



Avaliação da toxicidade de compostos bioativos contra patógenos causadores de mastite em células epiteliais mamárias bovinas

Evaluation of the toxicity of bioactive compounds against mastitis-causing pathogens in bovine mammary epithelial cells

Alcione Santa Catarina¹  , Rafaelly Silva Lima Oliveira²  , Pamela Thaiany Filgueira da Silva²  , Dalila Moter Benvegnú¹  , Karina Ramírez Starikoff¹  , José Augusto Ferronatto³  , Marta Lizandra do Rêgo Leal⁴  , Luciana Bignardi de Soares Brisola Casimiro da Costa⁵  , Karla Patrícia Chaves da Silva²  , Alice Maria Melville Paiva Della Libera³  , Fernando Nogueira Souza^{2,3}  , Maiara Garcia Blagitz*^{1,3} 

1 Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Realeza, Paraná, Brasil 

2 Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Viçosa, Alagoas, Brasil 

3 Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil 

4 Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil 

5 The Ohio State University, Columbus, Ohio, EUA 

*autor correspondente: maiara.azevedo@uffs.edu.br

Recebido: 18 de fevereiro de 2025. Aceito: 13 de junho de 2025. Publicado: 28 de agosto de 2025. Editor: Luiz Augusto B. Brito

Resumo: A mastite bovina representa um desafio econômico significativo na produção leiteira, sendo responsável pelo uso extensivo de antimicrobianos, que representam aproximadamente 60% de todos os antibióticos administrados em vacas leiteiras, aumentando a pressão seletiva de bactérias resistentes aos antimicrobianos. Todavia, o uso de compostos terapêuticos alternativos tem se mostrado uma opção promissora. O objetivo deste estudo foi investigar a citotoxicidade da nisina e de três óleos essenciais de origem vegetal oriundos da *Melaleuca alternifolia*, *Syzygium aromaticum* e *Citrus sinensis*, em células epiteliais mamárias bovinas imortalizadas (células MAC-T), por meio do ensaio de redução de dimetiltiazol-2-il e 2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT). Ademais, a atividade antimicrobiana foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) contra os principais patógenos da mastite bovina. Os resultados demonstraram que, embora os óleos essenciais de origem vegetal tenham apresentado atividade antimicrobiana contra os patógenos principais da mastite bovina, sua aplicação clínica seria inviabilizada pela elevada citotoxicidade observada em concentrações antimicrobianas eficazes. Por sua vez, a nisina destacou-se por apresentar eficácia antimicrobiana associada a segurança *in vitro*, preservando a viabilidade das células epiteliais mamárias em todas as concentrações testadas, evidenciando assim o potencial dessa bacteriocina no tratamento de infecções intramamárias em bovinos leiteiros. Futuros estudos, que envolvam a utilização antimicrobiana dos óleos essenciais de origem vegetal aqui analisados, deverão focar na identificação das moléculas específicas responsáveis pela atividade antimicrobiana, visando desenvolver formulações eficazes e menos agressivas. Portanto, a avaliação da citotoxicidade torna-se fundamental para o uso clínico seguro de antimicrobianos alternativos.

Palavras-chave: antimicrobianos alternativos; bacteriocina; citotoxicidade; infecção intramamária.



Abstract: Bovine mastitis represents a significant economic challenge in dairy production and is responsible for the extensive use of antimicrobials, accounting for approximately 60% of all antibiotics administered to dairy cows. This contributes to the selective pressure for antimicrobial-resistant bacteria. However, the use of alternative therapeutic compounds has emerged as a promising strategy. The aim of this study was to investigate the cytotoxicity of nisin and three plant-derived essential oils from *Melaleuca alternifolia*, *Syzygium aromaticum*, and *Citrus sinensis* in immortalised bovine mammary epithelial cells (MAC-T cells), using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. Furthermore, antimicrobial activity was assessed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against the bovine major mastitis pathogens. The results demonstrated that, although the plant-derived essential oils exhibited antimicrobial activity against the major mastitis pathogens, their clinical application would be limited due to the high cytotoxicity observed at effective antimicrobial concentrations. In contrast, nisin showed notable antimicrobial efficacy combined with *in vitro* safety, preserving the viability of mammary epithelial cells at all tested concentrations. This highlights the potential of this bacteriocin for the treatment of intramammary infections in dairy cattle. Future research involving the antimicrobial application of the essential oils analysed in this study should focus on identifying the specific molecules responsible for the antimicrobial activity, with the aim of developing effective and less cytotoxic formulations. Therefore, cytotoxicity assessment is essential to ensure the safe clinical use of alternative antimicrobials.

Key-words: alternative antimicrobials; bacteriocin; intramammary infection; cytotoxicity.

1. Introdução

A mastite bovina, inflamação da glândula mamária, é reconhecida como um dos principais entraves à eficiência produtiva na pecuária leiteira, com consequências econômicas significativas⁽¹⁾. Esse processo inflamatório resulta na redução do volume e qualidade do leite, no aumento do descarte precoce de animais e na elevação dos custos com tratamentos e assistência veterinária, comprometendo diretamente a sustentabilidade da produção e a competitividade do setor⁽¹⁾. Estudos indicam que aproximadamente 60% dos antimicrobianos utilizados em bovinos leiteiros adultos são destinados ao tratamento e prevenção da mastite⁽²⁾. O uso frequente e, muitas vezes, inadequado desses medicamentos tem contribuído para a seleção de bactérias resistentes⁽²⁾. Portanto, a preocupação global com a resistência antimicrobiana tem impulsionado a busca por alternativas terapêuticas seguras e eficazes no controle da mastite^(2, 3).

Nesse contexto, o potencial uso dos antimicrobianos alternativos tem emergido como uma abordagem promissora, visando reduzir a dependência de antibióticos convencionais e minimizar os impactos negativos associados à resistência antimicrobiana^(2, 3, 4). Os óleos essenciais de origem vegetal - melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e laranjeira (*Citrus sinensis*) - analisados neste estudo, são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias e amplamente empregados em pesquisas científicas^(5, 6, 7, 8, 9, 10). Por sua vez, a nisina, produzida por bactérias da espécie *Lactococcus lactis*, comumente utilizada como conservante alimentar, tem sido recentemente explorada para fins terapêuticos, em função de seu elevado potencial antimicrobiano e excelente perfil de segurança^(11, 12, 13, 14).

Embora diversos autores tenham investigado a atividade antimicrobiana de compostos terapêuticos alternativos contra patógenos causadores de mastite, a avaliação de sua segurança em células epiteliais mamárias bovinas tem recebido pouca atenção^(3, 10). Diante disso, o objetivo do presente estudo foi

verificar viabilidade de células epiteliais mamárias bovinas após essas serem tratadas com diferentes concentrações destes quatro compostos, possibilitando assim a mensuração do potencial citotóxico de cada composto. A determinação prévia da atividade antimicrobiana de cada composto pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) contra os principais patógenos da mastite bovina, constituiu uma etapa inicial fundamental para definir as concentrações a serem utilizadas para a avaliação da citotoxicidade dos compostos em células epiteliais mamárias.

2. Material e métodos

2.1 Delineamento experimental

Inicialmente, foi realizada uma avaliação da atividade antimicrobiana da nisina e dos óleos essenciais de origem vegetal frente a seis patógenos principais da mastite bovina, com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), em seguida, células epiteliais mamárias foram tratadas com as mesmas concentrações dos compostos para determinação da citotoxicidade em células epiteliais mamárias.

2.2 Seleção dos compostos antimicrobianos

A seleção dos compostos utilizados nesse estudo se deu em razão de seu conhecido potencial antimicrobiano^(6, 8, 14). A bacteriocina nisina (cód. N5764), utilizada nesse estudo, foi adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich® (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Por sua vez, os óleos essenciais foram extraídos pelos próprios pesquisadores, atendendo às normas técnicas aplicáveis⁽¹⁵⁾, utilizando a técnica de hidrodestilação com aparelho graduado tipo Clevenger, com exceção do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) que, em razão da indisponibilidade da planta na região onde foi realizada a pesquisa, foi adquirido comercialmente da Lazlo (Lazlo Aromaterapia® Belo Horizonte - MG, Brasil), que realizou a extração do mesmo, a partir das folhas da planta, utilizando o método de destilação de arraste a vapor⁽¹⁶⁾. O óleo essencial de laranjeira (*Citrus sinensis*) foi extraído das folhas da planta, colhidas entre os meses de março e abril de 2018 (final do verão/início do outono), já o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), foi extraído dos botões florais, adquiridos comercialmente em uma loja de produtos naturais. Para garantir a padronização das concentrações testadas, bem como avaliar de forma mais precisa a atividade intrínseca de cada composto, sem a interferência de componentes secundários presentes em extratos brutos, optou-se por trabalhar com os compostos na forma pura. A purificação de todos os óleos essenciais foi realizada conforme descrito por Silva e colaboradores⁽¹⁷⁾.

2.3 Seleção dos patógenos

A escolha dos patógenos utilizados nesse estudo, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* e *Prototheca sp.*, se deu em razão de serem considerados os principais patógenos da mastite bovina^(1, 18, 19) e, corroborado ainda, por alguns patógenos apresentarem baixa ou nenhuma resposta à terapia antimicrobiana convencional, a exemplo de *S. aureus*, *Klebsiella sp.*^(4, 19) e *Prototheca sp.*⁽²⁰⁾. Os microrganismos foram isolados de casos de mastite subclínica (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* e *Prototheca sp.*) e mastite clínica (*Escherichia coli* e *Klebsiella sp.*) por pesquisas anteriores do nosso grupo de pesquisa, se encontravam acondicionados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 20% de glicerina estéril, e armazenados a -80°C até a realização do experimento. A preparação dos inóculos microbianos foi realizada conforme previamente descrito por nosso grupo de pesquisa⁽¹⁹⁾.

2.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada composto foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo que estava sendo avaliado. Para tal, viabilidade celular foi aferida usando o ensaio de resazurina (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), conforme descrito por Araujo e Longo⁽²¹⁾, seguindo as diretrizes do BrCAST - *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*⁽²²⁾.

2.5 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi definida como a menor concentração capaz de promover a morte do microrganismo avaliado. Após a aferição da CIM, alíquotas eram retiradas dos poços em que não havia crescimento microbiano visível, cultivadas em placas contendo Ágar Mueller Hinton ou Sabouraud Dextrose para *Prototheca* sp, conforme metodologia descrita por Silva e colaboradores⁽¹⁰⁾, seguindo as diretrizes do BrCAST⁽²²⁾, e se não houvesse crescimento microbiano a CBM era confirmada.

2.6 Teste de citotoxicidade

Foi utilizada uma linha clonal de células epiteliais mamárias bovinas, originadas de células primárias alveolares (MAC-T), importadas e depositadas por nossa equipe no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células MAC-T foram cultivadas em meio Eagle, modificado por Dulbecco DMEM (cat nº D5796, Sigma-Aldrich, San Louis, Missouri, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (cat nº F9665, Sigma Aldrich®, Missouri, San Louis, EUA); 100 UI/mL de penicilina; 100 µg/mL de estreptomicina; 0,25 µg/mL de fungizona (cat nº 15240-062, Life Technologies®, Pasley, Reino Unido); 5 µg/mL de insulina e 1 µg/mL de hidrocortisona, conforme previamente descrito por nosso grupo de pesquisa⁽¹⁹⁾.

As células MAC-T foram acondicionadas placas de 96 poços, ajustadas para a concentração de 5 x 10⁵ células/poço e suplementadas com as concentrações bacteriostáticas e bactericidas mínimas dos respectivos compostos (nisina e óleos essenciais de melaleuca, laranjeira e cravo), obtidas na aferição da CIM e CBM, que foi realizado em quintuplicata. Após a suplementação, as placas foram incubadas à 37 °C, sob 5% de CO₂, por 16 h.

O teste de citotoxicidade consistiu em avaliar a atividade mitocondrial das células MAC-T, após o tratamento com as diferentes concentrações dos compostos avaliados, através do método de redução de dimetiltiazol-2-il e 2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT), descrito por Supino⁽²³⁾. Tal método possibilitou a mensuração da conversão intracelular de MTT em cristais insolúveis de formazan (de coloração azul ou roxa), quantificados em espectrofotômetro com filtro de 562 nm, refletindo a viabilidade celular após a exposição aos compostos e, consequentemente, o efeito citotóxico de cada concentração.

3. Resultados e discussão

Os resultados do presente estudo reforçaram a conhecida capacidade microbicida dos compostos essenciais estudados contra os patógenos causadores de mastite (Tabela 1). Por exemplo, achados do óleo de cravo são compatíveis com estudos anteriores que atribuem essa atividade ao eugenol, seu principal componente⁽⁷⁾. O óleo de Laranjeira foi mais eficaz contra *S. aureus* e *Prototheca* sp., contudo apresentando desempenho reduzido frente à bactérias Gram-negativas (Tabela 1), exigindo concentrações mais elevadas, e o óleo de laranjeira apresentando os piores resultados, com altas CIMs e CBMs contra *E. coli* e *Klebsiella* sp., o que pode estar relacionado à menor penetração de seus princípios ativos nesses microrganismos^(7,9).

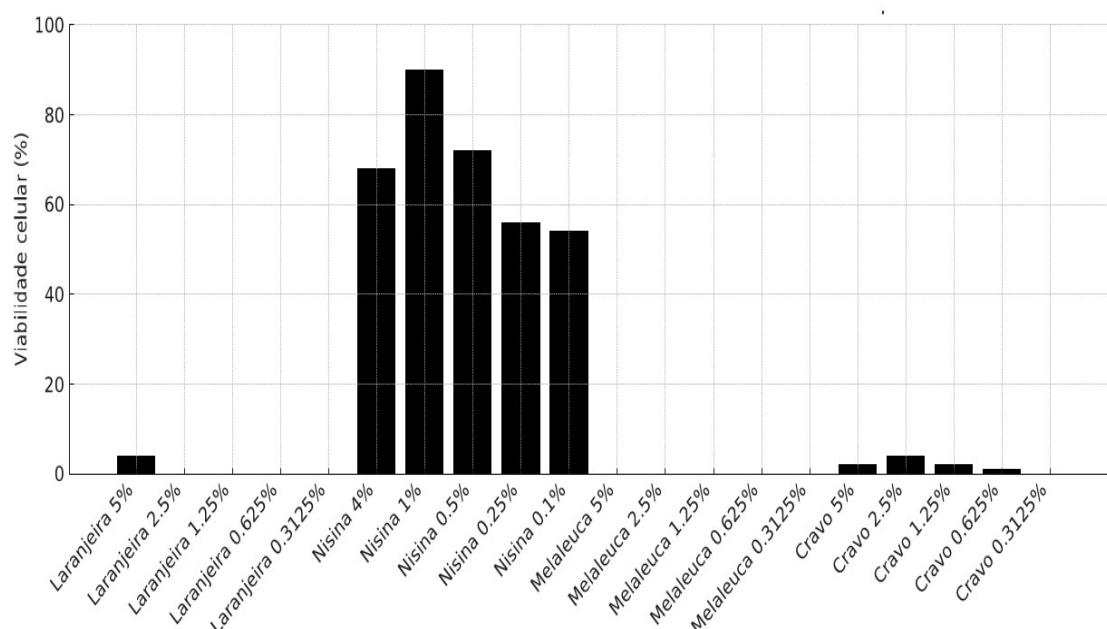
Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), em porcentagem, de diferentes antimicrobianos alternativos contra os patógenos causadores de mastite bovina.

	CIM Cravo	CBM Cravo	CIM Mel.	CBM Mel.	CIM Lar.	CBM Lar.	CIM Nis.	CBM Nis.
<i>S. agalactiae</i>	0,0097	0,0097	0,3125	1,2500	0,1563	0,6250	0,0039	0,1250
<i>S. aureus</i>	0,3125	1,2500	0,3125	0,6250	0,6250	1,2500	0,0156	0,0625
<i>S. uberis</i>	1,2500	5,0000	2,5000	10,0000	0,6250	5,0000	4,0000	4,0000
<i>Prototheca sp.</i>	0,3125	0,6250	0,3125	0,6250	0,3125	0,6250	0,0312	2,0000
<i>Klebsiella sp.</i>	1,2500	5,0000	10,0000	10,0000	10,0000	10,0000	4,0000	4,0000
<i>E. coli</i>	0,0190	0,0190	0,6250	2,5000	5,0000	10,0000	2,0000	4,0000

Nota: CIM = concentração inibitória mínima; CBM = concentração bactericida mínima; Mel. = melaleuca; Lar. = laranjeira; Nis. = nisina. Valores em %.

A literatura sugere que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de origem vegetal resulta da combinação de moléculas que atuam de maneira sinérgica, e que essas moléculas variam em função da origem botânica, condições de cultivo e métodos de extração, no entanto, é importante considerar que a complexidade da composição química desses extratos pode representar tanto um benefício quanto uma limitação, dificultando a padronização, reproduzibilidade e o entendimento dos mecanismos de ação específicos⁽³⁾.

Embora tenham exibido atividades antimicrobianas contra os patógenos avaliados (Tabela 1), os óleos essenciais de origem vegetal - cravo, melaleuca e laranjeira — apresentaram também elevada citotoxicidade em todas as concentrações testadas (Figura 1), sugerindo que estudos futuros, envolvendo a utilização antimicrobiana de tais, devem buscar o isolamento e a caracterização de moléculas específicas, permitindo explorar seus efeitos sinérgicos, de forma a maximizar a eficácia antimicrobiana e minimizar a citotoxicidade por meio de ajustes no método de extração ou na combinação de componentes, visando à criação de formulações menos agressivas⁽³⁾. Os resultados do presente estudo não corroboram com aplicação clínica in vivo de tais óleos essenciais de origem vegetal puros, assim como foram utilizados nesse estudo, devido à sua citotoxicidade nas células mamárias bovinas, utilizadas no presente estudo (Tabela 1).

**Figura 1.** Viabilidade celular (%) da linhagem clonal de células epiteliais mamárias MAC-T tratadas com diferentes concentrações de compostos antimicrobianos alternativos — óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Syzygium aromaticum* e *Citrus sinensis* e a bacteriocina nisina — mensurada a partir de ensaio de redução de dimetiltiazol-2-il e 2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT).

Por sua vez, a nisina revelou um potencial particularmente promissor para o controle dos patógenos testados, tendo se destacado como o antimicrobiano alternativo mais eficaz, entre os compostos avaliados, considerando os resultados da CIM e CBM (Tabela 1). Similarmente, Cao e colaboradores⁽¹⁴⁾ relataram a eficácia da nisina no tratamento da mastite clínica, enfatizando seu amplo espectro contra bactérias Gram-positivas. Além disso, em contraste aos demais compostos avaliados, o tratamento com nisina foi o único que demonstrou um perfil de segurança aceitável em relação à citotoxicidade (Figura 1), tendo sido o único composto que apresentou eficácia antimicrobiana associada à manutenção da viabilidade celular.

Curiosamente, a nisina apresentou um padrão peculiar em relação à aferição das taxas de viabilidade celular, essa foi maior quando as células foram expostas à concentração intermediária de 2%, em comparação com as concentrações de 4% (mais alta) e 1% e 0,5% (mais baixas). Essa observação pode estar relacionada aos achados de Namjoo⁽²⁴⁾, que descreveu o efeito antiapoptótico e indutor da proliferação celular da nisina em células-tronco mesenquimais (MSCs) de forma dose-dependente. Estudos anteriores também apontam para a nisina como agente promotor de proliferação celular e aumento da vida útil das células^(25,26). Tal achado pode ter sido observado em razão do método de aferição da viabilidade celular adotado, o ensaio de redução de MTT, que quantifica a conversão de MTT em cristais de formazan, refletindo a atividade mitocondrial e a viabilidade das células⁽²³⁾, consequentemente, a possível proliferação celular induzida pela nisina, resultaria em aumento da taxa de viabilidade celular à aferição. Além dos efeitos citoprotetores e citoproliferativos, já mencionados, Gao e colaboradores⁽²⁶⁾ relataram ainda que a nisina foi capaz de modular o microbioma bucal provendo a saúde e estimular um novo fenótipo proliferativo em células do tecido conjuntivo reparador, quando associada ao tratamento de casos de doença periodontal.

4. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que, embora tenham apresentado efeitos antimicrobianos relevantes contra alguns dos principais patógenos da mastite bovina, os extratos de origem vegetal (óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Syzygium aromaticum* e *Citrus sinensis*) apresentaram elevada citotoxicidade em células epiteliais mamárias, inviabilizando a terapia *in vivo*. Apenas a nisina, um composto de origem bacteriana, demonstrou eficácia no controle microbiano aliada à manutenção da viabilidade celular. Tais resultados, evidenciam a aplicabilidade e custo-benefício favoráveis do uso da nisina no tratamento de infecções intramamárias em bovinos leiteiros. Estudos futuros, que envolvam a utilização antimicrobiana dos óleos essenciais de origem vegetal aqui analisados, deverão focar na identificação de moléculas específicas, visando desenvolver formulações mais puras, seguras e eficazes.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Declaração de disponibilidade de dados

O conjunto completo de dados que suporta os resultados deste estudo está disponível mediante a solicitação ao autor correspondente.

Contribuições do autor

Conceitualização: Santa Catarina, A. Metodologia: Santa Catarina, A.; Benvegnú, D M; Starikoff, K R; Blagitz, M G; Souza, FN; Ferronatto, JA. Investigação: Santa Catarina, A.; Benvegnú, D M; Starikoff, K R; Ferronatto, JA. Supervisão: Blagitz, M G; Benvegnú, DM; Souza, FN; Della Libera, AM M P; Casimiro da Costa, L B S B; Leal, ML R. Redação: Santa Catarina, A.; Oliveira, R S L; Silva, P T F; Silva, KP C; Souza, FN. Revisão e edição: Souza, FN; Blagitz, M G.

Referências

1. Khasapane, NG, Byaruhanga, C, Thekisoe, O, Nkhebenyane, SJ, Khumalo, ZTH. Prevalence of subclinical mastitis, its associated bacterial isolates and risk factors among cattle in Africa: a systematic review and meta-analysis. *BMC Veterinary Research*. 2023; 19(1):123. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-023-03673-6>
2. Stevens, M, Piepers, S, Supré, K, Dewulf, J, De Vliegher, S. Quantification of antimicrobial consumption in adult cattle on dairy herds in Flanders, Belgium, and associations with udder health, milk quality, and production performance. *Journal of Dairy Science*. 2016; 99(3): 2118-2130. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10199>
3. Ucella-Filho, JGM, Ferreira, NS, Alves, MR, Ignacchiti, MDC, Dias, JAFJR, Resende, JA. Evaluation of natural products as therapeutic alternatives for bovine mastitis and implications for future research. *South African Journal of Botany*. 2024; 167: 310-332. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0254629924001297?via%3Dhub>
4. Jong, E, McCubbin, KD, Speksnijder, D, Dufour, S, Middleton, JR, Ruegg, PL, Lam, TJGM, Kelton, DF, McDougall, S, Godden, SM, Lago, A, Rajala-Schultz, PJ, Orsel, K, De Vliegher, S, Krömker, V, Nobrega, DB, Kastelic, JP, Barkema, HW. Invited review: Selective treatment of clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 2023. 106(6): 3761–3778. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22826>
5. Federman, C, Joo, J, Almario, JA, Salaheen, S, Biswas, D. Citrus-derived oil inhibits *Staphylococcus aureus* growth and alters its interactions with bovine mammary cells. *Journal of Dairy Science*. 2016. 99(5): 3667-3674. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10538>
6. Nazzaro, F, Fratianni, F, De Martino, L, Coppola, R, De Feo, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. 2013. 6(12): 1451–1474. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
7. Carson, CF, Hammer, KA, Riley, TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006. 19(1): 50–62. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006>
8. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004. 94(3): 223–253. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
9. Lopes, TS, Fontoura, PS, Oliveira, A, Rizzo, FA, Silveira, S, Streck, AF. Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*. 2020. 131: 186-193. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>
10. Silva, AA, Bergamo, L, Camargo, LP, Fernandes, C, Mussato, D, Canazart, D, Abreu Filho, BA. Atividade microbiológica de óleos essenciais obtidos por arraste a vapor. *UNINGÁ Review*. 2014. 20(3): 10. Disponível em: <https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/1604>
11. Bernbom, N, Licht, TR, Brogren, CH, Jelle, B, Johansen, AH, Badiola, I, Vogensen, FK, Nørrung, B. Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota: role of nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006. 72(1): 239–244. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.239-244.2006>
12. Deegan, LH, Cotter, PD, Hill, C, Ross, P. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*. 2006. 16(9): 1058–1071. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.026>
13. Rodriguez, Z, Cabrera, VE, Hogeveen, H, Ruegg, PL. Economic impact of subclinical mastitis treatment in early lactation using intramammary nisin. *Journal of Dairy Science*. 2023. 107(7): 4634-4645. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24311>
14. Cao, L, Huang, X, Tang, Y, Li, J, Wang, P. Nisin-induced changes in *Bacillus* morphology suggest a paradigm of antibiotic action. *International Journal of Food Microbiology*. 2007. 60: 153-161. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0608373104>
15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre os requisitos para realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. Diário Oficial da União, Brasília. 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf
16. International Organization for Standardization – ISO. ISO 9235:2021. Aromatic natural raw materials – Vocabulary. Geneva: ISO, 2021. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/76164.html>
17. Silva, R, Ribeiro, C, Borges, M, Blois, G. Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. *Química Nova*. 2009. 32(8): 2234-2237. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0100-40422009000800042>
18. Reyher, KK, Haine, D, Dohoo, IR, Revie, CW. Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science*. 2012. 95(11): 6483-6502. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5594>

19. Souza, FN, Piepers, S, Della Libera, A, Heinemann, M, Cerqueira, M, De Vliegher, S. Interaction between bovine-associated coagulase-negative staphylococci species and strains and bovine mammary epithelial cells reflects differences in ecology and epidemiological behavior. *Journal of Dairy Science*. 2016. 99(4): 2867-2874. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10230>
20. Pieper, L, Godkin, A, Roesler, U, Polleichtner, A, Slavić, D, Leslie, KE, Kelton, DF. Herd characteristics and cow-level factors associated with *Prototheca* mastitis on dairy farms in Ontario, Canada. *Journal of Dairy Science*. 2012. 95(10): 5635-5644. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5106>
21. Araujo, MM, Longo, PL. Teste da ação antibacteriana *in vitro* de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2016. 83. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1808-1657000702014>
22. BRCAST – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Documento de Ponto de Corte Clínico – Versão 2024. São Paulo: BrCAST, 2024. Disponível em: <https://brcast.org.br/>
23. Supino, R. MTT Assays. In: O'HARE, S.; ATTERWILL, C. K. (eds.). *In Vitro Toxicity Testing Protocols. Methods in Molecular Biology™*, v. 43. Totowa, NJ: Humana Press, p. 137-149. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1385/0-89603-282-5:137>
24. Namjoo, A, Salimi, A, Saeedi, P, Halabian, R, Emamgholi, A. Anti-apoptotic effect of Nisin as a prebiotic on human mesenchymal stem cells in harsh condition. *Cell and Tissue Banking*. 2022. 23(2): 227–236. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10561-021-09933-9>
25. Sadrei, F, Mirzaie, F, Najafi, M, Karimi, M, Amiri, A. Osteogenic differentiation of pre-conditioned bone marrow mesenchymal stem cells with Nisin on modified poly-L-lactic-acid nanofibers. *Regenerative Therapy*. 2022. 21: 263-270. ISSN 2352-3204. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.07.015>
26. Gao, L, Kuraji, R, Zhang, MJ, Martinez, A, Radaic, A, Kamarajan, P, Le, C, Zhan, L, Ye, C, Rangé, H, Sailani, MR, Kapila, YL. Nisin probiotic prevents inflammatory bone loss while promoting reparative proliferation and a healthy microbiome. *NPJ Biofilms and Microbiomes*. 2022. 8(1):45. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00307-x>