aquisição de leite cru obtida em laticínios sob fiscalização no Brasil, foi de 6,70 bilhões de litros, equivalente a um aumento de 2,4%, em relação à quantidade adquirida no mesmo período de 2017 (IBGE, 2019). Para a produção de leite, é necessário haver uma fase de lactação dependente de uma prenhez e parto da vaca. No terço final da gestação, as vacas passam por um processo de secagem (interrupção da lactação), para que ocorra a involução do tecido glandular e preparo de um novo tecido para a próxima lactação, de fundamental importância para a saúde, bem-estar, produção de leite e colostro das vacas (Zanin et al. 2016). Um planejamento adequado no período seco, conhecido como período de "descanso", é uma medida para a prevenção de mastites, que uma vez manifesta, apresenta consequências econômicas diretas ao produtor (Hogeveen et al. 2011). A secagem, portanto, é considerada decisiva para uma boa recuperação geral da vaca e principalmente para a saúde do sistema mamário, pois longos períodos secos são determinantes para diminuir as incidências de mastites (Laven et al. 2014). Uma opção apresentada para a prevenção desta enfermidade, é o uso de selantes internos para tetos (SIT), os quais muitas vezes são associados a antibióticos na secagem das vacas (Golder et al. 2016). Não existem regras claras a respeito do uso somente de um, ou de outro ou mesmo, uma associação de um antibiótico com um SIT.		
OBJETIVO DA PESQUISA	Objetivo geral Avaliar o potencial de uma substância natural (óleo essencial de melaleuca), na substituição de um produto intramamário para vaca seca. Objetivos específicos: Formular um produto natural como antibacteriano intramamário para vaca seca e ação selante para o teto. Comparar o produto natural com produtos comerciais intramamários para vaca seca nos seguintes aspectos: Verificar a CCS na lactação anterior e na lactação posterior ao uso do produto teste; Verificar a prevalência de mastites na lactação anterior e na lactação posterior ao uso do produto teste; Verificar por meio de termografia se o produto teste induz um processo inflamatório no teto ou úbere; Verificar por meio da ultrassonografia se o produto teste altera estruturas anatômicas (pele, camada muscular, mucosa, canal do teto) do teto.		
RISCOS DA PESQUISA	As vacas lactantes são animais normalmente dóceis, acostumadas com o contato humano e a rotina de ordenha, incluindo a manipulação de úbere e tetos. Além do manejo rotineiro, em algumas ocasiões, inclusive na secagem (interrupção da lactação) é realizada a aplicação por via intramamária de SIT e antimicrobianos na prevenção ou tratamento da mastite. Durante a manipulação dos animais estarão devidamente contidos, então os riscos, tanto para animais quanto para humanos, durante a manipulação serão pequenos. Portanto, todos os manejos serão		

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

	realizados a base de procedimentos de biossegurança, além do conhecimento sobre comportamento animal a fim de garantir o máximo grau de bem-estar animal e humano durante os procedimentos. Possíveis processos inflamatórios do teto serão imediatamente reconhecidos pelos exames previstos e mitigados com o uso de medidas médico-veterinárias anti-inflamatórias locais ou sistêmicas. O risco de uma infecção da glândula mamária existe no período seco, independente do uso ou não de um produto intramamário. Estes justamente foram desenvolvidos, para reduzir este risco. Portanto, caso a vaca venha a desenvolver uma infecção, o que pode acontecer tanto com os produtos convencionais quanto com o natural, esta geralmente é reconhecida somente na lactação seguinte através dos parâmetros de CCS e a vaca será devidamente tratada com os protocolos usuais de cada fazenda (retirada frequente do leite, produtos antibióticos intramamários ou sistêmicos, anti-inflamatórios se necessários).
RELEVANCIA DA PESQUISA	Os estudos com óleo essencial de melaleuca em animais ainda são incipientes, existindo ainda diversas lacunas a serem exploradas, a fim de determinar a sua eficácia quanto a utilização para prevenção e tratamento de infecções bacterianas. Mediante a busca de uma produção sustentável, garantia do bem-estar animal e ainda a preocupação mundial com os resíduos e resistência a antimicrobianos, este projeto visa a avaliação do potencial de uma formulação de um produto antimicrobiano e um SIT a base de um produto natural (óleo essencial de melaleuca), com comprovadas características antimicrobianas, entre outras. O projeto foi apresentado na disciplina de "Seminário júnior" do PPGCA e foi aprovado por banca com membro externo. Ao projeto de mestrado está ligado um projeto de IC com título de "Influência da ordenha robotizada sobre parâmetros morfológicos do teto bovino avaliados pela ultrassonografia" enfocando a ultrassonografia do teto bovino.
TERMOS OBRIGATÓRIOS	De acordo.
RECOMENDAÇÕES	Não há.
CONCLUSÕES OU PENDÊNCIAS	Não há.
CONSIDERAÇÕES FINAIS	Não há.
SITUAÇÃO DO PARECER	APROVADO

CURITIBA, 13 de novembro de 2019

PROF. DR. SÉRGIO LUIZ ROCHA
Coordenador CEUA-PUCPR

PROFA. DRA. KELLY MAZUTTI MONTEIRO
Coordenadora Adjunta CEUA-PUCPR

Anexo 7. Aprovação CEUA IAPAR, Paraná.

	COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR
PARECER PARA PESQUISA COM ANIMAIS	
<i>Uso exclusivo de CEUA</i>	
Protocolo nº02/2019	Recebimento em: 12/05/2020
Nome do Projeto: SISTEMA DE PRODUÇÃO DE LEITE DE BÚFALA EM BASE AGROECOLÓGICA	
Atividade: Antibiótico natural para uso em vacas bubalinas no momento da secagem	
Pesquisador(a) Responsável: José Lino Martinez	
1. A utilização de animais na atividade proposta, incluindo, se pertinentes, os eventuais prejuízos no emprego de métodos alternativos, está claramente apresentada e justificada? ☒ (X) Sim ☐ () Não	
2. Os procedimentos experimentais, incluindo dados sobre espécie, sexo, número previsto a ser utilizado, as condições de alojamento e as manipulações experimentais estão claramente descritos? ☒ (X) Sim ☐ () Não ☐ () Parcialmente Descreva o que necessita ser melhor especificado: _____	
3. Número total de animais solicitados: _____ 69 _____ (preencher) A quantidade de animais solicitada é adequada para o desenvolvimento dos protocolos experimentais? ☒ (X) Sim ☐ () Não Justifique: _____ Contudo, para a atividade descrita não é necessário considerar os animais machos do experimento, uma vez que só foram avaliadas as fêmeas. Assim o protocolo foi alterado considerando apenas as 25 fêmeas com mais de três anos utilizadas na atividade.	
4. Os procedimentos têm o potencial de causar dor ou desconforto aos animais? ☐ () Sim ☒ (X) Não Descreva sucintamente esses procedimentos: _____ _____ _____	
5. Em caso de resposta afirmativa para o item anterior, serão empregados métodos para alívio destas condições? ☐ () Sim ☐ () Não Descreva sucintamente esses métodos: _____ _____ _____	
6. Caso não esteja previsto o emprego destes métodos, existem justificativas para tal fato? ☐ () Sim ☐ () Não Você considera essas justificativas válidas e/ou pertinentes? ☐ () Sim ☐ () Não	

INSTITUTO AGRÔNOMO DO PARANÁ – IAPAR
 Vinculado à Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento
 Rodovia Celso Garcia Cid Km 375 – C. Postal, 481 – 88001-970 Londrina – PR – Brasil
www.iapar.br – Fone: 55 43 3376 2000 – Fax: 55 43 3376-2101 – iapar@apar.br

Justifique: _____

7. Existem referências recentes em revistas de bom nível na área empregando metodologia semelhante no que concerne à experimentação animal?
(X) Sim () Não

8. Apreciação geral da solicitação: _____
A CEUA/IDR Paraná considera o presente protocolo de atividade de pesquisa adequado uma vez que o mesmo atende os princípios legais e éticos de pesquisa com animais.

9. Parecer conclusivo:
(X) Aprovado
() Aprovado com pendência
() Não aprovado
Justifique: _____

10. Esta Comissão solicita e compromete-se a manter total sigilo ao conteúdo da solicitação enviada e do parecer gerado.

Londrina, __22__ de __maio__ de __2020__

Assinaturas dos integrantes da CEUA presentes:

Nome	Assinatura
Kátia Fernanda Gobbi*	
João Ari Gualberto Hill	_____
José Lázaro da Rocha	_____
Dhalton Shiguer Ito	_____
Thiago de Oliveira	_____
Cristina Yuki Tanaka	_____

*OBS: Em função das limitações por conta da Pandemia/COVID-19 a avaliação do protocolo de pesquisa foi realizada individualmente pelos membros da CEUA e encaminhada por e-mail. Todos emitiram parecer FAVORÁVEL. A vice-coordenadora da CEUA/IDR Paraná assina o Formulário de Avaliação em nome dos demais membros da Comissão.

Anexo 8. Ficha de campo para o estudo de secagem das búfalas.

Número da ficha

EXPERIMENTO LAPA: SECAGEM BÚFALAS

FICHA DE CAMPO

DADOS DO DIA

D0 DATA: ____/____/____

D1 DATA: ____/____/____

IDENTIFICAÇÃO:

Nome:				Nº	
Idade:					
Lactação:					
Tempo de gestação:					
Tempo de secagem:					
Identificação do produto utilizado:					

DADOS DO DIA:

D0	Temperatura ambiente:	
	Umidade (%):	
	Precipitação (%):	

D1	Temperatura ambiente:	
	Umidade (%):	
	Precipitação (%):	

FICHA PARA EXAME FÍSICO DO SISTEMA MAMÁRIO

PELE **D0**: _____

PELE **D1**: _____

Número da ficha

TETOS: [] Supramamários [] Lesões [] NDN

Score de tetos: [] 1 [] 2 [] 3 [] 4 [] 5

Descrições: _____

Consistência e elasticidade p/ cada quarto: AE **D0**: _____ **D1**: _____

AD **D0**: _____ **D1**: _____

PE **D0**: _____ **D1**: _____

PD **D0**: _____ **D1**: _____

CMT: AE: _____ AD: _____ PE: _____ PD: _____

Anotações complementares:

US

DADOS:	MEDIDAS D0				MEDIDAS D1				MEDIDAS D7			
	AE	PE	AD	PD	AE	PE	AD	PD	AE	PE	AD	PD
CCT												
DRF												
EPT I												
EPT S												
DCT												

Número da ficha

Anotações complementares:

TERMOGRAFIA

	MEDIDAS D0				MEDIDAS D1			
DADOS:	AE	PE	AD	PD	AE	PE	AD	PD
Temperatura da base do teto								
Temperatura centro do teto								
Temperatura da ponta do teto								

Anotações complementares:

Anexo 9. Aprovação CEUA IDR – Pato Branco, PR.

 **IDR-Paraná**
INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO
RURAL DO PARANÁ - JORNAL - E-PROTEA

CERTIFICADO

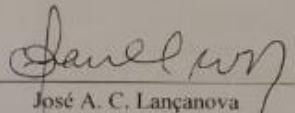
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO IDR-Paraná – IDR Paraná

1. Protocolo CEUA IDR Paraná: **02/2020**
2. Título do Projeto/ Atividade: **Unidade de pesquisa em gado de leite para o clima subtropical /Utilização de fitoterápicos no controle da mastite clínica e subclínica**
3. Identificação SEPAC (ID): Atividade no projeto **ID 252**
4. Gerente do Projeto: **Andre Luis Finkler da Silveira**
5. Resultado: **Aprovado**
6. Período de Validade: **30/11/2020 a 15/06/2021**

CERTIFICATE

COMMITTEE ON ANIMAL RESEARCH AND ETHICS – IDR

1. Protocol Number: **02/2020**
2. Research project/activity title: **Dairy cattle research unit for subtropical climate /The use of Herbal Medicines as a treatment of clinical and subclinical mastites in cows.**
3. Institutional registration number (SEPAC ID): **Activity project ID 252**
4. Project manager: **Andre Luis Finkler da Silveira**
5. Committee decision: **Approved**
6. Validity period: **from 30/11/2020 to 15/06/2021**


José A. C. Lançanova
Coordenador CEUA IDR-Paraná

Anexo 10. Resultado programa Centelha do Paraná.



Ato da Diretoria Executiva 012/2021

Ref.: Chamada Pública 03/2020 – Programa Centelha Paraná: Divulgação do RESULTADO FINAL.

A Diretoria Executiva da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná torna público o **RESULTADO FINAL** das propostas da Chamada Pública 03/2020 – Programa Centelha Paraná.

Devido às últimas informações divulgadas referentes ao aumento do número de pessoas infectadas pelo Coronavírus, a Diretoria Executiva da Fundação Araucária informa que seguirá as orientações determinadas pelo Governo do Estado do Paraná com relação ao enfrentamento dessa doença e por esse motivo os pareceres de quem protocolou o recurso dessa fase, deverão ser solicitados exclusivamente através do e-mail: centelhapr@fundacaoarauaria.org.br.

Os 30 projetos aprovados (respeitado o limite orçamentário da Chamada) e os 15 aprovados para a demanda qualificada/suplentes **terão o dia 10/02/2021 até o dia 25/02/2021**, para submissão de seus Projetos Aprovados, na Plataforma FA/Sparkx, com os ajustes no plano de trabalho e no financeiro conforme já solicitado e aprovados. Esse processo consistirá no preenchimento do projeto integralmente dentro da Plataforma FA/Sparkx, este projeto deverá ser uma cópia fiel das informações alimentada nas Fases I, II e III da plataforma Centelha/PR, para que seja possível a contratação e acompanhamento do projeto, no seguinte link: <https://sparkx.fundacaoarauaria.org.br/fappr/#/public/login>. O descumprimento dessa etapa poderá acarretar a desclassificação do projeto, acaso seja constatada alterações no projeto aprovado na Plataforma Centelha/PR com o alimentado na Plataforma FA/Sparkx poderá acarretar a desclassificação do projeto.

- Informamos que somente serão aceitas as despesas do projeto após a assinatura do contrato junto a Fundação Araucária. **Qualquer despesa anterior a isso não será aceita.** Frisamos também que qualquer compra de itens e serviços, deverá ser **precedido** pela realização de 3 cotações/orçamentos, onde deverá ser adquirido o de menor valor, em **HIPÓTESE ALGUMA** poderá ser direcionado a compra para empresa X ou Y (as menos vantajosas), e também é obrigatório a emissão da Nota fiscal em nome da Empresa Contratada pela FA. Demais informações estão no item 14 da Chamada Pública, e outras serão informadas durante a fase de contratação.

- As propostas classificadas como Suplentes poderão ser contratadas nos termos do item 3.3, do edital de Chamada Pública, na medida em que as 30 aprovadas formalizarem desistência ou forem desclassificadas nessa etapa de contratação.

www.FundacaoAraucaria.org.br



19	Plataforma Plus Brasil	Caellen Teger Da Silva	Curitiba	Tecnologia Social	R\$ 58.800,00
20	Cicloscience - Produção E Aplicação De Ciclodextrinas	Graciete Matioli	Maringá	Biotecnologia E Genética	R\$ 52.000,00
21	Covision - Plataforma De Inteligência Artificial De Monitoramento	Flávio Henrique Da Silva	Curitiba	Inteligência Artificial E Machine Learning	R\$ 28.000,00
22	Muliagro Mudas - Tecnologia Em Produção De Mudas	Mariana Almeida Franca	Curitiba	Biotecnologia E Genética	R\$ 59.460,00
23	Siga - Sistema De Integridade, Gestão E Acompanhamento	Andréa Leoni	Curitiba	Tecnologia Social	R\$ 60.000,00
24	Reviravolta Local	João Paulo Lacerda Rocha Mehl	Curitiba	Ti E Telecom	R\$ 49.500,00
25	Dispositivo Localizador Inteligente	Robison Cris Brito	Pato Branco	Tecnologia Social	R\$ 59.098,79
26	Iot Analytics Para Auditoria De Eficiência Energética Continua Iot-Aee	Valentin Nicolas Silvera Diaz	Foz Do Iguaçu	Internet Das Coisas (Iot)	R\$ 56.273,00
27	Pdt Cure-Estratégias Fotodinâmicas Para Tratamento De Feridas Crônicas	Kelly Cristina Nogueira Soares	Guarapuava	Química E Novos Materiais	R\$ 58.896,00
28	Automação Predial Para Corporações	Heitor Henrique Freire Ams	Londrina	Internet Das Coisas (Iot)	R\$ 55.500,00
29	Qr Estoque E Vendas	Flávio Henrique De Oliveira	Londrina	Ti E Telecom	R\$ 44.690,00
30	Peephole – Observe A Natureza	Hellen De Almeida Vienna	Curitiba	Geoengenharia	R\$ 44.287,80
SUPLENTES-DEMANDA QUALIFICADA					
31	Lz Energia - Otimizador De Combustão Interna	Igor Zornitta Zanella	Maringá	Mecânica E Mecatrônica	R\$ 55.930,20
32	Sangue Bom	John Marlon Carvalho Tonete	Campo Mourão	Tecnologia Social	R\$ 58.857,00
33	Me-Au: Aplicativo De Serviços Integrados Para Pets	Guilherme Luis Salkovski	Curitiba	Tecnologia Social	R\$ 36.400,00
34	Lençol Sensorizado Para A Mensuração De Peso Por Superfície De Contato	Patrick Ribeiro	Curitiba	Internet Das Coisas (Iot)	R\$ 60.000,00
35	Dispositivo Em Titânio Para Ganho Ósseo E Fixação De Implante Dentário	Flávio Sadamo Micima	Curitiba	Tecnologia Social	R\$ 59.931,95
36	Fitoterápico Intramamário Para Vacas De Leite	Bruno Inácio Corrêa De Oliveira	Fazenda Rio Grande	Química E Novos Materiais	R\$ 43.673,99
37	Análises De Fluxos Viários C/ Base Em Inteligencia Artificial	Carlos Andre Fortes Da Rocha	Medianeira	Inteligência Artificial E Machine Learning	R\$ 29.424,80

www.FundacaoAraucaria.org.br