

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS  
OBTIDOS COM DIFERENTES SOLVENTES DE AROEIRA (*Schinus  
terebinthifolius* Raddi) E CHINCHILHO (*Tagetes minuta* Linnaeus)**

**KATIÚSCIA BARBOSA BILHALVA**

**PORTO ALEGRE**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS OBTIDOS  
COM DIFERENTES SOLVENTES DE AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) E  
CHINCHILHO (*Tagetes minuta* Linnaeus)**

**Autor:** Katiúscia Barbosa Bilhalva

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Ciências  
Veterinárias, área de Morfologia, Cirurgia e  
Patologia Animal e especialidade  
Farmacologia e Terapêutica

**Orientador:** João Roberto Braga de Mello

**Co-orientador:** Luiz Filipe Damé Schuch

**PORTO ALEGRE**

**2015**

## CIP - Catalogação na Publicação

Barbosa Bilhalva, Katiúscia

Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos obtidos com diferentes solventes de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e chinchilho (*Tagetes minuta* Linnaeus) / Katiúscia Barbosa Bilhalva. -- 2015. 156 f.

Orientador: João Roberto Braga de Mello.

Coorientador: Luiz Filipe Damé Schuch.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. *Schinus terebinthifolius* Raddi. 2. *Tagetes minuta* Linnaeus. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Óleos essenciais. 5. Solventes. I. Braga de Mello, João Roberto, orient. II. Damé Schuch, Luiz Filipe, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Katiúscia Barbosa Bilhalva

AValiação DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS OBTIDOS COM  
DIFERENTES SOLVENTES DE AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) E  
CHINCHILHO (*Tagetes minuta* Linnaeus)

Aprovada em       JAN 2015

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dra. Fernanda Bastos de Mello  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Fabrizio da Fonseca Barbosa  
Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Silvia Ladeira  
Membro da Comissão

*A minha família, aos meus amigos  
por todo amor, carinho,  
compreensão e incentivo...*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades e conquistas, pela saúde, pelos obstáculos que consegui vencer, pela força para chegar até aqui...

Agradeço a minha família, por todo o amor, dedicação e incentivo, durante todos esses anos e por me possibilitarem essa trajetória.

A minha querida amiga Fernanda Mota, que me ajudou do início ao fim desta jornada, seu apoio foi fundamental, muitíssimo obrigada!!!

As estagiárias mais do que queridas Bianca Bohm e Lisiane Lessa.

Ao meu amigo e co-orientador Prof<sup>o</sup> Dr. Luiz Filipe Damé Schuch pela competência, dedicação e companhia durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr. João Roberto Braga de Mello pelos ensinamentos, oportunidades e confiança fundamentais na realização deste projeto.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Fabrizio da Fonseca Barbosa pelas horas dedicadas a esta tese, pela paciência, compreensão, apoio, amizade a mim dedicados.

Ao Laboratório de Oleoquímica e Biodiesel da UFPel, a amiga Ana Rutz Devantier, em especial ao Prof<sup>o</sup> Dr. Rogério Freitag pela amizade, paciência e total apoio.

Pelo companheirismo e auxílio na execução dos experimentos, agradeço muito a amiga Cristina Jansen e Paulo Ricardo Centeno Rodrigues, bem como aos professores, Dr. Rui Zambiasi e Dr.<sup>a</sup> Silvia Hübner, obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntos.

À colega de doutorado e amiga mais do que especial Anna Beatriz Pizarro.

À CAPES pela bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS e UFPel.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e participaram deste processo, e com quem compartilhei estes últimos anos!

*“ Lute diante das coisas difíceis  
de sua vida com amor e  
sabedoria, para que um dia  
você possa olhar para trás e dizer:  
Foi difícil, mas venci !!! ”*

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS OBTIDOS COM DIFERENTES SOLVENTES DE AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) E CHINCHILHO (*Tagetes minuta* Linnaeus)

**Autor:** Katiúscia Bilhalva

**Orientador:** João Roberto Braga de Mello

Diversas plantas têm sido utilizadas para o tratamento de enfermidades de importância em medicina veterinária e vêm despertando interesse da comunidade científica quanto a sua ação antimicrobiana como as espécies, *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Tagetes minuta* Linnaeus. Devido à importância do conhecimento do potencial da atividade antimicrobiana destas espécies, objetivou-se: (i) avaliar a ação antimicrobiana de extratos de diferentes partes das plantas obtidos com solventes de diferentes polaridades e do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Tagetes minuta* L.; (ii) determinar os extratos mais eficazes no controle da atividade antimicrobiana frente às bactérias isoladas de leite bovino; (iii) analisar o sinergismo *in vitro* das diferentes partes das plantas com antimicrobianos comerciais; (iv) avaliar os efeitos citotóxicos dos extratos mais eficientes; (v) avaliar o rendimento dos óleos essenciais das diferentes partes das plantas; (vi) avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído de diversas partes das plantas; (viii) caracterizar os compostos fenólicos e antocianinas. O material vegetal foi encaminhado para extração no aparelho Soxhlet pelo método IUPAC 1.122 (1979) com uso de cinco diferentes solventes e para o óleo essencial por hidrodestilação em Clevenger. Para realização dos testes *in vitro* foi utilizado o método de microdiluição serial em placas para ser determinada a concentração inibitória mínima (CIM). Os microrganismos testados foram: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus agalactiae*. Foram realizados antibiogramas controle e tratamento através da metodologia dos discos adaptada, utilizados os seguintes antibióticos, amoxicilina, ampicilina, gentamicina, penicilina e tetraciclina. Para os testes de citotoxicidade utilizou microplacas contendo Meio Essencial Mínimo (MEM), soro fetal bovino a 10% (Gibco), enrofloxacina (10mg ml<sup>-1</sup>) e anfotericina B (0,025 µg ml<sup>-1</sup>), e preparadas células da linhagem MDBK (Madin-Darby bovine kidney). A quantificação dos compostos fenólicos totais dos extratos foi de acordo com Swain e Hillis (1959) com adaptações. O extrato metanólico apresentou melhor resultado contra as bactérias Gram positivas, o extrato metanólico aroeira fruto maduro apresentou, valores de CIM significativos frente as cepas Gram negativas. Os extratos metanólico da folha do chinchilho apresentaram melhor resultado contra todas as cepas, e o extrato chinchilho flor metanol mostrou maior eficiência para as bactérias Gram-negativas. A maior porcentagem de teor de óleo essencial foi no fruto maduro 5,85% e o menor valor foi na folha verde 0,52%. Os óleos com menores valores de CIM foi folha verde e do fruto maduro, para as bactérias *Staphylococcus* sp. 6%, e *Staphylococcus aureus* ATCC 8% respectivamente. No chinchilho a maior porcentagem de teor de óleo essencial foi na folha, com valor de 1,11% e na flor com o valor de 0,68%. Os menores valores de CIM em relação às bactérias Gram negativas foi às partes da folha e da flor do chinchilho para a bactéria *Escherichia coli* ATCC de 20%. A semente foi o melhor resultado sobre a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC, valor de CIM de 25%. O gênero *Streptococcus* apresentou efeitos sinérgicos frente aos antibióticos utilizados nas associações com os extratos, o extrato Chinchilho Folha foi menos tóxico, viabilidade celular de 96%.

**Palavras-chave:** *Schinus terebinthifolius*, *Tagetes minuta*, plantas medicinais, antimicrobianas, óleos essenciais



## ABSTRACT

### ***POTENTIAL ASSESSMENT OF ANTIMICROBIAL EXTRACTS OBTAINED FROM DIFFERENT SOLVENTS AROEIRA (Schinus terebinthifolius Raddi) And Chinchilho (Tagetes minuta Linnaeus)***

Several plants have been used for the treatment of diseases of importance in veterinary medicine and have attracted interest from the scientific community and its antimicrobial action such as species, *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Tagetes minuta* Linnaeus. Due to the importance of knowing the potential of the antimicrobial activity of these species, aimed to: (i) to evaluate the antimicrobial activity of extracts from different parts of plants obtained using solvents of different polarities and the essential oil of *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Tagetes minuta* L. ; (ii) determine the most effective extracts in controlling antimicrobial activity against bacteria isolated from bovine milk; (iii) analyze the synergism in vitro of different plant parts with commercial antimicrobials; (iv) evaluate the cytotoxic effects of the most efficient extracts; (v) evaluate the performance of essential oils from different parts of plants; (vi) evaluate the antimicrobial activity of the essential oil extracted from different parts of plants; (viii) characterizing the anthocyanins and phenolic compounds. The plant material was submitted to extraction in Soxhlet apparatus by IUPAC method 1122 (1979) using five different solvents and the essential oil by hydrodistillation in a Clevenger. To perform the in vitro tests we used the method of serial microdilution plates to be determined the minimum inhibitory concentration (MIC). The microorganisms tested were *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Staphylococcus* sp. and *Streptococcus agalactiae*. Antibiogram control and treatment were performed using the methodology adapted records used the following antibiotics amoxicillin, ampicillin, gentamicin, penicillin and tetracycline. For cytotoxicity tests used microplate containing Minimum Essential Medium (MEM), fetal bovine serum 10% (Gibco), enrofloxacin (10 mg ml<sup>-1</sup>) and amphotericin B (0.025 µg ml<sup>-1</sup>) and MDBK cells prepared from strain (Madin- Darby bovine kidney). The quantification of the phenolic compounds in the extracts were according to Swain and Hillis (1959) with some adjustments. The methanol extract showed better result against Gram positive bacteria, mastic ripe fruit methanol extract showed, significant MIC values fronts gram-negative strains. The methanol extract of Chinchilho sheet apresentoram best result against all strains, and the methanol extract Chinchilho flower showed greater efficiency for Gram-negative bacteria. The highest percentage of essential oil content in mature fruits was 5.85% and the lowest value was 0.52% on green leaf. Oils with lower MIC values was green and ripe fruit sheet for the bacteria *Staphylococcus* sp. 6%, and *Staphylococcus aureus* ATCC 8% respectively. In Chinchilho the highest percentage of essential oil content was on the sheet, with a value of 1.11% and in bloom with the value of 0.68%. The lowest MIC values in relation to Gram negative bacteria were the parts of the leaf and flower Chinchilho for the bacterium *Escherichia coli* ATCC 20%. The seed is the best result for the strain of *Staphylococcus aureus* ATCC MIC value of 25%. The genus *Streptococcus* showed synergistic effects compared to the antibiotics used in association with the extracts, the Chinchilho leaf extract was less toxic, cell viability was 96%.

**Keywords:** *Schinus terebinthifolius*, *Tagetes minuta*, medicinal plants, antimicrobial essential oils

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo 5

- Figura 1 - Valores das médias encontradas para os controles (C) em mm e para os tratamentos (T) em mm realizados com extratos metanólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) e *Tagetes minuta* L. (Chinchilho) frente aos cinco antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* ATCC.....122
- Figura 2 - Valores das médias encontradas para os controles (C) em mm e para os tratamentos (T) em mm realizados com extratos metanólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) e *Tagetes minuta* L. (Chinchilho) frente aos cinco antibióticos sobre *Streptococcus agalactiae*.  
.....123
- Figura 3 - Valores das médias encontradas para os controles (C) em mm e para os tratamentos (T) em mm realizados com extratos metanólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) e *Tagetes minuta* L. (Chinchilho) frente aos cinco antibióticos sobre *Escherichi coli* ATCC.....123
- Figura 4 - Valores das médias encontradas para os controles (C) em mm e para os tratamentos (T) em mm realizados com extratos metanólicos *Tagetes minuta* L. (Chinchilho) frente aos cinco antibióticos sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC.....124
- Figura 5 - Valores do percentual da viabilidade celular referente aos extratos obtidos no teste de citotoxicidade.....125

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

Tabela 1 - Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos extratos com diferentes solventes da folha verde e folha madura de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) frente às bactérias causadoras de mastite bovina.....44

Tabela 2 - Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos extratos com diferentes solventes do fruto verde e fruto maduro de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) frente às bactérias causadoras de mastite bovina.....44

### Artigo 2

Tabela 1 - Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos extratos com diferentes solventes da folha seca de *Tagetes minuta* L. frente a bactérias causadoras de mastite bovina.....60

Tabela 2 - Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos extratos com diferentes solventes da flor de *Tagetes minuta* L. frente a bactérias causadoras de mastite bovina.....61

Tabela 3 - Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos extratos com diferentes solventes do caule de *Tagetes minuta* L. frente a bactérias causadoras de mastite bovina.....61

### Artigo 3

Tabela 1 - Umidade de diferentes partes das plantas de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) submetidas à secagem em temperatura ambiente.....78

Tabela 2 - Rendimento (% b.s.) de óleo essencial das diferentes partes das plantas de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi.).....79

Tabela 3 - Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos óleos da folha verde, folha madura, fruto verde e fruto maduro de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) frente às bactérias.....81

#### **Artigo 4**

Tabela 1 - Umidade de diferentes partes das plantas de Chinchilho (*Tagetes minuta* L) submetidas à secagem em temperatura ambiente.....100

Tabela 2 - Rendimento (% b.s.) de óleo essencial das diferentes partes das plantas de Chinchilho (*Tagetes minuta* L.) submetidas à secagem em temperatura ambiente.....101

Tabela 3 - Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos óleos da folha, flor, caule e semente de *Tagetes minuta* Lineaus (Chinchilho) frente às bactérias.....102

#### **Artigo 5**

Tabela 1 - Compostos fenólicos totais do Chinchilho expressos em mg EAG.g P.U.....119

Tabela 2 - Compostos fenólicos totais da Aroeira expressos em mg EAG.g P.U.....120

Tabela 3 - Antocianinas totais da aroeira expressos em mg de cianidina 3-glicosídeo /100g P. U.....120

Tabela 4 - Antocianinas totais da chinchilho expressos em mg de cianidina 3-glicosídeo /100g P. U.....121

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	17
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	17
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
<b>3.1 Plantas Medicinais</b> .....	18
<b>3.2 Atividade antimicrobiana de plantas medicinais</b> .....	20
<b>3.3 <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi</b> .....	24
<b>3.4 <i>Tagetes minuta</i> Linnaeus</b> .....	28
<b>3.5 Mastite bovina</b> .....	32
<b>4 ARTIGOS</b>	
4.1 Artigo 1 – Atividade antibacteriana dos extratos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi., com solventes de diferentes polaridades, sobre bactérias da mastite bovina.....	36
4.2 Artigo 2 – Atividade antibacteriana dos extratos de <i>Tagetes minuta</i> L., com solventes de diferentes polaridades, sobre bactérias da mastite bovina.....	52
4.3 Artigo 3 – Rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes partes da planta de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	69
4.4 Artigo 4 – Rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes partes da planta de <i>Tagetes minuta</i> Linnaeus.....	91
4.5 Artigo 5 – Citotoxicidade, fitoquímica e sinergismo dos extratos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi e <i>Tagetes minuta</i> L.....	111
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	129
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	130

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico é uma tendência generalizada na medicina popular brasileira e mundial. Esta tendência tem contribuído significativamente para o consumo não só de plantas medicinais, como também de medicamentos fitoterápicos que, nada mais são do que, produtos que se utilizam vegetais frescos, drogas vegetais e extratos vegetais em preparações farmacêuticas tais como, pomadas, tinturas, extratos e cápsulas para auxiliar no tratamento de doenças, na manutenção e/ou recuperação da saúde (OLIVEIRA et al., 2006; GRAVENA et al., 2010).

Os princípios ativos das plantas vêm sendo estudados ao longo do tempo na história de nossa civilização, muito embora tenham sido colocados em segundo plano com o desenvolvimento das drogas sintéticas, principalmente pelo desenvolvimento da indústria químico-farmacêutica, mas o interesse por fitoterápicos aumentou significativamente, a partir da década de 90, e atualmente encontra-se em expansão em todo mundo, constituindo um mercado promissor (CEOLIN, 2009). Vários grupos têm dedicado atenção ao estudo de plantas consideradas medicinais através de pesquisas bibliográficas ou etnográficas, organizando seleções de espécies com diversas indicações terapêuticas, entre elas o uso como antimicrobianos (AVANCINI, 2002; CASAGRANDE, 2009; DUARTE, 2004; MARODIN & BAPTISTA, 2001; LIMA, 2007; RITTER, et al., 2002; SOARES, et al., 2004; VENDRUSCOLO E MENTZ, 2006).

O Brasil se destaca dos demais países, por apresentar um patrimônio genético de grande potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos, pois possuem 25% da flora mundial, o que corresponde a mais de cem mil espécies (LIMA et al., 2006a). Apesar da grande biodiversidade, menos de 1% do mercado de fitoterápicos no país é voltado para o setor veterinário (SILVA, 2011), e poucas espécies de plantas tiveram suas propriedades avaliadas cientificamente para determinar uma possível ação medicinal (CASTILHO et al., 2007).

Existem poucas leis específicas para seu acesso, o que dificultam seu emprego para o desenvolvimento de medicamentos, além de uma grande complexidade das moléculas estudadas a partir de produtos naturais (AGRA et al., 2007).

O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos publicou em janeiro de 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) que serve como suporte às práticas de manipulação e disposição de fitoterápicos nos

Programas de Fitoterapia. Nessa lista, constam as plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS e que são marcos de extrema importância para o estabelecimento do uso racional de medicamentos contendo drogas de origem vegetal e/ou de plantas medicinais (BRASIL, 2011).

A importância na busca de princípios ativos alternativos se deve em parte, à imensa variedade de espécies vegetais com significativa variabilidade de biomoléculas expressas por estas, onde muitas detêm importantes propriedades biofarmacológicas de expressivo valor (MOREIRA et al., 2009). Os compostos ativos, advindos de folhas, caules, flores, cascas e raízes, apresentam-se distribuídos em diferentes classes fitoquímicas de interesse farmacológico, incluindo flavonóides, terpenóides, esteróides, taninos, alcalóides, dentre outros (KUETE, 2010; LIMA et al., 2011).

Outro fator que promoveu transformações foi à busca por terapias menos tóxicas e por medicamentos com menores efeitos adversos e com menor custo, o que tornaram a fitoterapia cada vez mais popular em veterinária, ao fato de que alguns dos fármacos atuais vêm perdendo sua eficácia e adquirindo resistência a microrganismos nocivos à saúde animal, a efeitos indesejáveis ocorridos pelo uso incorreto ou indevido dos medicamentos sintéticos, se constituindo numa crescente fonte de pesquisas, estimulando assim, a avaliação de diferentes extratos de plantas, principalmente quanto a sua atividade antimicrobiana, antiinflamatória e quimioterápica (AGUIAR et al., 2012; AHMED et al., 2012; BUFFON et al., 2001; DIAB; ATALLA; ELBANNA, 2012; MELO et al., 2007; CLEFF et al., 2009; GALUPPI et al., 2010; SPELLBERG et al., 2013).

O leite bovino é um alimento que está presente na dieta humana e a qualidade do produto *in natura* é influenciada diretamente pela saúde da glândula mamária do animal (SOUZA et al., 2005). Um dos problemas sanitários e econômicos de maior relevância é a ocorrência de mastite nas vacas em lactação, causando prejuízos ao produtor e laticínios, determinando redução na produção de leite, custos com tratamentos e serviços veterinários, perdas pelo descarte e morte de animais, além da redução da qualidade e quantidade do leite produzido (FEBLER et al. 2012; LANGONI, 2013).

Existem vários agentes etiológicos causadores da mastite bovina, na infecção bacteriana destaca-se frequentemente o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* (OLIVEIRA et al. 2011; MELLO-PEIXOTO et al. 2012; SAEKI et al. 2011), porém pode ser causada por outros microrganismos, como fungos, vírus e leveduras, que são disseminados principalmente

pelas mãos contaminadas dos ordenhadores (COLOMBO et al. 2012; MARQUES et al. 2013; ONDIEK et al. 2013; RAZA et al. 2013; TOZZETTI et al., 2008).

O tratamento usual a base de antimicrobianos químicos causa riscos, pois pode resultar em resíduos no leite, tornando-o inapropriado para o consumo, ocorrendo assim uma crescente busca por medicamentos naturais (DOMINGUES et al., 2012).

Agricultores e veterinários tem sido encorajados a utilizar fitoterápicos no controle da mastite bovina, tanto para a prevenção quanto para tratamento da doença. As práticas que predominam para o tratamento são a utilização de soluções ou pomadas medicinais à base de ervas para uso local ou a administração de plantas verdes ou secas via oral (GALDINO et al. 2012; SOUZA et al. 2013). Com base no saber popular e na literatura científica, *Schinus terebinthifolius* Raddi. e *Tagetes minuta* Linnaeus. tornam-se plantas promissora na pesquisa com extratos e compostos vegetais para a avaliação do potencial antimicrobiano frente a bactérias causadoras de mastite isoladas de leite bovino.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Avaliar a ação antimicrobiana de extratos de diferentes partes das plantas obtidos com solventes de diferentes polaridades e do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) e *Tagetes minuta* L. (Compositae);

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar os extratos mais eficazes no controle da atividade antimicrobiana frente às bactérias isoladas de leite bovino;
- Analisar o sinergismo *in vitro* de extrações com solventes orgânicos de diferentes partes das plantas juntamente com antimicrobianos comerciais;
- Avaliar os efeitos citotóxicos dos extratos mais eficientes no controle da atividade antimicrobiana.
- Avaliar o rendimento dos óleos essenciais das diferentes partes das plantas utilizadas no estudo;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído de diversas partes das plantas;
- Caracterizar os compostos fenólicos e antocianinas presentes nos extratos que se mostrarem mais eficientes no controle da atividade antimicrobiana.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Plantas Medicinais**

O uso de espécies vegetais vem sendo amplamente utilizado por grande parte da população mundial, com fins de tratamento e cura de várias doenças e tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas, até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial (BARATA, 2005; CORRÊA et al., 2008; LORENZI; MATOS, 2008).

A busca por plantas medicinais tem aumentado em todas as camadas sociais, seja pelo fácil acesso ou, ainda, da comercialização da planta fresca, em mercados livres a custos inferiores ao medicamento industrializado (GIL, 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento, utiliza a medicina tradicional para o tratamento de suas necessidades primárias de saúde, e a maior parte desta terapia, envolve o uso de extratos de plantas ou de seus princípios ativos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplementos e de Promoção da Saúde (ABIFISA), estima que provavelmente 82% da população brasileira utilizam produtos à base de plantas medicinais, no ano de 2013, apresentou elevação das vendas na casa dos 12%, alcançando até 7% do mercado farmacêutico total em valores e em números de unidades, o que representa aproximadamente R\$ 4 bilhões em faturamento e 202 milhões de unidades comercializadas (ABIFISA, 2014).

As plantas medicinais podem estar sendo veiculadas em diversas formas que incluem desde as drogas vegetais até os fitoterápicos. Entende-se por planta medicinal como toda e qualquer planta, silvestre ou cultivada, que tem atividade biológica, possuindo um ou mais princípios ativos que podem ser utilizados como recurso para prevenir, curar, aliviar ou alterar um processo fisiológico normal ou patológico. As plantas medicinais deixaram de ser vistos como um simples instrumento de medicina popular e se constituem, atualmente, como matéria-prima para indústrias e produtos farmacêuticos (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; VERMANI et al., 2002).

Já os fitoterápicos, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, produtos medicinais acabados e etiquetados, cujos ingredientes ativos são formados por partes aéreas ou subterrâneas de plantas, ou outro material vegetal, ou

combinações destes, em estado bruto ou em formas de preparações vegetais, caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos (BRASIL, 2010; RATES, 2001).

A diversidade vegetal no Brasil é considerada a mais rica do planeta, representada por cerca de 55 mil espécies catalogadas, equivalendo a 22% do total mundial, porém, apenas 10% dessas plantas foi estudada química e/ou farmacologicamente (BARATA, 2005; BRASIL, 2011; CARVALHO et al., 2007).

Considerando a importância e o amplo alcance da medicina embasada no uso de plantas medicinais, a Organização Mundial de Saúde (OMS), que estimula os países no processo de identificação e compreensão relacionadas aos aspectos da medicina tradicional, os quais fornecem informações a cerca de remédios ou práticas seguras e eficientes à sua utilização em cuidados primários à saúde, reconheceu a necessidade de garantir a eficácia, segurança e qualidade desta prática elaborando legislações e determinando registros de medicamentos à base de plantas medicinais, como forma de apoiar as investigações clínicas no que se refere ao uso das plantas e fitoterápicos no tratamento de problemas de saúde mais comuns (OMS, GINEBRA, 2002).

No Brasil, uma das primeiras ações estratégicas importantes aconteceu em 2006, com a adoção da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), visando, entre outros, ao estímulo à adoção da fitoterapia nos programas de Saúde Pública. No mesmo ano foi instituída a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), com o objetivo, de promover o uso racional e seguro de plantas medicinais e de fitoterápicos e o desenvolvimento de sua cadeia produtiva, cuja estratégia de implantação passa pelo incentivo aos arranjos produtivos locais (APLs) por meio de editais do Ministério da Saúde. Também integra o escopo do programa a distribuição de medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), incentivos à comercialização pelo setor privado, capacitação de recursos humanos e orientação aos usuários. Nesse período, houve diversos avanços no setor, entre eles a contratação de 66 pesquisadores para a elaboração de estudos de espécies vegetais da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) e a realização de curso de Fitoterapia para Médicos no SUS, que visa informá-los dos benefícios do uso da fitoterapia (BRASIL, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Atualmente, existem cerca de 400 medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil, apenas em 2012 foram registrados 24 novos compostos, segundo a ANVISA, as plantas medicinais mais utilizadas como princípio ativo nos medicamentos fitoterápicos no Brasil são a castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum*), o guaco (*Mikania glomerata*) e o ginkgo (*Ginkgo biloba*) (ANVISA, 2014).

Os produtos vegetais produzem uma grande variedade de compostos químicos, estão representados por centenas de princípios ativos que pertencem às seguintes cinco classes químicas: carboidratos, lipídios, compostos nitrogenados (aminoácidos, peptídios, proteínas, glicosídeos cianogênicos e alcalóides), terpenóides e os fenilpropanóides. Seus princípios ativos exibem amplo espectro de atividades biológicas, dentre elas: ação anticarcinogênica, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatória, antiulcerogênica, anti-hipertensiva e hipolipidêmica (CARVALHO et al., 2007; JOHANN et al., 2010).

### **3.2 Atividade antimicrobiana de plantas medicinais**

A busca por novas substâncias com ação antimicrobiana, presentes em extratos obtidos de plantas a partir do seu metabolismo secundário com atividade biocida (bactericida, fungicida e inseticida) são reconhecidas empiricamente há séculos e hoje se busca comprovar essas atividades cientificamente, com efeitos indesejáveis mínimos, eficácia e segurança (DUARTE et al., 2005; GALUPPI et al., 2010; LORENZI; MATOS, 2002; MICHIELIN, 2009; RAMIREZ; DIAZ, 2007).

Uma recente pesquisa realizada no período de 1981 a 2010 sobre a atividade de extratos vegetais frente a microorganismos estimou que a maioria dos fármacos utilizados no controle de infecções antimicrobianas advém de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012; SMITH-HALL et al., 2012). Assim como no Brasil, estes estudos ocorrem em diversos países que apresentam uma flora diversificada (ABEDINI et al., 2013; CHOVANOVÁ et al., 2013; KUETE et al., 2013; TORBATI et al., 2013).

A questão da emergência das infecções e das resistências bacterianas está relacionada a mudanças que fortaleceram as doenças infecciosas, causadores de enfermidades tanto no homem quanto em animais. Inúmeros fatores, como o aumento da prevalência de indivíduos imunodeprimidos e de sua sobrevivência, a elevação do consumo indiscriminado de agentes antimicrobianos, as limitações de medicamentos antimicrobianos e a utilização destas substâncias nos alimentos são alvos apontados como

fatores associados ao aparecimento de resistência antimicrobiana, permitindo a subsequente seleção de espécies resistentes e tornando-se responsáveis por esse sério problema de saúde pública mundial, o que levou a uma redução na eficácia da terapia convencional, incentivando ainda mais a procura por produtos originários de fontes naturais, como as plantas medicinais (ALLAHVERDIYEV, et al. 2013; ALVES et al., 2000; AGUIAR et al., 2012; BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010; MCPHEE et al., 2011; RANG et al., 2007).

As plantas vegetais podem atuar de duas formas, como potencializadores de atividade antibacteriana favorecendo a atividade de antibióticos, ou como atenuantes de virulência, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção. Com o aumento das doenças degenerativas e o surgimento de cepas patogênicas resistentes, se busca substâncias com atividades antimicrobianas e antioxidantes (GONZÁLEZ-LAMOTHE, 2009; RAVISHANKAR et al. 2012; PARK et al. 2012).

Entre os principais agentes etiológicos destas infecções, que tem o seu crescimento avaliado a partir de extratos de plantas, encontram-se as do gênero *Staphylococcus*, que são de grande importância não só para medicina humana, mas também, para a medicina veterinária e estão entre as mais frequentemente isoladas em clínica microbiológica, se tornando cada vez mais importantes, especialmente por serem considerada uma das principais causas de infecções (GOLDMAN; AUSIELLO, 2009; VUONG et al. 2000).

Os *Staphylococcus* são um grupo de bactérias esféricas, com forma de cocos gram-positivos e por ser um microorganismo mesófilo, coloniza normalmente várias regiões do corpo, como a mucosa nasal, as fezes, o tegumento cutâneo, as axilas e o períneo, utilizando como porta de entrada parte de pele com perda de integridade (EMPINOTTI et al., 2012). Possuem aproximadamente de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro de comprimento, imóveis, não formadoras de esporos e geralmente não encapsuladas. Metabolicamente, é um anaeróbio facultativo, de distribuição global e ocorrência em ampla gama de ambientes e hospedeiros (GOODMAN; GILMAN, 2010; POLAKOWSKA et al. 2012; SANTOS, 2009a).

Em estudos com plantas medicinais, amostras de própolis foram avaliadas quanto ao seu efeito antimicrobiano por Da Cunha et al. (2013), na qual foi testada a atividade antibacteriana do extrato etanólico da geoprópolis, e suas frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila, em concentrações entre 3,125 a 1600 µg/mL, contra *Streptococcus*

*mutans*, *S. aureus*, *S. aureus* resistente à metilina, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii* e *P. aeruginosa*. As bactérias mais sensíveis, tanto ao extrato quanto às suas frações, foram às cepas de *S. aureus*, apresentando concentração bactericida mínima (CBM) e concentração inibitória mínima (CIM) menor que 50 µg/mL.

Schreiner et al. (2009), relataram que extrato de (Romã) *Punica granatum* L. pode reduzir aproximadamente 78% a contaminação microbiana inespecífica. Silva et al., (2008) realizaram a atividade antimicrobiana do extrato da casca do fruto de *Punica granatum* sobre 38 linhagens de *S. aureus* de origem bovina para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os microrganismos testados com este extrato apresentaram sensibilidade formando halos de inibição variando de 10 a 36 mm de diâmetro, podendo-se confirmar a eficiência do extrato de *P granatum* como alternativa terapêutica na Medicina Veterinária.

De acordo com Menezes et al. (2008), a romã se mostra efetiva na inibição do crescimento de bactérias Gram positivas, especificamente *S. aureus*. Catão et al. (2006), evidenciaram sensibilidade de todas as 17 cepas de *S. aureus* submetidas ao extrato etanólico de romã a 10%. Ao estudar as aplicações terapêuticas da romã, Werkman et al. (2008) destacaram as propriedades antimicrobianas.

Maia et al. (2008) avaliando a atividade antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* de origem bovina e humana da cefalexina em associação com a extrato hidroalcolico de *M. charantia*, observou um efeito sinérgico, demonstrando potencial efeito antimicrobiano da *M. charantia*.

Segundo Fraga et al. (2006), o óleo essencial de *G. integrifolia* (Sprengel) Harms apresenta teores de substâncias conhecidamente antimicrobianas, demonstrando a importância do levantamento das espécies do gênero *Gallesia* (pau-d'alho) indicada para o tratamento de inflamações em equinos, utilizando o macerado da casca.

Estudos in vitro realizados por Wei et al.(2013) evidenciaram que o *C. ambrosioides* L. possui ação antimicrobiana contra inúmeras bactérias resistente a vários antibióticos.

Bezerra et al., (2009) realizaram ensaios de ação antimicrobiana sobre 25 isolados de casos de mastite bovina, observando que o extrato de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) demonstrou potencial antimicrobiano em diferentes concentrações testadas.

De acordo com Goodman e Gilman (2010), nos EUA, cerca de 70% das bactérias envolvidas na etiologia das infecções nosocomiais são resistentes a algum antimicrobiano

(GOODMAN; GILMAN, 2010) e, aproximadamente, 90 a 95% das cepas de *S. aureus* do mundo são resistentes à penicilina (HEMAISWARYA et al., 2008).

Nader et al., (2010) também avaliaram o potencial de atividade antimicrobiana in vitro dos extratos de algumas plantas endêmicas do Cerrado, dentre elas *Baccharis dracunculifolia*,

*Cochlospermum regium*, *Croton antisiphiliticus*, *Eugenia dysenterica* e *Lippia sidoides*, contra *S. aureus* isolados de leite mastítico. Os resultados demonstraram que os extratos de *Baccharis dracunculifolia*, *Croton antisiphiliticus*, seguido do extrato de *Lippia sidoides*, apresentaram, respectivamente, melhor atividade inibitória sobre *Staphylococcus aureus* ressaltando a importância de plantas medicinais como recurso terapêutico.

A avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais pode ser determinada através de inúmeros métodos disponíveis na literatura científica. Essas diferentes metodologias possuem sensibilidades distintas e, desta forma, os resultados passam a ser influenciados pelo método selecionado, pelos microrganismos utilizados e pelas características de solubilidade dos extratos. Através destas análises podem-se determinar as propriedades antimicrobianas por meio de uma pequena quantidade do extrato vegetal que é necessário para inibir o crescimento do microorganismo-teste, este valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM), que pode ser determinada através de três técnicas: diluição em caldo de cultivo, diluição em ágar e microdiluição em caldo de cultivo. Também se podem determinar da mesma forma, a Concentração Bactericida Mínima (CBM) a qual é definida pela concentração necessária para inativar o microorganismo alvo. Para os testes de atividade antimicrobiana devem ser utilizadas cepas provenientes de coleções de cultura, como o ATCC (*American Type Culture Collection*), para que seja possível a comparação com outras pesquisas (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991; OSTROSKY et al., 2008).

O método de difusão em ágar é um método qualitativo, tendo com vantagens a utilização de pequenas quantidades de amostras, na qual se pode testar até cinco extratos diferentes em uma única placa de *Petri*. Através deste método verifica-se a capacidade do extrato de inibir ou não o crescimento do microorganismo de interesse. A técnica de microdiluição em caldo de cultivo utiliza diferentes concentrações do extrato em placas de microdiluição, contendo uma suspensão padronizada do microorganismo a ser testado (DUARTE, 2006; OSTROSKY et al., 2008).

O método de macrodiluição, que dissolve a amostra a ser testada em um meio sólido ou líquido conveniente, ainda que exija um trabalho excessivo, maior consumo de material e possível solubilidade quando usado sistemas aquosos, possui a vantagem de ser quantitativa (FREIBURGHAUS et al., 1996).

Com relação às plantas com fins antibacterianos, as diferenças das técnicas adotadas na averiguação da atividade de compostos oriundos de espécies vegetais, bem como, as variações encontradas na constituição química de alguns extratos vegetais podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas. Cabe salientar, que ainda não existe um consenso sobre os níveis de inibição aceitáveis para compostos de plantas, quando comparados com antibióticos padrões (FRIEDMAN, 2007; GOLDMAN; AUSIELLO, 2009; AGUIAR et al., 2012).

Diversas plantas têm sido utilizadas para o tratamento de enfermidades de importância em medicina veterinária e vêm despertando interesse da comunidade científica mundial quanto a sua ação antimicrobiana como as pertencentes às famílias Anacardiaceae e Compositae,

*Schinus terebenthifolius* e *Tagetes minuta*.

### **3.3 *Schinus terebenthifolius* Raddi.**

A *Schinus terebinthifolius* Raddi, também conhecida popularmente como aroeira vermelha, pimenta-rosa, aroeira-mansa, aroeira-pimenteira, aroeira-da-praia, aroeira precoce, aroeira do campo, aroeira-do-brejo, aroeira-do-sertão, aroeira-negra, aroeira-branca, aroeira-de-remédio, fruto de raposa, fruto de sabi, coração de bugre, cambuí, bálsamo, aroeira de sabiá, aroeira do Paraná, aguaraiba e careiba (CLEMENTE, 2006; RIBAS et al., 2006; TONIAL, 2010).

O termo aroeira originou-se do nome das aves, araras, que eram vistas pousadas com maior frequência nesta árvore, fazendo dela seu habitat (SOUSA, 2004).

A aroeira, *S. terebenthifolius* Raddi, pertence à família Anacardiaceae, também é conhecida botanicamente como: *Schinus aroeira* Vell., *Sarcotheca bahiensis* Turcz., *Schinus antiarthritica* Mart., *Schinus mucromulata* Mart., *Schinus chichita* Speg., *Schinus lentiscifolia*, *Schinus rhoifolus* Mart., *Schinus weinmanniifolius*, *Schinus riedeliana*, *Schinus selloana*, *Schinus damaziana*, *Schinus raddiana*, *Astronium juglandifolium* Griseb e *Astronium urundeuva* (LORENZI, 2008; SALVI JÚNIOR, 2009).



É uma planta nativa do Brasil, comum em beira de rios, córregos e várzeas úmidas, com rápido desenvolvimento no campo e ampla dispersão, possui atributos importantes para usos múltiplos como os de muitas outras espécies conhecidas mundialmente, segundo estudos realizados por Cesário e Gaglianone (2008) a aroeira é completamente adaptada aos diferentes territórios brasileiros e possui grande habilidade de adaptação em regiões onde outras culturas mais exigentes não sobreviveriam como, regiões de restinga ou áreas próximas ao litoral com solos arenosos e água do lençol freático com elevado índice de salinidades (BONA et al., 2011; ETHUR et al., 2011; GOMES et al., 2013; LIMA, 2008; MORGAN; OVERHOLT, 2005).

Largamente distribuída por todo território brasileiro, segundo Silva-Luz e Pirani (2012), a espécie é encontrada nos seguintes Estados: Piauí, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Bahia, Alagoas e Sergipe (Nordeste); Mato Grosso do Sul (Centro-Oeste); Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo (Sudeste); e Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, assim como também em vários países como Paraguai, Uruguai, Argentina, Chile, Peru e Bolívia (CERUKS et al., 2007; RIBAS et al., 2006; SCRIVANTI; ZUNINO; ZYGADLO, 2003; WILLIAMS et al, 2005).

Segundo Figueiredo (2009) a aroeira pode ser considerada um parente do caju, da manga e do cajá-mirim. Entre outras conhecidas anacardiáceas frutíferas, a aroeira não possui parentesco com a família das pimentas.

É uma árvore que atinge de 5 a 12 metros de altura, com ramos de largura e diâmetro variável, é dióica, havendo árvores fêmeas e árvores machos, apresentando um tronco tortuoso revestido por uma casca grossa e escura de 30-60cm de diâmetro. Apresenta ainda uma copa ovóide e folhas perenes e imparipinadas, verde-escuras, compostas, oblongas a elípticas, na parte superior do limbo contém nervuras pronunciadas de aroma forte. As flores da aroeira são diclinas, dependente basicamente de insetos para o transporte do pólen, e o comprimento e a largura da inflorescência determina o dimorfismo sexual da planta, por possuírem flores melíferas a aroeira desempenha um papel muito importante na apicultura, as flores apresentam duas colorações amarelo-pálida a branca, são pequenas e agrupadas em panículas (ALMEIDA, 2005; LIMA et al., 2008; SALVI JÚNIOR, 2009; SANTOS et al., 2009a).

Seus frutos são pequenos, ovais, numerosos, em forma de drupa (carnoso). O fruto apresenta uma única semente de cor marrom-escura envolvida por uma secreção pegajosa, medindo aproximadamente 0,3mm de diâmetro quando maduros adquirem um

aspecto vermelho brilhante, chegando a 5 mm e apresentando apenas uma semente em seu interior (BERTOLDI, 2006; JESUS et al, 2007; LORENZI, MATOS, 2008).

A espécie não necessita de maiores cuidados para sua proliferação natural e produção de sementes, é facilmente disseminada por animais, dada a grande produção de frutos. Segundo o Instituto Brasileiro de Educação em Negócios Sustentáveis - IBENS (2007), ela é uma planta altamente invasiva e muito resistente, que pode ser cultivada a partir de sementes ou estaquia a partir de segmentos da raiz e do caule. O crescimento é relativamente rápido, podendo atingir o primeiro metro de altura ainda no primeiro ano de plantio. A aroeira apresenta, no entanto, alguns fatores negativos. A sua alta capacidade reprodutiva a torna agressiva na invasão de áreas onde a sua presença não é desejável, sendo recomendada cautela no planejamento e manejo do seu plantio, principalmente fora de sua região de origem. Embora no Brasil não se caracterize como tal, ocorrendo em proporções equilibradas na flora nativa, a aroeira introduzida na Flórida tornou-se uma espécie invasora (SANTOS et al., 2009b).

A floração varia de julho a setembro ou de novembro a março conforme a região, a frutificação ocorre de dezembro a julho, especialmente nos meses de maio e junho, os frutos podem permanecer até a próxima floração (LIMA, 2008).

A *Schinus terebinthifolius* fornece madeira parda ou amarelo-clara, moderadamente pesada, bastante resistente e de grande durabilidade natural, sendo bastante utilizado para a produção de lenha, carvão, mourões, esteios, além de ser empregada como cerca, servindo de barreira para ventos ou substituindo arames, serve de forragem para abelhas e cabras, cercas vivas e arborização de ruas estreitas, apesar de poder causar alergia a pessoas sensíveis que entram em contato com as suas folhas; ainda, pode ser usada para reflorestamento. As cascas são utilizadas na extração de taninos para a indústria de curtimento de couro (BRANCO NETO et al., 2006; RIBAS et al., 2006; SANTOS et al., 2007).

A aroeira possui importância comercial em vários segmentos: cosméticos, condimentares, farmacêuticos, alimentares-especiarias e ervas, por se tratar de uma planta com propriedades medicinais, fotoquímicas e alimentícias. Atualmente, a espécie vem se destacando cada vez mais pelo consumo de seus frutos (pimenta rosa), por apresentar um sabor picante e um valor econômico baixo, tem aumentado muito a demanda, tanto no mercado nacional quanto internacional, essencialmente por acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária universal, utilizado como um tipo

de condimento alimentar, corante e aromatizante. Além de seu uso mais comum na culinária, a aroeira possui diversas outras aplicações e utilidades como xaropes, bebidas e na fabricação de perfumes. Desse modo, a produção de pimenta rosa gera uma série de subprodutos que também podem ser comercializados (GOMES et al., 2013; KHALED et al, 2009; LIMA, 2008).

Esta espécie faz parte da cultura e da tradição local de algumas comunidades tradicionais, como a comunidade de Arraial do Cabo (R.J.), onde é usada para tingir rede de pesca, com a finalidade de evitar o ataque excessivo dos peixes à rede (GOMES et al., 2013). Segundo Coradin et al. (2011), o interesse pela categoria de plantas medicinais, aromáticas e condimentares é relativamente recente no cenário econômico brasileiro, é resultado do crescente interesse mundial e da motivação da implementação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF).

Segundo documentos do Bandes (2008), o Espírito Santo é o maior produtor de grãos de aroeira, embora pesquisas mostrem que essa espécie vem sendo explorada, em uma escala menor, em outras regiões do Brasil, como no litoral, em áreas de restinga. Ressalta-se que a aroeira, apesar de ser conhecida no meio rural, não é ainda utilizada em sistemas integrados de produção, principalmente pelos pequenos e médios produtores (CESÁRIO; GAGLIANONE, 2008).

As partes utilizadas popularmente da aroeira são: cascas, folhas e frutos, apresenta propriedades adstringentes, antissépticas, antiinflamatórias anti-diarreicas, anti-leucorréica, emenagoga, purgativa, estomáquica, fungicida, bactericida, balsâmico, hemostático, depurativas, diuréticas e febrífugas. Tem sido usada como um tônico para o tratamento de ferimentos, infecções urinárias e respiratórias. Devido à composição de seu óleo essencial, é utilizada aplicações tópicas no tratamento de micoses e candidíases. Popularmente, também é empregada no tratamento de inflamações, para promover a transpiração e a eliminação de líquidos. A casca da aroeira tem ação contra febre, hemoptises e afecções uterinas em geral. Da casca extrai-se um óleo empregado, o “azeite de aroeira”, contra tumores e doenças da córnea (AGRA et al., 2007; AGRA et al., 2008; BIAVATTI et al., 2007; COSTA et al., 2010; LIMA, 2008; MOUSTAFA et al., 2007; PIRES et al., 2004).

Estudos fitoquímicos revelaram a presença de diversos compostos químicos, incluindo flavonóides, cumarinas iridoides, taninos condensados, compostos fenólicos simples, metilxantinas, alcalóides, alcoóis, cetonas, ácidos, monoterpenos,

sesquiterpenos, triterpenos, açúcares e saponinas no caule, folhas e frutos da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi (BRAZ et al., 2012; OMS, 2012; SANTOS et al., 2009b).

Ibrahim et al. (2010) analisando a composição química do óleo essencial de frutos de aroeira, observaram a predominância de monoterpenos, principalmente os terpenos:  $\alpha$ -pineno, germacrenoD, canfeno,  $\beta$ -felandreno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -felandreno e  $\delta$ -3-careno. O teor desses monoterpenos chegou a 40% da composição química das amostras de óleo essencial.

Ceruks e cols (2007) identificaram a partir das folhas de *Schinus terebinthifolius* o galato de etila, miricetrina, quercitrina, galato de metila e miricetina. Já Santos (2010) identificou também nas folhas o ácido gálico com potencial alelopático. Segundo Santana (2012), os principais produtos da aroeira, são os ácidos graxos, terpenoides, e os derivados ácidos 3  $\alpha$ -masticadienoico (schinol) e masticadienoico, porém, sabe-se que a composição química desta planta é bem mais complexa. Logo, estudos visando uma abordagem sistemática que demonstrem tais substâncias, vêm sendo realizados constantemente (CARVALHO et al. 2013).

Em estudos realizados, Ribas et al. (2006) verificaram um fechamento epitelial acelerado de lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal de ratos tratados com extrato das folhas de *Schinus terebinthifolius* em relação ao grupo controle, além de uma maior proliferação vascular e fibroblástica, sendo assim, indicadas no tratamento de estomatites, inflamações bucais, tumores e cistos localizados na cavidade bucal (GOMES et al., 2013; LIMA et al., 2004; LIMA, 2008). Pereira et al. (2011) avaliaram a susceptibilidade dos microrganismos patogênicos orais, frente a extratos de *S. terebinthifolius*. Os resultados sugerem que esses extratos podem ser uma alternativa eficiente para o tratamento de infecções da cavidade oral, tais como a estomatite, a cárie dentária e a periodontite causada por *S. mutans* e *S. aureus* (JOHANN et al., 2007).

O extratos de cascas foi descrito por Carlini et al. (2010) que relataram efeito protetor significativo contra ulcerações gástricas induzidas pelo estresse de imobilização a baixa temperatura em ratos. Os extratos de *S. terebinthifolius* foram capazes de aumentar tanto o pH e o volume dos conteúdos gástricos.

As folhas e as cascas da espécie são utilizadas de várias formas segundo Albertasse e Tomaz (2010), como xarope, banho de assento, cicatrizante e anticasca, usados para lavar feridas, e, além disso, para gripes, dor de dente, ferida na boca, dor de garganta, asma, febre e doenças femininas. A aroeira também age como auxiliar no

tratamento de alguns tipos de tumores/cânceres e como agente antiviral e anti-bactericida (BELHAMEL, 2009; BENDAOU et al., 2010; BOSCOLO et al., 2007; MOURA-COSTA, 2012). O líquido obtido a partir da maceração de suas raízes tem utilidade no tratamento de tumores ganglionares (BARBOSA et al, 2007).

Lucena e colaboradores (2006) constataram que o uso do extrato hidroalcoólico de aroeira apresenta efeito cicatrizante positivo nas cistomias em ratos. O outro estudo, que avaliou o efeito cicatrizante da administração tópica do extrato hidroalcoólico de aroeira em feridas abertas na região dorsocostal de ratos, concluiu que este extrato retardou a reepitelização das feridas da pele das cobaias (BRANCO NETO et al., 2006).

Lima e colaboradores (2006), trabalhando com o extrato aquoso, obtiveram resultados satisfatórios sobre as atividades antimicrobianas frente a cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Epidermophyton floccosum* e *Candida albicans*. Em outro estudo relacionado com a atividade antimicrobiana de um extrato de aroeira, também verificou que o fracionamento do mesmo induzia a perda da capacidade de inibição de bactérias (BOROS, 2007).

Paulo e colaboradores (2009) testaram substâncias fitoterápicas compostas pela *Schinus terebinthifolius* e observaram que estas foram bem toleradas pelo organismo humano, não ocasionando alterações clínicas, laboratoriais e nem reações adversas significativas nos pacientes, o que sugerem uma baixa toxicidade dessas substâncias. Mais recentemente, um estudo de toxicidade com ratas grávidas, demonstrou que a *Schinus terebinthifolius* quando usada cronicamente pode levar a efeitos teratogênicos graves (CARLINI et al. 2013).

### **3.4 *Tagetes minuta* Linnaeus**

*Tagetes minuta* L. é uma planta aromática que engloba algumas espécies da Família das Compositae ou Asteraceae com código TAGMI (*Tagetes minuta*), originárias do México e introduzidas no Brasil há muitos anos, onde se aclimataram perfeitamente, de ocorrência espontânea no Rio Grande do Sul, foi espalhada pelo mundo logo após a conquista espanhola devido ao valor do seu óleo, cujo principal componente é a diidrotagetona (BABU, 2007; GIL, 2000; MAROTTI et al., 2004).

O termo *minuta* vem da palavra latina e significa minutos, (pequeno), faz referência ao tamanho das flores, pela pequena dimensão dos capítulos e não da planta,

que pode alcançar até 2 metros de altura (HULINA, 2008; TERESCHUK, 2005; THORNE et al., 2007).

A planta é popularmente denominada alfinete-do-mato, chinchilho, chinchilia, cravo-de-defunto, cravo-de-urubu, coari, coari-bravo, camomila americana, coara, cravo-bravo, cravo-do-mato, cravinho-de-defunto, erva-fedorenta, estrondo, picão do reino, rosa de lobo, voadeira, vara-de-rojão, rabo-de-foguete (LOOKERMAN et al., 2003; PLANTAMED, 2014; VISITIN E BERNADELLO, 2005).

Este gênero compreende cerca de 60 espécies anuais e perenes, em sua maioria plantas herbáceas da família dos girassóis. É uma das famílias mais numerosas do reino vegetal, tem ampla distribuição mundial. Seus sinônimos botânicos são: *Tagetes bonariensis* Pers., *Tagetes glandulífera* Schrak, *Tagetes glandulosa* Schrank ex Link, *Tagetes porophyllum* Vell, *Tagetes elliptica* Smith, *Tagetes erecta* L, *Tagetes minuta* L, *Tagetes pusilla* Kunth, *Tagetes lúcida* Cav, *Tagetes pátula* L, *T. lunata* Ort e *Tagetes terniflora* Cav, (CHAMARRO, 2008; LORENZI; MATOS 2008; MURGA-GUTIÉRREZ, 2007; SENATORE, 2004).

É uma espécie subarborescente anual que se desenvolve espontaneamente, ocorre em terrenos secos e desenvolve-se melhor naqueles cultivados, de boa fertilidade e em áreas onde se efetuaram queimadas, instalando-se em áreas com lavouras anuais e perenes, áreas olerícolas, ocupadas com cultivos de batata, cebola, pomares de goiaba e pêssego, entre outros. Segundo Araujo et al. (2006), as diferentes espécies variam em tamanho de 0,5 a 2,2m de altura, possuindo caules e ramos eretos ou angulosos, pouco ramificado, folhas compostas, palmadas, verdes, plumiformes, opostas ou alternas, às vezes pecioladas, profundamente dilaceradas, recortadas, glandulosas e aromáticas. A superfície inferior das folhas sustenta um grande número de glândulas multicelulares, de coloração alaranjada, as quais liberam um aroma agradável quando rompidos. As glândulas também podem ser encontradas no caule e nos quatro ou cinco involúcos das flores. Há variedades de flores dobradas, grandes, até 7 cm de diâmetro, na ponta dos ramos, de cores mais vivas, predominando o laranja, o amarelo-citrino e o amarelo-enxofre (CHAMORRO et al., 2008; LORENZI; MATOS 2008; NAQINZHAD; MEHRVARZ, 2007; PIO, 2001).

O cravo-de-defunto caracteriza-se por ser uma planta de fácil cultivo, bastante decorativa, de ciclo relativamente curto, com variação de tamanho, cor e espécie, muito empregada para forrações de jardins, floreiras e também para o corte. Multiplica-se

facilmente por semente, apresenta ciclo de 120-150 dias e cresce naturalmente a partir da primavera e praticamente desaparece com o início do inverno após a conclusão do seu ciclo de vida, encontra-se em climas temperados, da Argentina, Brasil, Bolívia, Peru, Colômbia, Sul da Europa, Ásia, África e Austrália. Em regiões tropicais, é cultivado para produção de óleo essencial (CHAMARRO, 2008; HULINA, 2008; LORENZI; MATOS 2008; NAQINZHAD E MEHRVARZ, 2007; SENATORE, 2004, QURESHI et al., 2007; SHAHZADI et al., 2010).

O óleo das folhas do chinchilho contém principalmente dehidrotagetona, rico em  $\beta$  - ocimeno, tagetenona, cineol, linalol, carvona, dextra-linoleno, fenol, anetol, eugenol, quercetagetina, compostos terpenóides, compostos acetilênicos, fitomelaninas, ácido caféico, ésteres, flavonóides, alcalóides e carotenóides entre outros. A composição do óleo essencial varia de acordo com as diferentes partes da planta e seu estágio de crescimento, mas não difere a respeito da procedência do material (ALONSO, 2004; ARIAS, 2010; BREME et al., 2009; COFRE, 2011; GARCÍA e CARRIL, 2009; KAUL et al., 2005).

Segundo Meshkatalasadat et al. (2010), o óleo de *T. minuta* L. tem sido investigado por vários trabalhos que identificaram (Z)- $\beta$ -ocimeno dihydrotagetone, (Z) - e (E) tagetone, e (Z) - e (E)-tagetenone [(Z) - e (E)-ocimenona] como componentes principais. Os resultados desta análise, demonstram que o óleo de *T. minuta* foi particularmente rico em limoneno (13,0%), piperitenona (12,2%), terpinoleno- $\alpha$  (11,0%), piperitone (6%), (E) tagetone (5,7%) e (Z)-ocimenona (5,1%). O óleo de *T. minuta* consistiu principalmente de hidrocarbonetos monoterpênicos (28,3%), monoterpênicos oxigenados (45,2%), sesquiterpênicos hidrocarbonetos (2,5%) sesquiterpênicos oxigenados (3,7%), diterpeno oxygenet (0,6%) e outros compostos (17,2%) (HADJIAKHOONDI et al., 2005; SHAHZADI et al., 2010).

Este óleo essencial tem amplas aplicações com elevada importância econômica e comercial devido à produção de metabólitos secundários, principalmente tiofenos, que apresentam uma variedade de efeitos, tais como nematocidas, bactericidas, fungicida e inseticida. As folhas deste vegetal são impregnadas de glândulas translúcidas, que contêm óleo essencial, de cheiro ativo e com ação inseticida, bem pronunciada. A porcentagem deste óleo, em volume e peso, revela-se, no entanto, relativamente pequena, em comparação com o cheiro que a própria planta, ao mais leve contato, desprende. Apresenta atividade contra nematóides do solo (JUNGES, 2009), a presença de

piretróides, justifica seu uso contra ectoparasitas, efeito inseticida contra piolho (*Pediculus humanus capitis*) (CESTARI, 2004) e possui efeito alelopático contra raízes de milho (*Zea mays*) (SCRIVANTI, 2003). As folhas também são usadas localmente para repelir formigas e mosquitos. Suas flores são usadas para fins ornamentais e medicinais, como aromatizantes, corantes e condimentos de alimentos (BATISH et al., 2007; HAMAYUN et al., 2006; OSMAN et al., 2008).

A *Tagetes minuta* L., tem reputação de planta tóxica e medicinal com propriedades antimicrobiana, antiinflamatório, antifúngica, antiviral, antiparasitárias, anti-aborto, diuréticas, enemagoga, laxativa, sudorífera, calmante da tosse, contra reumatismo articular, cólicas intestinais, dispepsia, resfriado, bronquite e afecções uterinas, antiespasmódico, hipotensor, broncodilatador, sedativo (ABBASI et al., 2010; BII; SIBOE; MIBEY, 2000; HADJIAKHUNDI et al., 2005; QURESHI et al., 2007; SHAHZADI et al., 2010; TERESCHUK; BAIGORI; ABDALA, 2005).

Extratos hidroalcóolicos das folhas de *T. minuta* já demonstraram atividade antibacteriana e antifúngica (FERRAZ E FREITAS, 2004). Cestari et al. (2004) demonstraram atividade pediculicida do óleo essencial de *T. minuta*, frente a *Pediculus humanus capitis*. Outros estudos já foram concretizados objetivando avaliar uso de *T. minuta* para controle de pragas em grãos armazenados (BII et al., 2000; RESTELLO; MENEGATT; MOSSI, 2009), como no estudo de Obongoyai et al. (2010) em controlar fungo do solo *Fusarium oxysporum*, inibindo a sua germinação de conídios.

Também foram promissores os resultados obtidos por Fiori et al. (2012) os quais demonstraram efeito acaricida da infusão aquosa, da tintura concentrada, da tintura simples e do óleo essencial de *T. minuta* sobre larvas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) (FURTADO et al., 2010; GARCIA et al., 2012).

No combate a microrganismos patogênicos (SOUZA; AVANCINI; WIEST, 2000) efeito larvicida contra *Aedes aegypti* (FURTADO et al., 2010) efetividade no controle de insetos de interesse à saúde pública (IRERI et al., 2010). Richter (2011) observou a atividade atrativa dos extratos aquosos de *T. minuta* para parasitóides, recomendando os extratos da planta como alternativa ao controle biológico de afídeos em *Avena sativa* e *Triticum vulgare* na África do Sul (MOYO et al., 2006; TOMOVA et al., 2005).



Junges et al. (2009) avaliando a penetração de *Meloidogyne incógnita* (Tylenchida: Heteroderidae) em raízes de tomateiros cultivados em solo pré-tratado com extrato aquoso e óleo essencial de *T. minuta*, verificaram que o extrato da planta aplicado no solo reduziu o número de nematóides penetrados nas raízes dos tomateiros.

Em outro estudo foi aplicado o pó da folha de *T. minuta* na plantação de arroz, na qual se observou a redução significativa do surgimento e crescimento de ervas daninhas (*Echinochloa crus-galli* e *Cyperus rotundus*) (BATISH et al., 2007). Bioensaios mostraram que frutos de *T. minuta* inibiram a germinação de espécies coabitantes, evidenciando efeito de alelopátia do chinchilho (LOPEZ et al., 2009).

A atividade antibacteriana dos extratos hidrolucóolicos e decocto do *T. minuta* L. ja foi demonstrada, possuindo potente ação contra bactérias Gram positivas, em especial, *Streptococcus* spp (SCHUCH et al., 2008; TERESCHUK et al., 2005) bem como ação alelopática sobre outras plantas (SCRIVANTI et al., 2003).

A ação antimicrobiana do extrato hidroalucóolico foi descrito por Oyedemi et al. (2008), frente as espécies como *Escherichia coli*, *Pseudomonas flourescense* e *Streptococcus pyogenes*. Analizando o tempo de exposição necessário para inibir os microorganismos relacionados com a mastite bovina, Schuch et al.(2008) testou os extratos hidroalucóolicos de *T. minuta*, na qual apresentou efeito positivo contra as bactérias *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* que inativaram completamente em 30s e 30 min de contato com o extrato, respectivamente.

### 3.5 Mastite

Na produção leiteira, um dos problemas sanitário e econômico de maior relevância é a ocorrência de mastite nas vacas em lactação, considerada como as principais causas de perdas econômicas na atividade leiteira, tanto para o produtor como para a indústria. No Brasil, os dados sobre custos são inconsistentes, onde estudos realizados em rebanhos leiteiros nos estados de São Paulo e Minas Gerais sugerem estimativas de custo para a mastite ficando em torno de US\$ 317,93 vaca/ano e US\$ 20.611,32 propriedade/ano (BARBOSA et al. , 2007).

A mastite constitui-se como uma reação da glândula mamária, com evolução aguda a crônica, causada por agentes de natureza infecciosa, toxica ou traumática. Ela se caracteriza por alterações químicas, físicas e organolépticas do leite e alterações no tecido glandular (LANGONI et. al., 2011). A reação inflamatória é um mecanismo de

defesa para eliminar o agente agressor, neutralizar suas toxinas e auxiliar no reparo dos tecidos produtores de leite (TOZZETTI et al., 2008).

Essa doença determina diminuição da produção e compromete a qualidade do leite pelo risco de veiculação de agentes patogênicos, diminuição de caseína, gordura e lactose, além de prejudicar o rendimento industrial e o tempo de conservação do produto no comércio, outro aspecto relevante são os riscos à saúde pública em virtude da eliminação de agentes causadores de zoonoses e toxinas produzidas pelos microorganismos. No que se refere ao produtor, ocorre o descarte de animais e o desprezo do leite contaminado (BARBOSA et al., 2007; LANGONI et al., 2011; RIET-CORREA, 2007; RODRIGUES, 2009; TOZZETTI et al., 2008).

A mastite pode se apresentar de duas formas, clínica ou subclínica. Na forma clínica caracteriza-se por apresentar sinais perceptíveis da doença, e alterações nas características físicas do leite, como presença de grumos, pús, sangue e leite aquoso, associadas ou não alterações no úbere, como dor, edema, inchaço e aumento de temperatura. Dependendo do microrganismo, pode haver comprometimento do animal, que pode se apresentar febril, desidratado, apático e se não for socorrido a tempo pode correr risco de morte (DIAS, 2007; MARTINS et al., 2010; MELLO-PEIXOTO et al., 2009).

O diagnóstico da mastite clínica é realizado pelo uso da caneca de fundo escuro onde são visualizadas alterações macroscópicas do leite. A mastite subclínica não possui alterações visíveis, exige emprego de outros métodos de diagnóstico, como a contagem de células somáticas (CCS), que é afetada, principalmente pela infecção intramamária, o diagnóstico se dá pelo resultado positivo aos testes de “California mastitis test” (CMT) entre outros, sendo confirmada pelo crescimento bacteriano. A forma subclínica apresenta maior importância, pois normalmente o processo é crônico e permanece no rebanho sem determinar sinais clínicos ou qualquer alteração macroscópica no úbere ou leite. Além disso, apresenta prevalência de 15 a 40 vezes maior que a forma clínica, e usualmente precede a mesma (MACHADO et al., 2008; FONTANA et al., 2010; PULLINGER et al., 2007; SAEKI et al., 2011; SANTOS et al., 2011; SOUZA, 2011).

A forma subclínica é transmitida durante a ordenha por microorganismos patogênicos adaptados à glândula mamária, principalmente pelas bactérias do gênero *Streptococcus* como *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* e também por espécie do gênero *Staphylococcus* como *S. aureus*, além de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

*K. oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, espécies de *Citrobacter*, *Serratia* e *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinomicetales* (*Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia asteróides* e *N. brasiliensis*), leveduras, fungos micelianos e algas (BUENO et al., 2006; COSTA, 2008; FERREIRA et al., 2007; MELLO-PEIXOTO et al., 2009; OYARZABAL et al., 2011; SAEKI et al., 2011; SANTOS E FONSECA, 2007; OLIVEIRA et al., 2011).

Em levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, *Staphylococcus aureus* podem estar presentes em até 70% das infecções da glândula mamária de bovinos leiteiros (ZANETTE et al., 2010; FERREIRA et al., 2007). A constante frequência dessas bactérias nos casos de mastite pode ser explicada pelo fato de que a pele do úbere e dos tetos são os principais sítios de localização dos agentes, o que facilita as infecções por esses microorganismos. Também pode sugerir que, nos rebanhos avaliados, não são realizadas medidas eficientes de controle da enfermidade (ZANETTE et al., 2010). Pesquisas demonstram que a alta prevalência da mastite pode estar associada às más condições de higiene do ordenhador, bem como dos tetos e úberes das vacas antes, durante e após a ordenha (OLIVEIRA et al., 2009).

O tratamento usual da mastite subclínica se faz utilizando antimicrobianos químicos, porém durante a lactação este tratamento é pouco frequente pela baixa eficácia da antibioticoterapia, os quais apresentam altos custos para o agricultor, resultando em consequências negativas para a saúde humana e equilíbrios do ambiente, pois na maioria das vezes, os medicamentos são administrados de forma indiscriminada, sem orientação técnica sobre a aplicação (ALMEIDA et al., 2011; SAEKI et al., 2012; SILVA et al., 2012).

A utilização de plantas na etnoveterinária para a prevenção e controle da mastite é bastante frequente. Diferentes espécies com propriedades antimicrobianas, têm sido descritas na literatura, demonstrando eficiência no controle e tratamento, como a utilização de extratos etanólicos das folhas de *Combretum molle* que apresentaram atividade antibacteriana para *S. aureus* e *S. agalactiae* isolados de casos clínicos de mastite bovina utilizando o método de difusão em disco de ágar em concentrações de 3mg/mL (REGASSA; ARAYA, 2012).

Em outro estudo testes *in vitro* mostraram que extratos de *Alternanthera brasiliensis*, *Achillea millefolium* e *Baccharis trimera* apresentaram atividade antibacteriana para *S. aureus* (AVANCINI et al., 2008). Fernandez et al. (2003), Avancini et al. (2006) e Tresoldi et al. (2006) realizaram ensaios experimentais usando as

inflorescências da planta medicinal *Achyrocline satureioides*, confrontando o decocto com bactérias padronizadas, evidenciando o seu potencial antibacteriano.

Pereira et al. (2008) avaliaram e comprovaram a atividade antimicrobiana dos extratos glicólicos de *Psidium guajava L.* contra cepas padrão de *Staphylococcus aureus*. Zanette et al. (2010) observaram *Staphylococcus aureus* em 70,9% das análises e Ferreira et al. (2007) identificaram o gênero *Staphylococcus sp.* em 74,6% dos casos da mastite bovina.

Loguercio et al. (2006) em seu experimento avaliou a atividade *in vitro* de um extrato de própolis obtida da região de Santa Maria, no estado Rio Grande do Sul, em solução alcoólica a 50%, contra agentes causadores da mastite bovina, sendo testado contra 63 linhagens bacterianas: 36 de *Staphylococcus* coagulase-positivas e 27 de *Streptococcus spp.* Dentre as amostras testadas, 90,5% foram sensíveis ao extrato da própolis, sendo o efeito contra os isolados *Staphylococcus* coagulase-positivas superior aos de *Streptococcus spp.* (94,4% contra 85,2%, respectivamente).

No seu estudo Vivot et. al. (2012), verificou a ação da *Blepharocalyx salicifolius*, frente às bactérias Gram negativas, onde seu extrato metanólico apresentou atividade contra *B. subtilis* e *P. aeruginosa*.

Dentro da pecuária agroecológica, o uso de plantas com potencial medicinal tem sido amplamente estudado na prevenção da mastite bovina e na alternativa ao uso destes produtos comerciais (BRANCO-NETO et. al., 2006; LIMA et. al., 2006; SHARMA et al., 2012).

## **4.1 Artigo 1**

**Atividade antibacteriana dos extratos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, com solventes de diferentes polaridades, sobre bactérias da mastite bovina**

Katiúscia Barbosa Bilhalva, Fernanda Voigt Mota, Cristina Jansen, Rogério Antonio Freitag, Luiz Filipe Damé Schuch, João Roberto Braga de Mello

1 **Atividade antibacteriana dos extratos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, com**  
2 **solventes de diferentes polaridades, sobre bactérias da mastite bovina**

3

4 **Antibacterial activity of *Schinus terebinthifolius* Raddi extracts draft, solvents of**  
5 **different polarities on bacteria from bovine mastitis**

6

7

8 Katiúscia Barbosa Bilhalva<sup>1\*</sup>, Fernanda Voigt Mota<sup>2</sup>, Cristina Jansen<sup>3</sup>, Rogério Antônio  
9 Freitag<sup>4</sup>, Luiz Filipe Damé Schuch<sup>2</sup>, João Roberto Braga de Mello<sup>1</sup>

10

11

12 <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Rio  
13 Grande do Sul – Porto Alegre, RS

14 <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Universidade Federal de Pelotas –  
15 Pelotas, RS

16 <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação da Nutrição de Alimentos – Universidade Federal de  
17 Pelotas – Pelotas, RS

18 <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Universidade Federal de  
19 Pelotas – Pelotas, RS

20

21

22

23

24 Endereço: Avenida Juscelino Kubitschek de Oliveira, n.1200, Bairro Areal – Pelotas/RS

25 –

26 CEP 96080-000

27 Telefone: (53) 30254355

28 Email: kbilhalva@ibest.com.br

## 29 **RESUMO**

30 *Schinus terebinthifolius* Raddi é uma planta pertencente à família Anacardiaceae  
31 popularmente conhecida como aroeira, aroeira-vermelha e pimenta-rosa. Apresenta  
32 diversas atividades terapêuticas relatadas na literatura científica, como: atividade  
33 antibacteriana, antiinflamatória, cicatrizante e antifúngica. Sabe-se que a infecção da  
34 glândula mamária dos bovinos pode ser eficientemente controlada, de forma preventiva, a  
35 partir da utilização de substâncias antimicrobianas nos tetos antes e após a ordenha. Com  
36 isso o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antibacteriana de extrações com solventes  
37 de diferentes polaridades de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) sobre  
38 bactérias relacionadas à mastite bovina. O trabalho foi realizado pela técnica de  
39 microdiluição serial em placas, utilizando extratos de diferentes partes da plantas (folhas e  
40 frutos) produzidos com solventes orgânicos, contra as bactérias *Escherichia coli*,  
41 *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e  
42 *Staphylococcus* sp. Os extratos de aroeira demonstraram bons resultados antibacterianos,  
43 sendo que o extrato metanólico possuiu melhor resultado contra as bactérias Gram  
44 positivas quando comparado com os demais solventes. E o extrato metanólico EAfr  
45 (Extrato Aroeira Fruto Maduro) apresentou, valores de CIM significativos frente as  
46 cepas Gram negativas. Mais estudos devem ser realizados a fim de testar a ação desta  
47 planta in vivo no controle da mastite.

48 **Palavras-chave:** Aroeira, solventes, antimicrobiano, extratos vegetais, mastite bovina

49

## 50 **ABSTRACT**

51 *Schinus terebinthifolius* Raddi is a plant belonging to the family Anacardiaceae popularly

52 known as mastic, mastic-red and pink pepper. Presents several therapeutic activities  
53 reported in the scientific literature, such as: antibacterial, anti-inflammatory, healing and  
54 antifungal. It is known that the infection of the mammary gland of cattle can be efficiently  
55 controlled in a preventive manner, from the use of antimicrobial substances teats before  
56 and after milking. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial  
57 activity of extractions with solvents of different polarities of *Schinus terebinthifolius*  
58 Raddi (Anacardiaceae) on bacteria related to bovine mastitis. The work was carried out  
59 by micro serial plating technique, used extracts from different parts of plants (leaves and  
60 fruit) produced with organic solvents, against the bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas*  
61 *aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus sp.* The  
62 mastic extracts showed antibacterial good results, and the methanol extract possessed  
63 better result against Gram positive bacteria compared to other solvents. And the methanol  
64 extract EAFr (Extract Aroeira Fruit Mature) showed, CIM significant values fronts  
65 gram-negative strains. More studies are needed to test the action of this in vivo plant in  
66 the control of mastitis.

67 **Keywords:** Mastic, solvents, anti-microbial, plant extracts, bovine mastitis

68

## 69 1. INTRODUÇÃO

70 O uso de plantas como alternativa terapêutica é uma das práticas mais remotas  
71 adotadas pelo homem, para o tratamento de suas enfermidades. Os crescentes interesses  
72 da comunidade científica pela fitoterapia nas últimas décadas levaram ao  
73 desenvolvimento de várias pesquisas baseadas em práticas populares (AVANCINI, 2008;  
74 CASAGRANDE, 2009; DUARTE, 2004; LIMA, 2007; SOARES, et al., 2004;  
75 VENDRUSCOLO & MENTZ, 2006).

76 A utilização desses produtos naturais e de baixo risco na produção animal vem



77 crescendo muito nos últimos anos, e com isso a medicina popular vem ganhando espaço  
78 na medicina veterinária, tanto no tratamento de enfermidades como de forma  
79 preventiva, com o intuito de substituir o uso de antibióticos e outros  
80 químico-convencionais que além do alto custo, causam danos tanto ao ambiente, quanto  
81 a saúde pública (WANZALA et al., 2005).

82 O uso medicinal da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é descrito há muitos  
83 anos e referido desde a primeira edição da Farmacopéia Brasileira (1926). A aroeira  
84 pertence à família Anacardiaceae, e é encontrada ao longo da costa brasileira (LEITE et  
85 al., 2011). É conhecida popularmente como aroeira vermelha, pimenta-rosa,  
86 aroeira-mansa, aroeira-pimenteira, aroeira-da-praia, aroeira precoce, aroeira do campo,  
87 aroeira-do-brejo, aroeira-do-sertão, aroeira-negra, aroeira-branca, aroeira-de-remédio,  
88 fruto de raposa, fruto de sabi, coração de bugre, cambuí, bálsamo, aroeira de sabiá,  
89 aroeira do Paraná, aguaraiça e careiba (CLEMENTE, 2006; RIBAS et al., 2006;  
90 TONIAL, 2010).

91 Resultados em animais têm confirmado o efeito da aroeira (*Schinus*  
92 *terebinthifolius* Raddi) como antiinflamatório, cicatrizante (COUTINHO et al., 2006;  
93 ESTEVÃO et al., 2013; RIBAS et al., 2006; SOUZA et al., 2007), antiúlcera (SOUZA et  
94 al., 2007), antimicrobiana, antifúngica (ALVES et al., 2009), anticancerígena  
95 BENDAOU et al., 2010), acaricida (NASCIMENTO et al., 2012), e antialérgica  
96 (CAVALHER-MACHADO et al., 2008).

97 A mastite é a doença mais freqüente em rebanhos leiteiros (LANGONI et al.,  
98 2011). É causada principalmente por agentes bacterianos, dos quais são mais freqüentes  
99 os que pertencem aos gêneros: *Staphylococcus* spp. *Streptococcus* spp. e  
100 *Corynebacterium* spp. (OYARZABAL et al., 2011). Em termos econômicos também é a

101 mais importante por ocasionar redução significativa da produção e acarretar em gastos  
102 elevados com medicamentos. (ZAFALON et al., 2008).

103 A ampla administração de antibióticos resulta na seleção de patógenos resistentes,  
104 além da presença de resíduos de antibióticos no leite (NICKERSON et al., 2009).  
105 Considerando todos esses aspectos tem-se buscado alternativas ao uso de antibióticos  
106 visando à redução no seu uso, diminuição no aparecimento de cepas resistentes e também  
107 como alternativa à produção orgânica (DIARRA et al., 2013). Com isso o objetivo deste  
108 trabalho foi avaliar a ação antibacteriana de extrações com solventes de diferentes  
109 polaridades de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) sobre bactérias  
110 relacionadas à mastite bovina.

111

## 112 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### 113 *2.1. Obtenção e secagem da planta*

114 As amostras de frutos verdes, maduros, e as folhas de *Schinus terebinthifolius*  
115 Raddi foram colhidas manualmente, em dois períodos distintos, nos períodos antes e  
116 durante a maturação dos frutos (maio a julho de 2012). Os frutos foram coletados em  
117 pontos aleatórios da planta, na copa e nas laterais das árvores. A coleta foi realizada  
118 sempre no período da manhã antes das 10:00 horas. Os frutos verdes foram coletados até  
119 o mês de maio, enquanto os frutos maduros foram coletados em períodos mais longos, no  
120 final de maio até julho. O material vegetal foi coletado de árvores, localizadas no Campus  
121 Universitário Capão do Leão, da Universidade Federal de Pelotas, município Capão do  
122 Leão, Rio Grande do Sul, em um raio de 1 Km a partir das referências geográficas 31°48'  
123 S 52°24' O, altitude 17m. As amostras coletadas foram encaminhadas para o Laboratório  
124 de Bacteriologia (DVP/FV/UFPel) para realização da separação manual dos galhos e

125 talos, restando apenas as folhas e os frutos. As amostras das folhas e frutos de Aroeira  
126 foram secas em telas de secagem em local seco e a sombra, protegido de insetos e outros  
127 animais durante o tempo aproximado de 10 e 15 dias. A identificação botânica e as  
128 exsiccatas foram depositadas no herbário do Instituto de Botânica da Universidade Federal  
129 de Pelotas e identificadas, aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi.- Voucher nº PEL  
130 25.131).

131

## 132 2.2. *Preparação dos extratos*

### 133 2.2.1. *Extração por solvente (Soxhlet)*

134 Empregou-se método IUPAC 1.122 (1979) com uso de cinco diferentes solventes.  
135 Foi fixada a velocidade/quantidade de 6 a 8 sifonagens por hora à temperatura constante.  
136 As amostras de folhas e frutos de aroeira foram trituradas e pesadas em balança analítica  
137 (20g), colocadas em um cartucho confeccionado, utilizando papel filtro e tampado com  
138 chumaço de algodão (ambos previamente desengordurados com éter de petróleo) e  
139 colocado no extrator de Soxhlet, encaixado em um balão volumétrico com capacidade de  
140 1000 mL, onde o solvente (600 mL) utilizado foi acrescentado. O condensador foi  
141 conectado e a manta de aquecimento ligada, permanecendo em ebulição por 6 horas  
142 consecutivas, sendo o tempo calculado a partir da primeira sifonada. A extração  
143 utilizando Soxhlet foi realizada com os seguintes solventes: acetato de etila, éter etílico,  
144 clorofórmio, metanol e hexano. Esses extratos foram subsequentemente concentrados e  
145 dessecados por rotaevaporação, e os sólidos resultantes foram ressuspensos em DMSO  
146 a 25%. Os extratos obtidos foram armazenados em frascos âmbar hermeticamente  
147 fechados, sob abrigo da luz a uma temperatura de 4°C.

148

### 149 2.3. *Microorganismos*

150 Os microrganismos testados foram: *Escherichia coli* (ATCC 8739),  
151 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600),  
152 *Staphylococcus sp.* e *Streptococcus agalactiae*, amostras isoladas de leite do Laboratório  
153 de Doenças Infecciosas da UFPel.

154

#### 155 2.4. Avaliação da atividade antibacteriana

156 A atividade antibacteriana dos extratos foi determinada pela técnica de  
157 microdiluição serial em placas de 96 orifícios em triplicata, a fim de ser determinada a  
158 concentração inibitória mínima (CIM). Os inóculos foram preparados a uma  
159 concentração de  $10^{(5-6)}$  UFC/mL em meio BHI 2x. A montagem da placa seguiu como  
160 descrita pelo documento CLSI M7-A6 (2005) adaptado para fitoterápicos. Foram feitas  
161 oito diluições diferentes, iniciando com 50% pois nesse orifício havia extrato e meio de  
162 cultura contendo a bactéria, depois sucessivamente 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 e  
163 0,39% e os testes foram realizados em triplicata. Após a incubação das microplacas por  
164 48h à 37°C, em estufa, alíquotas de 5µL de cada orifício foram transferidas para ágar  
165 sangue desfibrinado de ovino à 5% e incubadas à 37°C por mais 24 horas. Após a leitura  
166 dos crescimentos, a interpretação dos resultados foi realizada pela média geométrica das  
167 Concentrações Inibitórias Mínimas entendendo esta como, a menor concentração de  
168 extrato da planta, capaz de inibir o crescimento bacteriano a partir das alíquotas  
169 transferidas para o ágar sangue.

170

### 171 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

172

173 A atividade antibacteriana de extratos de plantas medicinais é avaliada através de  
174 técnicas que utilizam uma pequena quantidade da substância para inibir o microrganismo  
175 testado, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Esse método

176 utilizado é a microdiluição serial em placas, utilizando microplacas, é um método barato,  
177 tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos citados na literatura,

---

---

178 requerem pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de  
179 amostras e deixa registro permanente (OSTROSKY et al., 2008).

180 Os resultados referentes às porcentagens das Concentrações Inibitórias Mínimas  
181 (CBM) dos extratos das folhas e dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi frente às  
182 cinco bactérias testadas estão descritos nas tabelas abaixo.

183 Analisando os resultados obtidos dos extratos da folha (verde e madura), na tabela  
184 1 que mostra as Concentrações Bactericidas Mínimas dos extratos com os solventes de  
185 diferentes polaridades, em relação às bactérias testadas, notamos que os extratos  
186 metanólico, tanto EAF (Extrato Aroeira Folha Verde) quanto o EAF madura,  
187 apresentaram os menores valores de CIM em relação às bactérias Gram positivas, porém  
188 o extrato EAF verde demonstrou uma atividade contra *Escherichia coli* ATCC, com CIM  
189 de 8%.

190 Tabela 1. Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos extratos com diferentes solventes  
191 da folha verde e folha madura de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) frente às bactérias  
192 causadoras de mastite bovina.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) - %										
Bactérias	Folha Verde					Folha Madura				
	EAF Éter	EAF Metanol	EAF Acetato de etila	EAF Hexano	EAF Clorofórmio	EAF Éter	EAF Metanol	EAF Acetato de Etila	EAF Hexano	EAF Clorofórmio
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	63	16	100	100	100	100	40	16	100	100
<i>Staphylococcus</i> sp.	16	10	100	40	31	20	16	8	40	100
<i>Streptococcus agalactiae</i>	63	2	50	8	100	1	5	100	63	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	100	100	100	100	100	100	50	100	100	100
<i>Escherichia coli</i> ATCC	25	8	100	8	31	100	50	100	100	100

193 EAF: Extrato da Folha de aroeira

194

195 Tabela 2. Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos extratos com diferentes solventes  
 196 do fruto verde e fruto maduro de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) frente às bactérias  
 197 causadoras de mastite bovina.

198 EAFr: Extrato de Fruto de aroeira

199 Na tabela 2, foram avaliados os extratos dos frutos (verde e maduro) da aroeira,  
 200 onde podemos observar que os valores de CIM encontrados, foram semelhantes aos

Concentração Inibitória Mínima (CIM) - %										
Bactérias	Fruto Verde					Fruto Maduro				
	EAFr Éter	EAFr Metanol	EAFr Acetato de etila	EAFr Hexano	EAFr Clorofórmio	EAFr Éter	EAFr Metanol	EAFr Acetato de Etila	EAFr Hexano	EAFr Clorofórmio
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	100	16	50	100	100	3	2	8	8	2
<i>Staphylococcus</i> sp.	25	16	10	31	31	100	40	100	100	100
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	10	2	13	6	20	4	6	5	13
<i>Escherichia coli</i> ATCC	100	50	100	100	100	20	13	31	100	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	100	40	100	100	79	79	6	40	100	40

201 encontrados nas folhas, os extratos que mais obtiveram êxito quanto à atividade  
 202 antibacteriana foram os extratos preparados com o solvente metanol, apresentando os  
 203 menores valores de CIM. A Concentração Inibitória Mínima variou de 10% a 50%, para o  
 204 extrato metanólico EAFr ( Extrato Aroeira Fruto Verde), e de 2% a 40% para o extrato

205 metanólico EAFr (Extrato Aroeira Fruto Maduro). Sendo que este último extrato  
206 apresentou valores de CIM significativos quanto à atividade antibacteriana frente as  
207 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC e *Escherichia coli* ATCC, com CIM de 6% e  
208 13%, respectivamente. Discordando dos estudos de Alanis et al.(2005) com outra espécie  
209 de planta, que testou extratos metanólico e aquoso de *L. venustum* frente a linhagens de *E.*  
210 *coli*, na qual os extratos não foram considerados eficientes inibidores do crescimento  
211 bacteriano, uma vez que apresentaram percentuais de inibição abaixo de 50%, além disso,  
212 a atividade do extrato foi apresentada diante de uma concentração considerada muito  
213 elevada para aplicação clínica (HOUGHTON et al., 2007).

214 Os extratos metanólicos da folha e fruto verde de aroeira mostraram-se eficientes  
215 quando confrontados com as amostras bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC e  
216 *Staphylococcus sp* com valores baixos de concentração dos extratos. Já os diferentes  
217 extratos do Fruto maduro apresentaram um valor de CIM variando de 2% a 8% frente ao  
218 *Staphylococcus aureus* ATCC, menores valores encontrados quando comparados aos  
219 demais extratos (Tabela 2).

220 Do gênero *Staphylococcus sp.*, o *Staphylococcus aureus* é um importante agente  
221 causador de mastite em rebanhos leiteiros e com grande capacidade de resistência a  
222 antibióticos, diminuindo a taxa de cura da mastite (MELO et al.,2012).

223 LIMA et al. (2006) cita em um trabalho, que o extrato em etanol das cascas do  
224 tronco de *S. terebinthifolius* e as frações em hexano, clorofórmio e em acetato de etila,  
225 provenientes da partição deste, foram ativos frente a *Staphylococcus aureus*.

226 Em estudo realizado por Khan et al.(2004), testou os extratos metanólicos do  
227 caule, raiz, cascas do caule, folhas, frutos e sementes de *A. heterophyllus* contra fungos e  
228 bactérias. Ao analisar o efeito potencializador de antimicrobianos pelas frações de *L.*  
229 *venustum*, ficou evidente que as bactérias apresentaram maior susceptibilidade ao

230 produto natural que os fungos. Os resultados para as bactérias *Escherichia coli*  
231 apresentaram um halo de inibição nos valores médios de: 13.6mm (KHAN et al., 2004;  
232 AL-BURTAMANI et al., 2005). No entanto, Vivot et. al. (2012), verificou a ação da  
233 murta (*Murraya paniculata*) frente à Gram negativas, onde seu extrato metanólico  
234 apresentou atividade contra *B. subtilis* e *P. aeruginosa*.

235 Em teste de difusão em ágar, com o extrato hidroalcoólico da folha de aroeira,  
236 evidenciou atividade bacteriostática crescente de 200 a 400mg mL, sobre o crescimento  
237 de *S. aureus*. Apesar disso, não foi detectada atividade do extrato frente a *E. coli*.

238 DEGÁSPARI et al. (2005) analisaram a atividade antimicrobiana de extratos  
239 aquoso e alcoólico obtidos de frutos da aroeira. A fração alcoólica apresentou efeito  
240 inibitório sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

241 Guerra et al. (2000) realizou um estudo com as folhas da aroeira, onde utilizou  
242 extratos alcoólicos (80%) de *Schinus terebinthifolius* e houve inibição bacteriana e  
243 fúngica, entre as bactérias estavam *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. No presente estudo  
244 o extrato hidroalcoólico (70%) da planta inibiu o crescimento somente da *E. coli*.

245 Outro estudo de cunho odontológico realizado pelos mesmos autores apresentou  
246 resultados favoráveis da tintura da casca de aroeira a 20%, pelo método de difusão em  
247 ágar por perfuração, sobre *Staphylococcus mutans* contaminantes de escovas dentais. A  
248 tintura revelou atividade antibacteriana *in vitro* e foi eficaz na redução de contaminação  
249 das escovas por este microorganismo (SOARES et. al, 2007).

250 Neste trabalho o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto foi o  
251 metanol, pois provavelmente possibilita a extração de um maior número de compostos e  
252 maior atividade antimicrobiana.

253

254 **4. CONCLUSÃO**



255 Os resultados obtidos na avaliação da atividade antibacteriana da planta *Schinus*  
256 *terebinthifolius* Raddi, quando testada com os microorganismos relatados no presente  
257 trabalho permitiram concluir que desempenhou resultados promissores com o extrato de  
258 metanol. Os resultados preliminares obtidos pelo presente trabalho sugerem que a espécie  
259 *Schinus terebinthifolius* Raddi, sendo o extrato metanólico apresenta resultados  
260 promissores quanto ao potencial antimicrobiano.

261

## 262 5. REFERÊNCIAS

263 ALANIS AD, CALZADA F, CERVANTES JA, CEBALLOS GM. Antibacterial  
264 properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of  
265 gastrointestinal disorders. **J Ethnopharmacol** 100: 153 – 157, 2005.

266 AL-BURTAMANI SKS, FATOPE MO, MARWAH RG, ONIFADE AK, AI-SAIDI SH.  
267 Chemical composition, antibacterial, antifungal activities of the essential oil of  
268 *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. **J Ethnopharmacol** 96:107-112, 2005.

269 ALVES PM, QUEIROZ LM, PEREIRA JV, PEREIRA M do SV. *In vitro* antimicrobial,  
270 antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm  
271 microorganisms and strains of the genus *Candida*. **Rev Soc Bras Med Trop.**; 42(2):  
272 222-224, 2009.

273 AVANCINI, C., WIEST, J.M., DALL'AGNOL, R., HAAS, J.S., VON POSER, G.L.  
274 Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in  
275 southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy** 27, 894-899, 2008.

276 BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J.P.; CAZAUX, S.; BOUJILA, J.  
277 Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and

- 278 *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**, v.75, n.6,  
279 p. 466-72, 2010.
- 280 CASAGRANDE, A. Plantas medicinais e ritualísticas utilizadas pela comunidade do  
281 Morro da Cruz, Porto Alegre – RS. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharel em  
282 Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto  
283 Alegre, 2009.
- 284 CAVALHER MACHADO, S.C.; ROSAS,C.E.; BRITO,F.A.; HERINGE,A.P.;  
285 OLIVEIRA,R.R.; KAPLAN,M.A.; FIGUEIREDO,M.R.; HENRIQUES,M.D. The  
286 anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE  
287 induced mice paw edema and pleurisy. **International Immunopharmacology**, v.8, n.11,  
288 p.1552-60, 2008.
- 289 CLEMENTE A.D. Composição química e atividade biológica do óleo essencial da  
290 pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius Raddi*) 50p. (**Dissertação de Mestrado em**  
291 **Agroquímica**) – Viçosa, Minas Gerais, 2006.
- 292 CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for dilution  
293 antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically: **Approved**  
294 **Standard**. M7-A6; 2005.
- 295 COUTINHO IH, TORRES OJ, MATIAS JE, COELHOTAHLKE JÚNIOR HJ,  
296 AGULHAM MA, BACHLE E, CAMARGO PA, PIMENTEL SK, DE FREITAS AC.  
297 *Schinus terebinthifolius* Raddi and it's influence in the healing process of colonic  
298 anastomosis: experimental study in rats. **Acta Cir Bras** ,21 (3):49-54, 2006.
- 299 DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PARDO, M.R.M.. Atividade  
300 antimicrobiana de *Schinus terebentifolius* Raddi. **Ciênc. agrotec.**, v. 29, n.3,  
301 pág.617-622, 2005.
- 302 DIARRA, M.S.; BLOCK, G.; REMPEL, H.; OOMAH, D. B.; HARRISON, J.;

- 303 MCCALLUM, J.; BOULANGER, S.; BROUILLETTE, E.; GATTUSO, M.;  
304 MALOUIN, F. In vitro and in vivo antibacterial activities of cranberry press cake extracts  
305 alone or in combination with  $\beta$ -lactams against *Saphylococcus aureus*. **BMC**  
306 **complementary & alternative medicine**, Vol. 13, N.1, P. 90-114, 2013.
- 307 DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PERERIRA, B; MAGALHÃES, P;M; &  
308 DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da  
309 coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de**  
310 **Farmacognósia**. v.4, p:06-08, 2004.
- 311 ESTEVÃO LR, MENDONÇA FS, BARATELLA-EVÊNCIO L, SIMÕES RS, DE  
312 BARROS ME, ARANTES RM, RACHID MA, EVÊNCIO-NETO J. Effects of aroeira  
313 (*Schinus terebinthifoliu* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. **Acta Cir Bras**.  
314 28(3):202-209, 2013.
- 315 HOUGHTON PJ, HOWES M J, LEE CC, STEVENTON G. Uses and abuses of in vitro  
316 tests in ethnopharmacology: Visualising an elephant. **J Ethnopharmacol** 110: 391 – 400,  
317 2007.
- 318 KHAN, MR et al. Antibacterial activity of Artocarpus heterophyllus. **Fitoterapia** 74  
319 501– 505, 2003.
- 320 LANGONI H, PENACHIO DS, CITADELLA JCC. Aspectos microbiológicos e de  
321 qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**.31:1059-65. 2011.
- 322 LEITE, S.R.R.F, AMORIM, M.M.R., SERENO, P.F.B., LEITE, T.N.F., FERREIRA,  
323 J.A.C., XIMENES, R.A.A. Randomized clinical Trial comparing the efficacy of the  
324 vaginal use of metronidazole with a Brazilian pepper tree (*Schinus*) extract for the  
325 treatment of bacterial vaginosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological**  
326 **Research**. 44(3): 245-252, 2011.
- 327 LIMA MRF, LUNA JS, SANTOS AF, ANDRADE MCC, SANT'ANA AEG, GENET

- 328 JP, MARQUEZ B, NEUVILLE L, MOREAU N. Anti-bacterial activity of some  
329 Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 105: 137-147, 2006.
- 330 LIMA, S.M.G.; LIMA, A.F. & DONAZZOLO, J. Resgate do conhecimento popular e  
331 uso de plantas Medicinais na promoção da saúde em Sananduva – RS. **Revista Brasileira**  
332 **de Agroecologia**, 2(1):256-59, 2007.
- 333 MELO, P. C. et al. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes  
334 de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. **Biosci. J.**,  
335 Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 94-99, Jan./Feb, 2012.
- 336 NASCIMENTO, A.F.; CAMARA, C.A.; MORAES, M.M.; RAMOS, C.S. Essential oil  
337 composition and acaricidal activity of *Schinus terebinthifolius* from Atlantic Forest of  
338 Pernambuco, Brazil against *Tetranychus urticae*. **Natural Product**  
339 **Communications**, v.7, n.1, p.129-32, 2012.
- 340 NICKERSON, S. Control of heifer mastitis: antimicrobial treatment an overview.  
341 **Veterinary Microbiology** Vol. 134, P.128–135, 2009.
- 342 OSTROSKY, E.A., MIZUMOTO, M.K, LIMA, M.E.L., KANEKO, T.M,  
343 NISHIKAWA, S.O, FREITAS, B.R. Métodos para a avaliação da atividade  
344 antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas  
345 medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18(2): 301-307, 2008.
- 346 OYARZABAL ME, SCHUCH LFD, PRESTES LS, SCHIAVON DBA, RODRIGRES  
347 MRA, MELLO JRB. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare*  
348 L. ante bacterias aisladas em leche de bovino. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**.  
349 16(3): 260-266, 2011.
- 350 RIBAS, M.O et al. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo  
351 tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Rev. Odonto Cienc.** –  
352 Fac. Odonto/PUCRS, v.21, nº 53, pág. 245-252, 2006.

- 353 SOARES, E.L.C.; VENDRUSCOLO, G.S.; EISINGER, S.M. & ZACHIA, R.A. Estudo  
354 etnobotânico do uso dos recursos vegetais em São João do Polêsine, RS, Brasil, de  
355 outubro de 1999 a junho de 2001. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**.  
356 6(3):69-95, 2004.
- 357 SOUZA SMC, AQUINO LCM, MILACH JR AC, BANDEIRA MAM, NOBRE MEP,  
358 VIANA GSB. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon*  
359 *urundeuva* Allemão (anacardiácea) in rodents. **Phytotherapy Research**; 21(3): 220-225,  
360 2007.
- 361 TONIAL, F. Atividade Antimicrobiana de Endófitos e de Extratos Foliares de *Schinus*  
362 *terebenthifolius* Raddi (Aroeira). **Dissertação (Mestrado em Microbiologia)**.  
363 Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 17p. 2010.
- 364 VIVOT, E. P; SANCHEZ, C.; CACIK, F.; SEQUIN, C. Actividad antibacteriana em  
365 plantas medicinales de la flora de Entre Rios (Argentina). **Ciencia, docencia y**  
366 **tecnologia**, v. 2, n.45, p. 165-185, ago. 2012.
- 367 WANZALA. W.; ZESSIN, K. W.; KYULE, N. M.; BAUMANN, M. P. O.; MATHIAS,  
368 E.; HASSANALI, A. Ethnoveterinary medicine: a critical review of its evolution,  
369 perception, understanding and the way forward. **Livestock Research for Rural**  
370 **Development**, Cali, v. 17, artigo 117. 2005. Disponível em:  
371 <<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/11/wanz17119.htm>>. Acesso em: 07/12/2014.
- 372 ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; DE CARVALHO, M.R.B.; DE LIMA, T.M.A.  
373 Influencia da mastite subclínica bovina sobre as frações proteicas do leite. **Arquivos do**  
374 **Instituto Biológico**. 75:135-49, 2008.

## **4.2 Artigo 2**

**Atividade antibacteriana dos extratos de *Tagetes minuta* L., com solventes de diferentes polaridades, sobre bactérias da mastite bovina**

Katiúscia Barbosa Bilhalva, Fernanda Voigt Mota, Cristina Jansen, Rogério Antônio Freitag, Luiz Filipe Damé Schuch, João Roberto Braga de Mello

1 **Atividade antibacteriana dos extratos de *Tagetes minuta* L., com solventes de**  
2 **diferentes polaridades, sobre bactérias da mastite bovina**

3  
4 **Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. extracts draft, solvents of different**  
5 **polarities on bacteria from bovine mastitis**

6  
7  
8 Katiúscia Barbosa Bilhalva<sup>1\*</sup>, Fernanda Voigt Mota<sup>2</sup>, Cristina Jansen<sup>3</sup>, Rogério Antônio  
9 Freitag<sup>4</sup>, Luiz Filipe Damé Schuch<sup>2</sup>, João Roberto Braga de Mello<sup>1</sup>

10  
11  
12 <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Rio  
13 Grande do Sul – Porto Alegre, RS

14 <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Universidade Federal de Pelotas –  
15 Pelotas, RS

16 <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação da Nutrição de Alimentos – Universidade Federal de  
17 Pelotas – Pelotas, RS

18 <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Universidade Federal de  
19 Pelotas – Pelotas, RS

20  
21  
22  
23  
24 Endereço: Avenida Juscelino Kubitschek de Oliveira, n.1200, Bairro Areal – Pelotas/RS

25 –

26 CEP 96080-000

27 Telefone: (53) 30254355

28 Email: kbilhalva@ibest.com.br

## 29 **RESUMO**

30 *Tagetes minuta* L. é uma planta aromática, pertencente à Família das Asteraceae,  
31 originárias do México e introduzidas no Brasil há muitos anos. É popularmente  
32 denominada chinchilho, chinchilia, cravo-de-defunto, entre outras. Tem reputação de  
33 planta tóxica e medicinal com propriedades antimicrobiana, antiinflamatório,  
34 antifúngica, antiviral e antiparasitária. Mastite é a inflamação da glândula mamária  
35 caracterizada por alterações físicas, químicas e organolépticas do leite, além de alterações  
36 do tecido glandular. Pode ser causada por agentes químicos ou físicos, mas na maioria  
37 dos casos, são causadas por bactérias. Com isso o objetivo deste trabalho foi avaliar a  
38 ação antibacteriana de extrações com solventes de diferentes polaridades de *Tagetes*  
39 *minuta* L. sobre bactérias relacionadas à mastite bovina. O trabalho foi realizado pela  
40 técnica de microdiluição serial em placas, utilizado extratos de diferentes partes da planta  
41 (caule, folha e flor) produzidos com solventes orgânicos, contra as bactérias *Escherichia*  
42 *coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e  
43 *Staphylococcus* sp. Os extratos de chinchilho demonstraram bons resultados  
44 antibacterianos, sendo que o extrato metanólico da folha o que apresentou melhor  
45 resultado contra todas as cepas, mas com concentrações menores para *Staphylococcus*  
46 *aureus* ATCC e *Streptococcus agalactiae*. E o extrato chinchilho flor metanol mostrou  
47 maior eficiência antibacteriana para as bactérias Gram-negativas, principalmente  
48 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC. Mais estudos devem ser realizados a fim de testar a  
49 ação desta planta in vivo no controle da mastite.

50 **Palavras-chave:** Chinchilho, solventes, antibacteriana, mastite bovina

51



## 52 **ABSTRACT**

53 Tagetes minuta L. is an aromatic plant belonging to the family of Asteraceae, from  
54 Mexico and introduced in Brazil for many years. It is popularly called Chinchilho,  
55 chinchilia, marigold, among others. Has a reputation for toxic and medicinal plant with  
56 antimicrobial properties, anti-inflammatory, antifungal, antiviral and antiparasitic.  
57 Mastitis is an inflammation of the mammary gland characterized by physical, chemical  
58 and organoleptic changes of the milk, as well as changes in the glandular tissue. It may be  
59 caused by chemical or physical agents, but in most cases are caused by bacteria.  
60 Therefore, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of  
61 extractions with solvents of different polarities of Tagetes minuta L. on bacteria related to  
62 bovine mastitis. The work was carried out by micro serial plating technique, used extracts  
63 from different parts of plants (stem, leaf and flower) produced with organic solvents,  
64 against the bacteria Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus agalactiae,  
65 Staphylococcus aureus and Staphylococcus sp. The Chinchilho extracts showed  
66 antibacterial good results, and the methanol extract of the leaf showed the best result  
67 against all strains, but with lower concentrations for Staphylococcus aureus ATCC and  
68 Streptococcus agalactiae. And Chinchilho flower methanol extract showed higher  
69 antimicrobial efficiency for Gram-negative bacteria, especially Pseudomonas aeruginosa  
70 ATCC. More studies are needed to test the action of this in vivo plant in the control of  
71 mastitis.

72 **Keywords:** Chinchilho, solvents, antibacterial, bovine mastitis

73

## 74 **1. INTRODUÇÃO**

75 A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico é uma tendência  
76 generalizada na medicina popular brasileira e mundial. Esta tendência tem contribuído

77 significativamente para o consumo não só de plantas medicinais, como também de  
78 medicamentos fitoterápicos (OLIVEIRA et al., 2006 ; GRAVENA et al., 2010). Os  
79 princípios ativos das plantas vêm sendo estudados ao longo do tempo na história de nossa  
80 civilização, muito embora tenha sido colocada em segundo plano com o desenvolvimento  
81 das drogas sintéticas, principalmente pelo desenvolvimento da indústria  
82 químico-farmacêutica, o interesse por fitoterápicos aumentou significativamente, a partir  
83 da década de 90, e atualmente encontra-se em expansão em todo mundo, constituindo um  
84 mercado promissor (CEOLIN, 2009). Vários grupos têm dedicado atenção ao estudo de  
85 plantas consideradas medicinais através de pesquisas bibliográficas ou etnográficas,  
86 organizando seleções de espécies com diversas indicações terapêuticas, entre elas o uso  
87 como antimicrobianos (AVANCINI, 2008; CASAGRANDE, 2009; DUARTE, 2004;  
88 LIMA, 2007; SOARES, et al., 2004; VENDRUSCOLO & MENTZ, 2006).

89 A busca por novas substâncias com ação antimicrobiana, presentes em extratos  
90 obtidos de plantas a partir do seu metabolismo secundário com atividade biocida  
91 (bactericida, fungicida e inseticida) são reconhecidas empiricamente há séculos e hoje se  
92 busca comprovar essas atividades cientificamente, com efeitos indesejáveis mínimos,  
93 eficácia e segurança. A medicina veterinária vem se apropriando dos benefícios da  
94 medicina tradicional, na tentativa de substituir o uso de antibióticos e outros  
95 químico-convencionais que, além do alto custo, causam danos tanto ao ambiente, quanto  
96 a saúde (DUARTE et al., 2005; GALUPPI et al., 2010; LORENZI, 2008; MICHIELIN,  
97 2009; RAMIREZ; DIAZ, 2007; WANZALA et al. 2005).

98 A mastite constitui-se como uma reação da glândula mamária, com evolução  
99 aguda a crônica, causada por agentes de natureza infecciosa, toxica ou traumática. Ela se  
100 caracteriza por alterações químicas, físicas e organolépticas do leite e alterações no  
101 tecido glandular (LANGONI et. al., 2011). A reação inflamatória é um mecanismo de

102 defesa para eliminar o agente agressor, neutralizar suas toxinas e auxiliar no reparo dos  
103 tecidos produtores de leite (TOZZETTI et al., 2008; ZAFALON et al., 2008). Pode ser  
104 provocada por cerca de 130 agentes envolvidos, dentre eles, bactérias, vírus, fungos e  
105 algas (SPANAMBERG et al., 2009).

106 Em levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, *Staphylococcus*  
107 *aureus* podem estar presentes em até 70% das infecções da glândula mamária de bovinos  
108 leiteiros (ZANETTE et al., 2010; FERREIRA et al., 2007). A constante frequência dessas  
109 bactérias nos casos de mastite pode ser explicada pelo fato de que a pele do úbere e dos  
110 tetos são os principais sítios de localização dos agentes, o que facilita as infecções por  
111 esses microorganismos. Também pode sugerir que, nos rebanhos avaliados, não são  
112 realizadas medidas eficientes de controle da enfermidade (ZANETTE et al., 2010).  
113 Pesquisas demonstram que a alta prevalência da mastite pode estar associada às más  
114 condições de higiene do ordenhador, bem como dos tetos e úberes das vacas antes,  
115 durante e após a ordenha (OLIVEIRA et al., 2009).

116 A utilização de plantas na etnoveterinária para a prevenção e controle da mastite é  
117 bastante frequente. Diferentes espécies com propriedades antimicrobianas têm sido  
118 descritas na literatura, demonstrando eficiência no controle e tratamento. O uso de extrato  
119 de plantas tem sido sugerido tanto para tratamento como para desinfecção de tetos  
120 (SCHUCH et al., 2007), como a espécie *Tagetes minuta* L.

121 *Tagetes minuta* L é uma planta aromática nativa da América do Sul e  
122 vulgarmente conhecida como chinchilho, cravo-de-defunto, chinchila, picão do reino,  
123 entre outros. (KISSMANN; GROTH, 1992; LOOKERMAN et al., 2003; VISITIN &  
124 BERNADELLO, 2005). O gênero *Tagetes* pertence à família Compositae ou Asteraceae,  
125 é uma planta aromática, originárias do México e introduzidas no Brasil há muitos anos,  
126 onde se aclimataram perfeitamente, de ocorrência espontânea no Rio Grande do Sul, foi

127 espalhada pelo mundo logo após a conquista espanhola devido ao valor do seu óleo, cujo  
128 principal componente é a diidrotagetona (BABU, 2007; GIL, 2000; MAROTTI et al.,  
129 2004). A comunidade científica já elucidou outras propriedades de *T. minuta*, entre elas:  
130 atividade antiparasitária (ANDREOTTI et al, 2013), inseticida (LÓPEZ et al, 2011),  
131 antimicrobiana (OYEDEMI, et al., 2008; SCHUCH et al., 2008; TERESCHUK et al.,  
132 2005), antiviral (GHAEMI et al, 2010) bem como ação alelopática sobre outras plantas  
133 (LOPEZ et al., 2009; SCRIVANTI et al., 2003). Devido a pouca literatura encontrada  
134 sobre a atividade desta espécie, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação  
135 antimicrobiana de extrações com solventes de diferentes polaridades de *Tagetes minuta*  
136 L. sobre bactérias relacionadas à mastite bovina.

## 137 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

138

### 139 *2.1. Obtenção e secagem da planta*

140 As amostras de *Tagetes minuta* L. foram colhidas manualmente, no mês de junho  
141 de 2012, coletadas na Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata,  
142 Pelotas, RS, com referências geográficas 31°37'S e 52°31'W. Após a coleta as amostras  
143 foram encaminhadas para o Laboratório de Bacteriologia (DVP/FV/UFPel) para  
144 realização da separação manual das folhas, flores e caule. As amostras das folhas, flores e  
145 caule foram secas em telas de secagem em local seco e a sombra, protegido de insetos e  
146 outros animais durante o tempo aproximado de 10 e 15 dias. A identificação botânica e as  
147 exsiccatas foram depositadas no herbário do Instituto de Botânica da Universidade Federal  
148 de Pelotas e identificadas, chinchilho (*Tagetes minuta* Linnaeus.- Voucher nº PEL  
149 24659).

150

### 151 *2.2. Preparação dos extratos*

### 152 2.2.1. Extração por solvente (Soxhlet)

153 Empregou-se método IUPAC 1.122 (1979) com uso de cinco diferentes solventes.  
154 Foi fixada a velocidade/quantidade de 6 a 8 sifonagens por hora à temperatura constante.  
155 As amostras de folhas, flores e frutos de chinchilho foram trituradas e pesadas em balança  
156 analítica (20g), colocadas em um cartucho confeccionado, utilizando papel filtro e  
157 tampado com chumaço de algodão (ambos previamente esterilizados com éter de  
158 petróleo) e colocado no extrator de Soxhlet, encaixado em um balão volumétrico com  
159 capacidade de 1000 mL, onde o solvente (600 mL) utilizado foi acrescentado. O  
160 condensador foi conectado e a manta de aquecimento ligada, permanecendo em ebulição  
161 por 6 horas consecutivas, sendo o tempo calculado a partir da primeira sifonada. A  
162 extração utilizando Soxhlet foi realizada com os seguintes solventes: acetato de etila, éter  
163 etílico, clorofórmio, metanol e hexano. Esses extratos foram subsequentemente  
164 concentrados e dessecados por rotaevaporação, e os sólidos resultantes foram  
165 ressuspensos em DMSO a 25%. Os extratos obtidos foram armazenados em frascos  
166 âmbar hermeticamente fechados, sob abrigo da luz a uma temperatura de 4°C.

167

### 168 2.3. *Microorganismos*

169 Os microrganismos testados foram: *Escherichia coli* (ATCC 8739),  
170 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600),  
171 *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus agalactiae*, amostras isoladas de leite do Laboratório  
172 de Doenças Infecciosas da UFPel.

### 173 2.4. *Avaliação da atividade antibacteriana*

174 A atividade antimicrobiana dos extratos foi determinada pela técnica de  
175 microdiluição serial em placas de 96 orifícios em triplicata, a fim de ser determinada a  
176 concentração inibitória mínima (CIM). Os inóculos foram preparados a uma

177 concentração de  $10^{(5-6)}$  UFC/mL em meio BHI 2x. A montagem da placa seguiu como  
 178 descrita pelo documento CLSI M7-A6 (2005) adaptado para fitoterápicos. Foram feitas  
 179 oito diluições diferentes, iniciando com 50% pois nesse orifício havia extrato e meio de  
 180 cultura contendo a bactéria, depois sucessivamente 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 e  
 181 0,39% e os testes foram realizados em triplicata. Após a incubação das microplacas por  
 182 48h a 37°C, em estufa, alíquotas de 5µL de cada orifício foram transferidas para ágar  
 183 sangue desfibrinado de ovino à 5% e incubadas à 37°C por mais 24 horas. Após a leitura  
 184 dos crescimentos, a interpretação dos resultados foi realizada pela média geométrica das  
 185 Concentrações Inibitórias Mínimas entendendo esta como, a menor concentração de  
 186 extrato da planta, capaz de inibir o crescimento bacteriano a partir das alíquotas  
 187 transferidas para o ágar sangue.

### 188 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

189

190 Os resultados referentes às porcentagens das Concentrações Inibitórias Mínimas  
 191 (CBM) dos extratos da folha, flor e caule de *Tagetes minuta* L., frente às cinco bactérias  
 192 testadas, estão descritos nas tabelas abaixo.

193 O teste de microdiluição em caldo foi empregado para se determinar a CIM, que  
 194 corresponde à menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano.  
 195 Dessa forma, quanto menor o valor da CIM, maior a atividade antimicrobiana do extrato  
 196 contra a cepa testada.

197

198 Tabela 1: Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos extratos com diferentes solventes  
 199 da folha seca de *Tagetes minuta* L. frente a bactérias causadoras de mastite bovina.

<b>Concentração Inibitória Mínima (CIM) - %</b>					
<b>Bactérias</b>	<b>ECFL éter</b>	<b>ECFL metanol</b>	<b>ECFL acetato de etila</b>	<b>ECFL hexano</b>	<b>ECFL clorofórmio</b>

1	50	50	25	25	31
2	100	50	100	100	50
3	4	16	6	79	10
4	100	25	31	79	25
5	50	50	25	20	25

200 1. *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600); 2. *Staphylococcus* sp.; 3. *Streptococcus agalactiae*; 4. *Pseudomonas*  
 201 *aeruginosa* (ATCC 15442); 5. *Escherichia coli* (ATCC 8739)  
 202 ECFL – Extrato chinchilho folha

203  
 204 Na tabela1, estão os valores da CIM dos extratos preparados com a folha seca de  
 205 *Tagetes minuta* L., podemos observar que os extratos extraídos com metanol , acetato de  
 206 etila e clorofórmio, demonstraram melhor atividade antibacteriana, devido aos valores de  
 207 concentração serem menores quando comparados ao demais extratos de mesma parte da  
 208 planta. O ECFL metanol mostrou atividade frente a todas as cepas testadas, mas com  
 209 concentrações menores para *Staphylococcus aureus* ATCC e *Streptococcus agalactiae*,  
 210 com CIM de 25% e 16%, respectivamente. Já para o extrato chinchilho folha acetato de  
 211 etila, os valores foram de 25% e 6%, para as mesmas amostras bacterianas.

212

213 Tabela 2. Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos extratos com diferentes solventes  
 214 da flor de *Tagetes minuta* L. frente a bactérias causadoras de mastite bovina.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) - %					
Bactérias	ECFr éter	ECFr metanol	ECFr acetato de etila	ECFr hexano	ECFr clorofórmio
1	8	10	6	31	100
2	31	100	50	63	79
3	16	13	100	31	25
4	50	16	50	100	100
5	40	40	25	50	100

215 1. *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600); 2. *Staphylococcus* sp.; 3. *Streptococcus agalactiae*; 4. *Pseudomonas*  
 216 *aeruginosa* (ATCC 15442); 5. *Escherichia coli* (ATCC 8739)  
 217 ECFr – Extrato chinchilho flor

218

219 Os extratos da flor de *Tagetes minuta* L., obtiveram os melhores resultados (tabela  
 220 2) foram para os preparados com os solventes, éter e metanol. O ECFr metanol mostrou  
 221 maior eficiência antibacteriana para as bactérias Gram-negativas, com uma CIM de 16%  
 222 para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC.

223

224 Tabela 3. Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos extratos com diferentes solventes  
 225 do caule de *Tagetes minuta* L. frente a bactérias causadoras de mastite bovina.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) - %						
Bactérias	ECau éter	ECau metanol	ECau acetato de etila	ECau hexano	ECau clorofórmio	
1	100	63	25	100	31	
2	100	16	10	100	50	
3	31	20	6	79	10	
4	50	100	31	79	25	
5	50	63	25	20	25	

226 1. *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600); 2. *Staphylococcus* sp.; 3. *Streptococcus agalactiae*; 4. *Pseudomonas*  
 227 *aeruginosa* (ATCC 15442); 5. *Escherichia coli* (ATCC 8739)  
 228 ECCau - Extrato chinchilho caule  
 229

230 Na tabela 3, temos os valores da CIM, para os extratos do caule de *Tagetes minuta*  
 231 L., o extrato metanólico mostrou atividade antibacteriana frente a cepa de *Staphylococcus*  
 232 sp., com CIM de 16%. O extrato do caule de chinchilho elaborado com acetato de etila foi  
 233 efetivo frente a todas as amostras bacterianas testadas, com CIM variando de 6% a 31%.

234 As variações referentes à determinação da CIM de extratos de plantas podem ser  
 235 atribuídas a diferentes fatores, dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o  
 236 microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os  
 237 extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato  
 238 testada (OSTROSKY et al., 2008).

239 Esta diferença de ação pode estar relacionada não só aos próprios produtos  
 240 testados, como também devido à estrutura mais complexa da membrana externa das  
 241 bactérias Gram-negativas, que pode impedir a passagem de moléculas (FRANÇA et al.,  
 242 2009), além de particularidades relacionadas aos diferentes mecanismos de resistência  
 243 das linhagens em estudo.

244 Oyedemi et al. (2008), descreve a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico  
 245 frente as espécies como *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescense* e *Streptococcus*  
 246 *pyogenes*.

247 Schuch (2007) utilizou extratos hidroalcoólicos (EHA) e decoctos (DEC) das



248 plantas carqueja (*Baccharis trimera* Less.), picão preto (*Bidens pilosa* L.), eucalipto  
249 (*Eucalyptus* sp.), erva-de-bicho (*Polygonum hydropiper* L.) e chichilho (*Tagetes minuta*  
250 L.) para avaliar suas atividades antibacterianas frente a microrganismos causadores de  
251 mastite. Utilizou o método da microdiluição serial em placas e a cinética de inativação e  
252 as soluções desinfetantes produzidas foram confrontadas com 25 amostras bacterianas,  
253 sendo nove *Staphylococcus* coagulase positiva, sete *Staphylococcus* coagulase negativa,  
254 oito *Streptococcus* spp., e uma *Pseudomonas aeruginosa*. O autor concluiu que todos os  
255 extratos avaliados apresentaram ação antibacteriana. Que os decoctos de *T. minuta*  
256 apresentaram os melhores resultados, inclusive atuando frente a *P.aeruginosa*, embora  
257 em concentração mais alta do que frente às outras bactérias (p<0,05).

258 Schiavon (2011) avaliou a aplicação de um antisséptico obtido de extrato  
259 alcoólico de folhas de chinchilho (*Tagetes minuta* L.) e macerado de sementes de linhaça  
260 (*Linum usitatissimum* L.) ambos a 10%, na desinfecção de tetos pós-ordenha. Para efeito  
261 de comparação, também utilizou iodo comercial, só que nos quartos do lado direito. A  
262 autora não encontrou resultados estaticamente diferentes para os dois tratamentos ao  
263 avaliar a prevalência semanal de mastite subclínica pelo CMT e a incidência de novas  
264 infecções intramamárias.

265 MOTA et al.,(2011) ao comparar diferentes formas de obtenção do extrato  
266 hidralcoólico de folhas de *Baccharis trimera* (Less.) DC, *Bidens pilosa* L., *Eucalyptus*  
267 sp.e *Tagetes minuta* L., utilizando folhas secas e folhas verdes e diferentes concentrações  
268 de etanol, frente a *Sthaphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, concluiu que o  
269 extrato de *T. minuta* produzido a partir de folhas secas com álcool 70<sup>o</sup>, inativou ambas as  
270 bactérias testadas.

271 Gonçalves et al., (2012) em estudo do óleo de *Tagetes minuta* apresentou  
272 atividade frente aos isolados bacterianos com valores de CIM variando de 0,62%,para um

273 isolado de *Staphylococcus* coagulase positiva, à 5% para *Escherichia coli* ATCC.

274

#### 275 **4. CONCLUSÃO**

276 Os resultados obtidos na avaliação da atividade antibacteriana da planta *Tagetes*  
277 *minuta* L., quando testada com os microorganismos relatados no presente trabalho  
278 permitiram concluir que desempenhou resultados promissores com o extrato de metanol.

279

#### 280 **5. REFERÊNCIAS**

281 ANDREOTTI, R.; GARCIA, M.V.; CUNHA, R.C.; BARROS, J.C.; Protective action of  
282 *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus*  
283 (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial. **Veterinary Parasitology**, v.197,  
284 n.1, p.341-345, 2013.

285 AVANCINI, C., WIEST, J.M., DALL'AGNOL, R., HAAS, J.S., VON POSER, G.L.  
286 Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in  
287 southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy** 27, 894-899, 2008.

288 BABU, K.G. D; KAUL, V.K; Variations in Quantitative and Qualitative Characteristics  
289 of Wild Marigold (*Tagetes minuta* L.) Oils Distilled Under Vacuum and at NTP  
290 **Industrial Crops and Products**, v.26, 241–251, 2007.

291 CASAGRANDE, A. Plantas medicinais e ritualísticas utilizadas pela comunidade do  
292 Morro da Cruz, Porto Alegre – RS. **Tese** (Bacharel em Doutorado em Ciências  
293 Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

294 CEOLIN, TILA et al. Plantas medicinais utilizadas como calmantes por agricultores  
295 ecológicos da região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Journal of Nursing UFPE on**  
296 **line**, 3.4 , 1034-1041, 2009.

297 CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for dilution

- 298 antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically: **Approved**  
299 **Standard**. M7-A6; 2005.
- 300 DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PERERIRA, B; MAGALHÃES, P;M; &  
301 DELARMELENA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da  
302 coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de**  
303 **Farmacognósia**. v.4, p:06-08, 2004.
- 304 DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATO, A.; REHDER, V.L.;  
305 DELARMELENA, C. Anti- *Candida* acitivity of Brazilian medicinal plants. **Journal of**  
306 **Ethnopharmacology**, v.97, p.305-311, 2005.
- 307 FERREIRA, J. L et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de  
308 Teresina, Piauí. **Ciênc. Anim. Bras.**, Teresina, v. 8, n. 2, p. 261-266, 2007.
- 309 FRANÇA, H.S. et al. Atividade antibacteriana de floroglucinóis e de extrato hexânico de  
310 *Hypericum brasiliense* Choysi. **Química Nova**, v.32, p.1103-6, 2009.
- 311 GALUPPI, R.; AURELI, S.; BONOLI, C.; OSTANELLO, F.; GUBELLINI, E.;  
312 TAMPIERE, M. P. Effectiveness of essential oils against *Malassezia* spp.: comparison  
313 of two *in vitro* tests. **Mikologia Lekarska**, v.17, n.2, p.79-84, 2010.
- 314 GHAEMI, A., et al. Antiviral activity of root extracts from *Tagetes minuta* against Herpes  
315 simplex virus (HSV-1). **Iranian Journal of Pharmaceutical Research** 72-72, 2010.
- 316 GIL, A; GHERSA, C.M; LEICACH, S. Essential Oil Yield and Composition of *Tagetes*  
317 *minuta* Accessions from Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.28, 261 -  
318 274, 2000.
- 319 GONÇALVES, C.L.; FACCIN, Â.; SCHIAVON, D.B.A.; SCHUBERT, R. N.;  
320 SCHIEDECK, G.; SCHUCH L.F.D.; Sensibilidade de bactérias isoladas de leite ao óleo  
321 essencial de *Tagetes minuta* L. XXII Simpósio de Plantas Mediciniais, Bento Gonçalves/  
322 RS. In: **Anais XXII Simpósio de Plantas Mediciniais**, 2012.

- 323 GRAVENA, R.A. et al. Efeitos fisiológicos e comportamentais do uso do extrato de  
324 Valeriana em dietas de codornas em crescimento. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 3, p.  
325 407-414, 2010.
- 326 KISSMANN, K. G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. **Ludwigshaven :**  
327 **BASF**,1992.
- 328 LANGONI, H., PENACHIO, D. S., CITADELLA, J. C. C. Aspectos microbiológicos e  
329 de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**.v 31, n.12, p. 1059-65,  
330 2011.
- 331 LIMA, S.M.G.; LIMA, A.F. & DONAZZOLO, J. Resgate do conhecimento popular e  
332 uso de plantas Medicinais na promoção da saúde em Sananduva – RS. **Revista Brasileira**  
333 **de Agroecologia**, 2(1):256-59, 2007.
- 334 LOOKERMAN, DJ, BL TURNER e RK JANSEN. Filogenética relações dentro da  
335 *Tagetes* (Asteraceae) com base em nuclear ITS ribossomais e sequências de genes de  
336 cloroplastos ndhF. **Syst.Bot.**28 (1): 191- 207, 2003.
- 337 LÓPEZ, S.B.; LÓPEZ, M.L.; ARAGÓN, L. M.; TERESCHUK,M.L.; SLANIS,A.C.;  
338 FEREN, G.E.; ZYGADLO,J.A.; TAPIA, A.A. Composition and anti-insect activity of  
339 essential oils from *Tagetes* L. species (Asteraceae, *Helenieae*) on *Ceratitis capitata*  
340 Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. **Journal of Agricultural and Food**  
341 **Chemistry**,v.14, n. 10, p.25-59, 2011.
- 342 LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais do Brasil – Nativas e Exóticas. Ed.  
343 **Plantarum: Nova Odessa** – SP; 2ª ed., p. 63-64, 2008.
- 344 MAROTTI, M. et al. Characterization and yield evaluation of essential oils from different  
345 *Tagetes* species. **Journal of Essential oil Research**, v. 16, n. 5, p. 440-444, 2004.
- 346 MICHIELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA JÚNIOR, A.;  
347 SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Chemical composition and antibacterial activity

- 348 of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresourse Technology**,  
349 v. 100, p. 6615-23, 2009.
- 350 MOTA, F.M.; GONÇALVES, C.L.; SCHUCH, L.F.D.; COIMBRA, H.S.; HARTWIG,  
351 C. Comparación de distintas extracciones hidroalcohólicas de plantas con indicativo  
352 etnográfico antiséptico/desinfectante. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.16,  
353 n.3, p. 236-246, 2011.
- 354 OLIVEIRA, A. A.; MELO, C. B.; AZEVEDO, H. C. Diagnóstico e determinação  
355 microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de  
356 Sergipe. **Ciênc. Anim. Bras.**, Sergipe, v. 10, n. 1, p. 226-230, 2009.
- 357 OLIVEIRA, R.A.G. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de  
358 alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.16, n.1,  
359 p.77-82, 2006.
- 360 OSTROSKY, E.A., MIZUMOTO, M.K, LIMA, M.E.L., KANEKO, T.M,  
361 NISHIKAWA, S.O, FREITAS, B.R. Métodos para a avaliação da atividade  
362 antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas  
363 medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18(2): 301-307. 2008.
- 364 OYEDEMI SO, PIROCHENVA G, MABINYA LV, BRADLEY G, AFOLAYAN AJ.  
365 Compositions and comparisons of antimicrobial potencies of some essential oils and  
366 antibiotics against selected bacteria. **African J Biotechnology**.7(22):4140-6, 2008.
- 367 RAMIREZ, L.S.; DIAZ, H.E. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del  
368 ruibarbo. **Scientia et Technica**, v.13, nº 33, pág. 397-400, 2007.
- 369 SCHIAVON, D. B. A. Aplicação de um fitoterápico na anti-sepsia de tetos de vacas  
370 pós-ordenha. 36f. **Dissertação** (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Veterinária.  
371 Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.
- 372 SCHUCH, L. F. D.; WIEST, J. M.; COIMBRA, H.S.; PRESTES, L.S.; TONI, L.;

- 373 LEMOS, J. S. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente à  
374 microrganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p.  
375 161-169, 2008.
- 376 SCHUCH, L.F.D. Plantas medicinais em atenção primária veterinária: atividade  
377 antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e com dermatófitos.  
378 **Tese de Doutorado**. PPG em Ciências Veterinárias, UFRGS. 256p. 2007.
- 379 SCRIVANTI, L.R., ZUNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A.. *Tagetes minuta* and *Schinus*  
380 *aroeira* essential oils as allelopathic agents. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.  
381 31, n.6, p.563-572, 2003.
- 382 SOARES, E.L.C.; VENDRUSCOLO, G.S.; EISINGER, S.M. & ZACHIA, R.A. Estudo  
383 etnobotânico do uso dos recursos vegetais em São João do Polêsine, RS, Brasil, de  
384 outubro de 1999 a junho de 2001. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s.  
385 6(3):69-95, 2004.
- 386 SPANAMBERG, ANDRÉIA, et al. Mastite micótica em ruminantes causada por  
387 leveduras. **Ciência Rural** 39.1, 282-290, 2009.
- 388 TERESCHUK ML. Actividad biológica de flavonoides de Especies de *tagetes* más  
389 representativas del noroeste argentino (**tesis doctoral**). Tucumán: Universidad Nacional  
390 de Tucumán; 2005.
- 391 TOZZETTI, D.S. et al. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de  
392 literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n.10, 2008.
- 393 VENDRUSCOLO, G.S. & MENTZ, L.A. Levantamento etnobotânico das plantas  
394 utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio  
395 Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, 61(1-2):83-103, 2006.

- 396 VISITIN, A.; BERNADELLO, G., Morfología y Anatomía floral de *Tagetes minuta* L.  
397 (Asteraceae), n.12., Córdoba-Argentina., Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal  
398 **CONICET.**, Pp. 8-15, 2005.
- 399 WANZALA, W.; ZESSIN, K.W.; KYULE, N.M.; BAUMANN, M.P.O.; MATHIAS, E.;  
400 HASSANALI, A. Ethnoveterinary medicine: a critical review of its evolution,  
401 perception, understanding and the way forward. **Livestock Research for Rural**  
402 **Development**, Cali, v. 17, artigo 117. 2005.
- 403 ZAFALON. L.F., NADER FILHO, A., OLIVEIRA, J.V., RESENDE, F.D. Mastite  
404 subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de  
405 vacas em lactação. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59,  
406 n.3, p.577-585, 2008.
- 407 ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E. M. Suscetibilidade antimicrobiana de  
408 *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite.  
409 **Unoesc & Ciência – ACBS**, Santa Catarina, v. 1, n. 1, p. 65-70, 2010.

### **4.3 Artigo 3**

**Rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes partes da  
planta de *Schinus terebinthifolius* Raddi**

Katiúscia Barbosa Bilhalva, Fernanda Voigt Mota, Cristina Jansen, Fabrizio da Fonseca  
Barbosa, Luiz Filipe Damé Schuch, João Roberto Braga de Mello



1 **Rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes partes da**  
2 **planta de *Schinus terebinthifolius* Raddi.**

3

4 **Yield antimicrobial activity and oil essential in different parts of *Schinus***  
5 ***Terebinthifolius* Raddi plant.**

6

7 Katiúscia Barbosa Bilhalva<sup>1\*</sup>, Fernanda Voigt Mota<sup>2</sup>, Cristina Jansen<sup>3</sup>, Fabrizio da  
8 Fonseca Barbosa<sup>4</sup>, Luiz Filipe Damé Schuch<sup>2</sup>, João Roberto Braga de Mello<sup>1</sup>

9

10

11 <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Rio  
12 Grande do Sul – Porto Alegre, RS

13 <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Universidade Federal de Pelotas –  
14 Pelotas, RS

15 <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação da Nutrição de Alimentos – Universidade Federal de  
16 Pelotas – Pelotas, RS

17 <sup>4</sup>Professor Adjunto – Centro de Ciências Químicas, Farmacêticas e de Alimentos –  
18 Universidade Federal de Pelotas – Pelotas, RS

19

20

21

22

23 Endereço: Avenida Juscelino Kubitschek de Oliveira, n.1200, Bairro Areal – Pelotas/RS

24 –

25 CEP 96080-000

26 Telefone: (53) 30254355

27 Email: kbilhalva@ibest.com.br

28 **RESUMO**

29 A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) é popularmente conhecida  
30 como aroeira, aroeira-vermelha e pimenta-rosa. Seu óleo essencial presente nas folhas e  
31 frutos revelado em pesquisas demonstrou atividade antimicrobiana devido à presença de  
32 diversos compostos químicos com atividade contra inúmeros microorganismos. Com isso  
33 o objetivo deste trabalho foi avaliar o rendimento e a atividade antimicrobiana do óleo  
34 essencial das folhas e dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi em dois estádios  
35 fenológicos diferentes. A extração do óleo essencial foi realizada em triplicata, pelo  
36 método de hidrodestilação, usando-se aparelho Clevenger. Para a avaliação da atividade  
37 antimicrobiana o trabalho foi realizado pela técnica de microdiluição serial em placas, a  
38 fim de ser determinada a concentração inibitória mínima (CIM), utilizando óleos de  
39 diferentes partes da planta (folhas e frutos) contra as bactérias *Escherichia coli*,  
40 *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e  
41 *Staphylococcus* sp. O resultado obtido revela que a maior porcentagem de teor de óleo  
42 essencial foi no fruto maduro, com valor de 5,85% e a parte da planta que obteve o menor  
43 valor foi na folha verde com valor de 0,52%. Os óleos essenciais que apresentaram os  
44 menores valores de CIM em relação às bactérias Gram positivas foram os da folha verde e  
45 do fruto maduro, para as bactérias *Staphylococcus* sp. 6%, e *Staphylococcus aureus*  
46 ATCC 8% respectivamente. Os óleos essenciais não tiveram ação bactericida com a  
47 concentração testada contra as bactérias Gram negativas, bem como o óleo essencial da  
48 folha madura que não inibiu o crescimento das bactérias Gram positivas e Gram  
49 negativas. Diante do potencial apresentado pelos óleos essenciais da aroeira é relevante

50 uma melhor investigação, a fim de se conhecer com detalhes as características dessa  
51 espécie vegetal.

52 **Palavras-chave:** Aroeira, rendimento, antimicrobiano, óleo essencial

53

54 **ABSTRACT**

55 The species *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) is popularly known as  
56 mastic, mastic-red and pink pepper. Its essential oil present in the leaves and fruits  
57 revealed in studies demonstrated antimicrobial activity due to the presence of various  
58 chemical compounds with activity against many microorganisms. Therefore, the  
59 objective of this study was to evaluate the performance and antimicrobial activity of  
60 essential oil of leaves and fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi in two different growth  
61 stages. The essential oil extraction was performed in triplicate by hydrodistillation  
62 method using Clevenger apparatus. To evaluate the antimicrobial activity the work was  
63 done by micro serial plating technique, in order to be determined the minimum inhibitory  
64 concentration (MIC) using oils from different parts of the plant (leaves and fruits) against  
65 the bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*,  
66 *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus sp.* The result shows that the highest  
67 percentage of essential oil content was in ripe fruit, with a value of 5.85% and the part of  
68 the plant that had the lowest value was on green leaf with a value of 0.52%. The essential  
69 oils showed the lowest MIC values in relation to Gram positive bacteria were the green  
70 leaf and ripe fruit, for bacteria *Staphylococcus sp.* 6%, and *Staphylococcus aureus* ATCC  
71 8% respectively. Essential oils had no bactericidal activity at the concentration tested  
72 against Gram negative bacteria as well as the essential oil of the mature leaf which did not  
73 inhibit the growth of Gram positive and Gram negative bacteria. Given the potential  
74 presented by the essential oils of mastic is relevant better research in order to know in

75 detail the characteristics of this plant species.

76 **Keywords:** Mastic, income, antimicrobial, essential oil

77

## 78 1. INTRODUÇÃO

79 O uso de plantas medicinais tem sido praticado há muitos anos no Brasil,  
80 principalmente por habitantes do interior do país. A partir dessas plantas, princípios  
81 ativos são extraídos para a fabricação de medicamentos utilizados para o tratamento e  
82 cura de doenças. A limitação das terapias atualmente adotadas tem motivado a produção  
83 de novos fármacos no combate as mais diferentes enfermidades e visa minimizar seus  
84 efeitos ao homem, animais e meio ambiente, impulsionando as pesquisas relacionadas  
85 com produtos naturais (LIMA et al., 2006).

86 As plantas aromáticas têm sido reconhecidas como novos insumos pela indústria  
87 farmacêutica e tem despertado o desenvolvimento de pesquisa utilizando óleos e extratos  
88 de plantas de conhecimento popular, servindo de base para estudos com comprovação  
89 científica da atividade antimicrobiana (BENDAOUND et al., 2010; NASCIMENTO et  
90 al., 2007).

91 Óleos essenciais estão presentes nas plantas aromáticas e constituem elementos  
92 voláteis geralmente à temperatura ambiente, por apresentarem volatilidade, são líquidos  
93 de aparência oleosa chamados de essências, devido ao aroma agradável e intenso da  
94 maioria de seus representantes e está relacionado com diversas funções necessárias à  
95 sobrevivência vegetal, exercendo, papel fundamental na defesa contra microrganismos.  
96 Os óleos essenciais são encontrados nas folhas, ramos, cascas, frutos, flores, raízes,  
97 tronco, resinas, e sementes (SAITO & SCRAMIN, 2000).

98 Muito conhecida dos brasileiros, a espécie *Schinus terebenthifolia* Raddi,  
99 (Anacardiaceae), tem seus efeitos descritos na medicina popular em regiões distintas do

100 Brasil (RIBAS et al., 2006). Popularmente conhecida como aroeira, aroeira-vermelha,  
101 pimenta-rosa, aroeirinha, aroeira mansa, aroeira pimenteira, fruto-de-sabiá, cambuí, entre  
102 outros (LENZI; ORTH, 2004). É uma árvore de folhas perenes, típica da vegetação  
103 litorânea brasileira, pode ser encontrada em algumas regiões da Europa e em outras  
104 regiões da América, nativa do Brasil e da América do Sul (LEITE et al., 2011; LENZI &  
105 ORTH, 2004; LORENZI & MATOS, 2008; SANTOS et al., 2007; SANTOS et al.,  
106 2009).

107       Espécie pioneira e dióica, seus frutos são do tipo drupa e têm coloração verde no  
108 início e depois se tornam vermelhos brilhantes (BENDAOUND et al., 2010; COUTINHO  
109 et al., 2006; JESUS & FILHO, 2007) Apresenta propriedades adstringentes,  
110 antidiarréicas, antiinflamatória, cicatrizantes, depurativas, diuréticas e febrífugas. Na  
111 medicina popular, todas as partes da planta têm sido descritas para o tratamento de  
112 diversas patologias, devido à composição química de seus óleos essenciais atribui-se  
113 atividade antimicrobiana sobre bactérias gram positivas (BARBOSA et al., 2007;  
114 COSTA et al., 2010; DEGÁSPARI et al., 2005; EL-MASSRY et al., 2009; LIMA et al.,  
115 2006; MEDEIROS et al., 2007).

116       Seu óleo essencial possui atividade antimicrobiana devido à presença de diversos  
117 compostos químicos, como alcoóis, cetonas, ácidos, monoterpenos, sesquiterpenos e  
118 triterpenos, presentes no caule, folhas e frutos (COLE, 2008; FENG & ZHENG, 2007;  
119 LIMA et al., 2006), que já foi demonstrada, *in vitro*, contra diversos microorganismos  
120 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*  
121 *aureus* entre outros) e várias espécies de fungos (BARBOSA et al., 2007; CARVALHO  
122 et al, 2013; DEGÁSPARI et al., 2005; IBRAHIM et al., 2010; MEDEIROS et al.,2007;  
123 NUNES JR et al.,2006; SANTOS et al., 2006; SILVA et al., 2010).

124 As plantas medicinais podem ser tão eficazes quanto os fármacos produzidos por  
125 síntese química, tornando foco de intensos estudos em termos de validação de seus usos  
126 tradicionais (OYARZABAL et al., 2011), com isso o objetivo deste trabalho foi avaliar o  
127 rendimento e a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas e dos frutos de  
128 *Schinus terebinthifolius* Raddi em dois estádios fenológicos diferentes.

129

## 130 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### 131 *2.1. Obtenção e secagem da planta*

132 As amostras de frutos verdes e maduros, e de folhas de *Schinus terebinthifolius*  
133 Raddi foram colhidas manualmente, em dois períodos distintos, antes e durante a  
134 maturação dos frutos (maio e julho de 2012). Os frutos foram coletados em pontos  
135 aleatórios da planta, na copa e nas laterais das árvores. A coleta foi realizada sempre no  
136 período da manhã antes das 10 horas. Os frutos verdes foram coletados no mês de maio,  
137 enquanto os frutos maduros foram coletados em julho. O material vegetal foi coletado de  
138 árvores, localizadas no Campus Universitário Capão do Leão, da Universidade Federal de  
139 Pelotas, município Capão do Leão, Rio Grande do Sul, em um raio de 1Km a partir das  
140 referências geográficas 31°48' S 52°24' O, altitude 17m. As amostras coletadas foram  
141 encaminhadas para o Laboratório de Bacteriologia (DVP/FV/UFPel) para realização da  
142 separação manual dos galhos e talos, restando apenas as folhas e os frutos. As amostras  
143 das folhas e frutos foram secas em telas de secagem, em local seco e a sombra, protegido  
144 de insetos e outros animais, até atingirem a umidade de aproximadamente 13%.

145 A identificação botânica e as exsicatas foram depositadas no herbário do Instituto  
146 de Botânica da Universidade Federal de Pelotas e identificadas, aroeira (*Schinus*  
147 *terebinthifolius* Raddi. - Voucher nº PEL 25.131).

148

## 149 2.2. *Determinação da umidade*

150 A determinação da umidade foi realizada depois da secagem, conforme  
151 metodologia descrita em pela Asae Standards (ASAE, 2000) para forrageiras e similares  
152 (plantas ou folhas), com adaptações. Foram utilizadas 2g de amostra, colocando em  
153 cadinhos de porcelana, previamente tarados, os quais foram secos em estufa com  
154 circulação forçada de ar em temperatura de  $103\pm 2$  °C, onde permaneciam por 24 horas,  
155 sendo realizadas três repetições. Após esse período, os cadinhos foram retirados e  
156 mantidos em dessecador até atingirem a temperatura ambiente. A percentagem (%) de  
157 matéria seca (MS) a  $103\pm 2$  °C foi obtida através da Equação 1, onde: Pa refere-se ao peso  
158 da amostra, Pu é o peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação, Ps é o peso  
159 do cadinho contendo a amostra após a dessecação. A percentagem de matéria seca das  
160 amostras foi obtida a partir da média de triplicatas conforme Equação 1:

161 **Equação 1:**  $MS(\%) = (Pu - Ps) \times 100/Pa$

162

## 163 2.3. *Extração, separação, quantificação e armazenamento do óleo essencial*

164 A extração do óleo essencial foi realizada em triplicata, pelo método de  
165 hidrodestilação, usando-se aparelho Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo,  
166 com capacidade de 2L, junto ao Laboratório de Análises físico-químicas, no Centro de  
167 Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da UFPel. Foram utilizados  
168 separadamente, folhas e frutos maduros e verdes de aroeira, ambos triturados. No balão  
169 foram colocadas 20g de amostra juntamente com 1L de água destilada. O tempo de  
170 extração foi de 180 min, contados a partir do momento da ebulição, conforme  
171 determinado pela Farmacopéia Brasileira (1988).

172 O óleo essencial foi extraído da fase aquosa usando diclorometano (3x de 30 mL)  
173 como solvente extrator. A fração orgânica obtida foi tratada com sulfato de magnésio

174 anidro em excesso, para retirada total da água. Após, a solução foi filtrada e, em seguida,  
175 concentrada em evaporador rotativo a 40 °C até atingir quantidade suficiente para  
176 possibilitar a transferência para um frasco de 10 mL, sendo este colocado em  
177 banho-maria à temperatura de 40 °C, até atingir massa constante (BARBOSA et al.,  
178 2006).

179 A quantificação do óleo essencial foi realizada através de pesagens em balança  
180 analítica com precisão de 0,0001 g. Após a quantificação, os recipientes com óleo  
181 essencial foram vedados com parafilme, envoltos em papel alumínio e armazenados em  
182 freezer, para posteriormente serem analisados.

183 No momento do uso, os óleos essenciais foram previamente diluídos a uma  
184 concentração de 5% para as bactérias Gram positivas e 20% para as Gram negativas, em  
185 água destilada estéril com Tween a 1%.

186

#### 187 2.4. *Microorganismos*

188 Os microrganismos testados foram: *Escherichia coli* (ATCC 8739),  
189 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600),  
190 *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus agalactiae*, amostras isoladas de leite do Laboratório  
191 de Doenças Infecciosas da UFPel.

192

#### 193 2.5. *Avaliação da atividade antibacteriana*

194 A atividade antibacteriana do óleo essencial foi determinada pela técnica de  
195 microdiluição serial em placas de 96 orifícios em triplicata, a fim de ser determinada a  
196 concentração inibitória mínima (CIM). Os inóculos foram preparados a uma  
197 concentração de  $10^{(5-6)}$  UFC/mL em meio BHI 2x, para os testes com o óleo essencial, o  
198 BHI foi preparado com água destilada estéril com 1% de tween. A montagem da placa



199 seguiu como descrita pelo documento CLSI M7-A6 (2005) adaptado para fitoterápicos.  
 200 Os testes foram realizados em triplicata. Após a incubação das microplacas por 48h a  
 201 37°C, em estufa com agitação a 75 rpm para óleo essencial, transferidas alíquotas de 5µL  
 202 de cada orifício para Ágar sangue desfibrinado de ovino à 5% e incubadas à 37°C por  
 203 mais 24 horas. Após a leitura dos crescimentos, a interpretação dos resultados foi  
 204 realizada pela média geométrica das Concentrações Bactericidas Mínimas entendendo  
 205 esta como, a menor concentração de extrato da planta, EHA ou OE, capaz de inibir o  
 206 crescimento bacteriano a partir das alíquotas transferidas para o Ágar sangue.

207

### 208 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

209

#### 210 3.1. Determinação de umidade

211 Na Tabela 1 estão apresentados os resultados para a umidade das diferentes partes  
 212 da planta de Aroeira.

213 Tabela 1. Umidade de diferentes partes das plantas de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi)  
 214 submetidas à secagem em temperatura ambiente.

Parte da Planta	Umidade (%b.u.)*
Folha Verde	13,15
Folha Madura	13,51
Fruto Verde	11,40
Fruto Maduro	15,74

215 \*Médias de 3 determinações.

216 Neste estudo observaram-se os valores de 13,15% de teor de umidade para folha  
 217 verde que não diferenciou muito do valor para a folha madura, na qual o teor de umidade  
 218 foi de 13,51%. Já o fruto verde apresentou o menor teor de umidade (11,4%), quando  
 219 comparado com o teor de umidade do fruto maduro que foi de 15,74%. Diferenciando dos  
 220 estudos de Totti e Medeiros (2006) e Dourados (2012), sobre o teor de umidade de frutos

221 verdes e maduros da aroeira, na qual verificaram valores de teor de umidade para os  
 222 frutos verdes de 65,4% e frutos maduros de 55,6%, e frutos verdes 70,40% e frutos  
 223 maduros 34,05% respectivamente, sendo que o valor encontrado do teor de umidade  
 224 neste estudo foi menor devido à utilização de folhas e frutos depois de submetidos a  
 225 secagem e não plantas frescas, sem secagem, como nos estudos anteriores.

226 Degáspari et al.(2004), citam valores de umidade para frutos maduros antes da  
 227 secagem, de 39%, valores semelhantes ao encontrado no estudo de Dourados (2012). É  
 228 importante destacar que este menor teor de umidade encontrado nas folhas e frutos em  
 229 relação aos demais estudos, se deve ao fato de que, a metodologia utilizada foi com  
 230 plantas previamente secas.

231 Em seu experimento com outra espécie de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*  
 232 Allemao) Paiva et al (2011) observou o teor de umidade das folhas frescas com valor de  
 233 53,16%, enquanto que para o teste de folhas secas encontrou valores de umidade de  
 234 12% confirmando os valores encontrados neste estudo.

235

### 236 3.2. Rendimento do óleo essencial

237 Na Tabela 2 são apresentados os resultados do rendimento do óleo essencial das  
 238 diferentes partes da planta de aroeira.

239 Tabela 2. Rendimento (%b.s.) de óleo essencial das diferentes partes das plantas de Aroeira  
 240 (*Schinus terebinthifolius* Raddi.).

Parte da Planta	Teor de óleo essencial (%b.s.)*
Folha Verde	0,52
Folha Madura	0,57
Fruto Verde	4,09
Fruto Maduro	5,85

241 \*Médias de 3 extrações.

242 O resultado obtido neste estudo revela que a maior porcentagem de teor de óleo  
243 essencial foi no fruto maduro, com valor de 5,85% e a parte da planta que obteve o menor  
244 valor foi na folha verde com valor de 0,52%. Este valor também se assemelha com o  
245 encontrado por Silva et al. (2005) em seu estudo com aroeira fruto maduro, na qual  
246 demonstrou 5,09% de teor de óleo. Em outro estudo Oliveira et al.(2014) analisando os  
247 rendimentos obtidos durante a extração dos óleos essenciais de aroeira, observou que os  
248 frutos de aroeira continham quantidades significativamente maiores de óleo essencial do  
249 que as folhas dessa planta. Diferença também observada por Barbosa et al., (2007),  
250 quando extraíram óleo de folhas e frutos de aroeira, reportando valores de 0,44% e  
251 4,65%, respectivamente. Segundo Bertoldi (2006) o teor médio de óleos essenciais  
252 extraídos de frutos secos da aroeira é de 7%. Pode-se concluir que o teor de óleos  
253 essenciais sofre grandes variações, dependendo da parte utilizada da planta.

254 Esses valores superiores de óleo essencial nos frutos de aroeira eram esperados  
255 em função destas, serem órgãos de reserva da planta e por apresentarem estrutura celular  
256 adaptada para o acúmulo de nutrientes e solutos que são utilizados no desenvolvimento  
257 do embrião quando este inicia o processo de germinação. E estudos confirmam que os  
258 óleos essenciais podem ser produzidos por diversas estruturas existentes nos diversos  
259 órgãos da planta apresentando rendimento, composição química, características físicas e  
260 químicas distintas (SIMÕES & SPITZER, 2003). Outro fator preponderante é o calor,  
261 pressão e tempo utilizado no ato da extração que podem interferir na qualidade final do  
262 óleo essencial, por sensíveis moléculas, em sua maioria terpenos, podem ser quebradas e  
263 oxidadas em produtos de menor eficácia, ou às vezes até tóxicos (BERTOLDI, 2006).

264 A pesquisa feita por Santos et al. (2006) avaliando o tempo e as diferentes partes  
265 da planta na extração do óleo essencial da aroeira (frutos, folhas, e flores frescas) através  
266 da hidrodestilação utilizando o Clevenger, por 1 hora, demonstrou que o teor médio

267 encontrado ficou entre 0,15% e 0,17%. Diferenciando do encontrado por Dourados  
268 (2012) que obteve valor de 1,83% para frutos maduros com a extração da planta fresca. O  
269 presente estudo revelou um teor de óleo essencial acima do obtido pelos outros autores  
270 citados, demonstrando que existe diferença no rendimento do óleo quando se utiliza a  
271 planta fresca ou previamente seca. Paiva (2011) em seu teste com o rendimento do óleo  
272 essencial com outra espécie de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemao) sobre o  
273 rendimento do óleo essencial para folhas secas e frescas obteve valor de rendimento de  
274 0,55% para a extração a partir de folhas secas e de 0,44% a partir de folhas frescas, não  
275 apresentando diferença estatística significativa. Deve levar em consideração a espécie  
276 estudada, local de coleta (ecotipos) e variabilidade genética das plantas, que estão  
277 intimamente relacionadas com a qualidade dos óleos essenciais, sendo expressa através  
278 de quimiotipos (ROVEDA et al., 2010).

279 O baixo rendimento do teor de óleo essencial obtido das folhas de aroeira (0,52%  
280 folha verde e 0,57% folha madura) inviabiliza a sua utilização quando comparado à  
281 quantidade de teor de óleo essencial obtido nos frutos (fruto verde 4,09% e fruto maduro  
282 5,85%), também observado Barbosa et al., (2007), que obteve valores de 0,44% e 4,65%  
283 para folhas e frutos da aroeira, respectivamente.

284

### 285 3.3. Atividade antimicrobiana

286 Os resultados referentes às porcentagens das Concentrações Inibitórias Mínimas  
287 (CIM) dos óleos essenciais das folhas e dos frutos extraídos de *Schinus terebinthifolius*  
288 Raddi frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC, *Staphylococcus* sp,  
289 *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Escherichia coli* ATCC,  
290 estão descritos na tabela 3.

291

292 Tabela 3. Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos óleos da folha verde, folha madura,

293 fruto verde e fruto maduro de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) frente às bactérias.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) - %				
OEs	Folha Verde	Folha Madura	Fruto Verde	Fruto Maduro
<b>Bactérias</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	31	79	31	8
<i>Staphylococcus</i> sp.	6	100	25	16
<i>Streptococcus agalactiae</i>	31	100	100	31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	100	100	100	100
<i>Escherichia coli</i> ATCC	100	100	100	100

294 OEs- Óleos Essenciais

295           Analisando a tabela 3 sobre os resultados obtidos dos óleos essenciais da aroeira  
 296 que mostra as Concentrações Inibitórias Mínimas das folhas e frutos (verdes e maduros)  
 297 em relação às bactérias testadas, notamos que o óleo que apresentou os menores valores  
 298 de CIM em relação às bactérias Gram positivas, foi o OEs da folha verde e do fruto  
 299 maduro, para as bactérias *Staphylococcus* sp. 6%, e *Staphylococcus aureus* ATCC 8%  
 300 respectivamente, sendo que o menor valor de CIM encontrado foi da folha verde. Para a  
 301 maioria dessas bactérias o OE do fruto maduro obteve os melhores resultados. Quando  
 302 avaliamos os OE das folhas verdes e frutos maduros, podemos observar que foi eficiente  
 303 em quase todas as bactérias Gram positivas. Os quatro OEs não tiveram ação bactericida  
 304 com a concentração testada, contra as bactérias Gram negativas, bem como o OE da folha  
 305 madura que não inibiu o crescimento das bactérias Gram positivas e Gram negativas, na  
 306 concentração que foi testada. Concordando com os estudos feitos por Faccin (2013) que  
 307 avaliando os OEs, de folhas e frutos de aroeira em ambos os estádios de frutificação não  
 308 obtiveram ação antibacteriana nas concentrações testadas contra as bactérias Gram  
 309 negativas. Pinho et al.(2012) testando o potencial antimicrobiano dos extratos de aroeira,  
 310 barbatimão e erva-baleeira, conseguiram inibir o crescimento de *S. aureus*, mas não foi

311 detectada atividade frente a cepas de *E. coli*, o que pode estar relacionado à menor  
312 susceptibilidade das bactérias Gram-negativas a extratos vegetais ou pode ser devida a  
313 lipopolissacarídeos da membrana externa destas bactérias que os tornam inerentemente  
314 resistente a agentes externos, tais como corantes hidrofílicos, antibióticos, e detergentes  
315 (El-MASSRY et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2004).

316 Pesquisas revelam resultados satisfatórios do óleo essencial da aroeira, como de  
317 Valentini (2014) que testou extrato dos frutos e folhas frente às bactérias *Escherichia*  
318 *coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e frente à  
319 levedura *Candida albicans* ambos apresentaram boa atividade antimicrobiana no teste de  
320 Concentração Inibitória Mínima (CIM). Ao analisar o extrato da folha de aroeira,  
321 destaca-se uma boa atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos com  
322 exceção do *S. aureus*. Já Silva et al. (2010) buscando testar o óleo essencial das folhas de  
323 aroeira frente a *Staphylococcus* spp., pelo mesmo método utilizado neste trabalho,  
324 avaliou a citotoxicidade em animais de laboratório através da administração intraperitoneal  
325 do óleo essencial e seguinte avaliação histológica, concluindo que o extrato possui  
326 potente ação antimicrobiana e sem evidências de toxicidade.

327 Lima et al. (2004), avaliaram o óleo de aroeira frente as bactérias *S.aureus*, *S.*  
328 *epidermidis*, *B. cereus* e *P. aeruginosa*, e verificaram que todas mostraram sensibilidade  
329 a esse óleo essencial. Diferenciando do presente estudo que não inibiu *P. aeruginosa*.

330 Dourado (2012) em seu estudo demonstrou que a aroeira promoveu inibição no  
331 crescimento da bactéria *S. aureus* apresentando maior sensibilidade. Santos (2007) e  
332 Alcântara et al. (2006), estudando o extrato da casca de pimenta rosa, também  
333 demonstraram o seu efeito inibitório sobre *S. aureus*.

334 As variações referentes à determinação da CIM dos óleos essenciais de aroeira  
335 podem ser atribuídas a diferentes fatores, como a técnica aplicada, o microrganismo e a

336 cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram  
337 preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada  
338 (OSTROSKY et al., 2008).

339

#### 340 **4. CONCLUSÃO**

341 Os dados obtidos no presente estudo reforçam a idéia que existem diferenças no  
342 rendimento dos óleos em relação às diferentes partes da planta, os frutos de aroeira  
343 apresentam quantidades superiores de óleo essencial quando comparadas com as folhas.  
344 A avaliação da atividade antimicrobiana da planta *Schinus terebinthifolius* Raddi, quando  
345 testada com os microorganismos relatados permitiram concluir que se obtiveram  
346 resultados promissores com os óleos essenciais da folha verde e do fruto maduro contra as  
347 cepas Gram positivas. Diante do potencial apresentado pelos óleos essenciais da aroeira é  
348 relevante uma melhor investigação, a fim de se conhecer com detalhes as características  
349 dessa espécie vegetal que pode constituir-se numa alternativa sustentável, viável e  
350 acessível para tratamento antimicrobiano.

#### 351 **5. REFERÊNCIAS**

352 ALCÂNTARA, A.N.S.; FORMIGA, A.A.; LEAL, C.; DRUMOND, M.R.S.; PADILHA,  
353 W.W.N. Estudo do efeito antimicrobiano de *Schinus terebinthifolius* sobre  
354 *Staphylococcus aureus* em infecções cutâneas. **ANAIS 580 Reunião Anual da SBPC –**  
355 **Florianópolis –SC julho 2006.**

356 ASAE S572. *Spray nozzle classification by droplet spectra*. In: **ASAE Standards**  
357 **aug.99**. St. Joseph, p. 389-91, 2000.

358 BARBOSA, F. et al. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor ea  
359 composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) NE Brown. **Química Nova**,  
360 v. 29, n. 6, p. 1221-1225, 2006.

- 361 BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D. Seasonal Variation in the  
362 composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Química Nova**,  
363 Viçosa, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, 2007.
- 364 BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J.P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J.  
365 Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and  
366 *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**, v.75, n.6,  
367 p. 466-72, 2010.
- 368 BERTOLDI, M. C. Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleoresinas e  
369 do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Viçosa-MG,  
370 Universidade Federal de Viçosa, 96p. **Tese de mestrado em Ciência e Tecnologia de**  
371 **Alimentos**, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2006.
- 372 CARVALHO, M. G.; MELO, A. G. N.; ARAGÃO, C. F. S.; RAFFIN, F. N.; MOURA,  
373 T. F. A. L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: **chemical composition, biological**  
374 **properties and toxicity**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 15, n. 1, p. 158-169.  
375 2013.
- 376 CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for dilution  
377 antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically: **Approved**  
378 **Standard**. M7-A6; 2005.
- 379 COLE, E.R. Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus*  
380 *terebinthifolius* Raddi) e sua eficácia no combate ao dengue. 2008. 66p. **Dissertação**  
381 **(Mestrado em Química)** - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.
- 382 COSTA, E.M.M.B.; BARBOSA, A.S.; ARRUDA, T.A.; OLIVEIRA, P.T.; DAMETTO,  
383 F.R.; CARVALHO, R.A.; MELO, M.D. Estudo *in vitro* da Ação Antimicrobiana de  
384 Extrato de Plantas contra *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica**  
385 **e Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 175–180, 2010.



- 386 COUTINHO, I.H.I.L.S.; TORRES, O.J. M.; MATIAS, J.E.F.; COELHO, J.C.U. Efeito  
387 de extrato hidroalcolico de aroeira (*Schinus Terebinthifolius Raddi*) na cicatrizaçao de  
388 anastomoses colônicas estudo experimental em ratos. **Revista Acta Cirúrgica**  
389 **Brasileira**, São Luís, v. 21, n. 3, p. 49, 2006.
- 390 DEGASPARI, C.H.; WASZCZYNSKY, J. N.; dos SANTOS, R.J. Antioxidant activity of  
391 extracts from fruits of Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*). **Visão Acadêmica**, ISSN:  
392 1518-5192 Curitiba v.5, n.2, p.83-89, Jul/Dez, 2004.
- 393 DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PARDO, M.R.M. Atividade  
394 antimicrobiana de *Schinus terebentifolius Raddi*. **Ciênc. agrotec.**, v. 29, n.3,  
395 pág.617-622, 2005.
- 396 DOURADO, M.T. Óleos essenciais e oleoresina da pimenta rosa (*Schinus*  
397 *terebinthifolius Raddi*): propriedades químicas e biológicas. 2012. 120p. **Tese**  
398 (Doutorado). PPG em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. UFPel.120p. 2012.
- 399 EL-MASSRY KF, EL-GHORAB AH, SHAAABAN HÁ, SHBAMOTO T. Chemical  
400 compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from  
401 *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural and Food**  
402 **Chemistry**. 57:5265-5270, 2009.
- 403 FACCIN, A. Atividade antibacteriana in vitro e in vivo de *Schinus terebinthifolius Raddi*  
404 no controle da mastite bovina. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pelotas,  
405 2013.
- 406 FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4 ed. São Paulo: **Atheneu**, 1988.
- 407 FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo.  
408 **Food Control**, v.18, p.1126- 30, 2007.
- 409 IBRAHIM, M.A.; MÄENPÄÄ, M.; HASSINEN, V.; KONTUNEN-SOPPELA, S.;  
410 MALEC, L.; ROUSI, M.; PIETIKÄINEN, L.; TERVAHAUTA, A.; KÄRENLAMPI, S.;

- 411 HOLOPAINEN, J.K.; OKSANEN, E.J. Elevation of night-time temperature increases  
412 terpenoid emissions from *Betula pendula* and *Populus tremula*. **Journal of**  
413 **Experimental Botany**, v. 61, n. 6, p. 1583–1595, 2010.
- 414 JESUS, S. de; FILHO, E. L. A. M.; Frugivoria por aves em *Schinus terebinthifolius*  
415 (Anacardiaceae) e *Myrsine coriacea* (Myrsinaceae). **Revista Brasileira de Ornitologia**,  
416 v.15, n.4, p.585-591, 2007.
- 417 LEITE SRRF, AMORIM MMR, SERENO PFB, LEITE TNF, FERREIRA JAC,  
418 XIMENES RAA. Randomized clinical Trial comparing the efficacy of the vaginal use of  
419 metronidazole with a Brazilian pepper tree *Schinus* extract for the treatment of bacterial  
420 vaginosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 44(3): 245-252,  
421 2011.
- 422 LENZI, M.; ORTH, A. I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira  
423 vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em Florianópolis - SC, Brasil. **Revista**  
424 **Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 198-201, 2004.
- 425 LIMA MRF, LUNA JS, SANTOS AF, ANDRADE MCC, SANT'ANA AEG, GENET  
426 JP, MARQUEZ B, NEUVILLE L, MOREAU N. Anti-bacterial activity of some  
427 Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 105: 137-147, 2006.
- 428 LIMA. E.O.; PEREIRA, F.O.; LIMA, I.O.; TRAJANO, V.N.; SOUZA, E.L. *Schinus*  
429 *terebinthifolius* Raddi: avaliação do especto de ação antimicrobiano de seu extrato  
430 aquoso. **Infarma**, v.16.n.7-8, 2004.
- 431 LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil – Nativas e Exóticas**. Ed.  
432 *Plantarum*: Nova Odessa – SP; 2ª ed., p. 63-64, 2008.
- 433 MEDEIROS, K.C.P.; MONTEIRO, J.C.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A.; SILVA,  
434 B. A.; PIUYEZAM, M.R. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation:  
435 *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in

- 436 inflammatory models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p.  
437 23-28, 2007.
- 438 NASCIMENTO, F.C.P.; NASCIMENTO, C.A; RODRIGUES, S.C; ANTONIOLLI,  
439 R.A; SANTOS, O.P; BARBOSA, J.A; TRINDADE, C.R. Atividade antimicrobiana dos  
440 óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de**  
441 **Farmacognosia**, Santa Maria, v.17, n. 1, p.108 – 113, 2007.
- 442 NUNES Jr., J.A.T.; RIBAS-FILHO, J.M.; MALAFAIA, O.; CZECKO, N.G.; INÁCIO,  
443 C.M.; NEGRÃO, A.W.; LUCENA, P.L.H.; MOREIRA, H.; WAGENFUHR JR., J.;  
444 CRUZ, J. DE J. Avaliação do Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Schinus*  
445 *terebinthifolius* Raddi (Aroeira) no Processo de Cicatrização da Linea Alba de Ratos.  
446 **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, p. 8-15, 2006.
- 447 OLIVEIRA J. L. F. G.; SANTOS, R. B.; REIS, F. O.; MATSUMOTO, S. T.; BISPO, W.  
448 M. S.; MACHADO, L. P.; OLIVEIRA, L. F. M. Efeito fungitóxico do óleo essencial de  
449 aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*.  
450 **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 150-157, 2013.
- 451 OLIVEIRA, L. F. M. et al. Tempo de destilação e perfil volátil do óleo essencial de  
452 aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius*) em Sergipe. **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n.  
453 2, p. 243-249, 2014.
- 454 OSTROSKY EA, MIZUMOTO MK, LIMA MEL, KANEKO TM, NISHIKAWA SO,  
455 FREITAS BR. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da  
456 concentração mínima inibitória (CMI) de plantas mediciniais. **Revista Brasileira de**  
457 **Farmacognosia**. 18(2): 301-307, 2008.
- 458 OYARZABAL ME, SCHUCH LFD, PRESTES LS, SCHIAVON DBA, RODRIGUES  
459 MRA, MELLO JRB. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare*

- 460 L. ante bactérias aisladas em leite de bovino. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**.  
461 16(3): 260-266, 2011.
- 462 PAIVA, I. C. Rendimento de óleo essencial de folhas de aroeira em diferentes tempos de  
463 extração, umidade e tamanho de partículas. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, 2011.
- 464 PINHO, L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de  
465 alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência**  
466 **Rural**, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.
- 467 RIBAS, M. O. *et al.* Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo  
468 tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto**  
469 **Ciência**, v. 21, n. 53, p. 245-252, 2006.
- 470 ROVEDA, L.M.; FORMAGIO, A.S.N.; BALDIVIA, D.S.; SANTOS, L.A.C. VIEIRA,  
471 M.C.; CARDOSO, C.A.L.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; NETO F.F. 10  
472 **Simposio Brasil-Japão**. Sustentabilidade: Um desafio da Humanidade. Campo Grande,  
473 MS, 2010.
- 474 SAITO ML; SCRAMIN S. Plantas aromáticas e seu uso na agricultura. Jaguariúna:  
475 **Embrapa Meio Ambiente**. 45p, 2000.
- 476 SANTOS, A.C.A. dos; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SERAFINI, L.A.; SANTOS,  
477 P.L. dos; MORLON, R.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Chemical composition of the  
478 essential oils from leaves and fruits of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius*Raddi  
479 from southern Brazil. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 12, n. 1, p. 16-25,  
480 2009.
- 481 SANTOS, A.C.A.; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SANTOS, P.L.; SERAFINI, L.A.;  
482 MOYNA, P.; DELLACASSA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de  
483 *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5,  
484 supl. 2, p. 1011-1013, 2007.

- 485 SANTOS, M.R.A.; LIMA, R.A.; FERNANDES, C.F.; SILVA, A.G.; LIMA, D.K.S.;  
486 TEIXEIRA, C.A.D.; FACUNDO, V.A. Atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus*  
487 *terebinthifolius* Raddi sobre *Acanthoscelides obtectus* Say e *Zabrotes subfasciatus*  
488 Boheman. **Revista Fitos**, v. 3,n. 1, p. 77–84, 2007.
- 489 SANTOS, O.J.; RIBAS FILHO, J.M.; CZECHKO, N.G.; NETO, M.L.C.B.; NAUFEL  
490 JR., C.; FERREIRA, L.M.; CAMPOS, R.P.; MOREIRA, H.; PORCIDES, R.D.;  
491 DOBROWOLSKI, S. Avaliação do Extrato de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* RADDI)  
492 no Processo de Cicatrização de Gastrorrafias em Ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.  
493 21, n. 2, p. 39–45, 2006.
- 494 SILVA AB, SILVA T, FRANCO ES, RABELO AS, LIMA ER, MOTA RA, da  
495 CÂMARA CAG, PONTES-FILHO NT, LIMA-FILHA JV. Antibacterial activity,  
496 chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree  
497 (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Brazilian Journal of Microbiology**; 41: 158-163,  
498 2010.
- 499 SILVA, L.V.; CONSTANCIO, S.C.M.; MENDES, M.F.; COELHO, G.L.V. Extração do  
500 óleo essencial da pimenta rosa (*Shinus molle*) usando hidrodestilação e soxhlet. **Anais do**  
501 **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. VI  
502 COBEQ, Campinas, 2005.
- 503 SILVA, M.A.; PESSOTTI, B.M. de S.; ZANINI, S.F.; COLNAGO, G.L.; NUNES, L.  
504 DE C.; RODRIGUES, M.R.A.; FERREIRA, L. Óleo de aroeira-vermelha sobre o  
505 desempenho e a morfometria intestinal de frangos de corte. **Ciência Rural**, Santa  
506 Maria-RS, 40(10):2151-2156, 2010.
- 507 SIMÕES, C.M.O. & SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao**  
508 **medicamento**. 5º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC,  
509 p. 467-496. 2003.

- 510 TOTTI, L.C.; MEDEIROS, A.C.S. Maturação e época de colheita de sementes de  
511 aroeira-vermelha. **Comunicado técnico164**, EMBRAPA. Colombo, PR , 2006.
- 512 VALENTINI, S. A.; MACHADO, TOMÉ, B. C. Avaliação do potencial farmacotécnico  
513 e antimicrobiano de diferentes extratos da aroeira pimenteira (*Schinus terebenthifolius*  
514 Raddi). **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 9, n. 1, 2014.
- 515 VASCONCELOS, M.C.A. et al. Avaliação de atividades biológicas das sementes de  
516 *Stryphmodndron obovatum* Benth (Leguminosae). **Revista Brasileira de**  
517 **Farmacognosia**, v.14, n.1, p.121-127, 2004.

#### **4.4 Artigo 4**

**Rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes partes da  
planta de *Tagetes minuta* Linnaeus**

Katiúscia Barbosa Bilhalva, Fernanda Voigt Mota, Cristina Jansen, Fabrizio da Fonseca  
Barbosa, Luiz Filipe Damé Schuch, João Roberto Braga de Mello





26 Telefone: (53) 30254355

27 Email: kbilhalva@ibest.com.br

## 28 **RESUMO**

29 Vários compostos são formados nas folhas, flores ou frutos e em seguida, se acumulam  
30 em órgãos específicos de *Tagetes* spp. sob a forma de óleos essencial que possuem  
31 propriedades antimicrobianas. *Tagetes minuta* L. é uma planta aromática nativa da  
32 América do Sul, popularmente denominada chinchilho. *T. minuta* tem propriedades  
33 atribuídas como antimicrobiana, inseticida, acaricida, antiviral. Com isso o objetivo  
34 deste trabalho foi avaliar a o rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial das  
35 diferentes partes da planta de *Tagetes minuta* L. A extração do óleo essencial foi realizada  
36 em triplicata, pelo método de hidrodestilação, usando-se aparelho Clevenger. Para a  
37 avaliação da atividade antimicrobiana o trabalho foi realizado pela técnica de  
38 microdiluição serial em placas, a fim de ser determinada a concentração inibitória mínima  
39 (CIM), utilizando óleos de diferentes partes da planta (folhas, flor, caule e semente)  
40 contra as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*,  
41 *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. O resultado obtido revela que a maior  
42 porcentagem de teor de óleo essencial foi na folha, com valor de 1,11% e na flor com o  
43 valor de 0,68% e a parte da planta que obtiveram os menores valores no teor de óleo  
44 essencial foram no caule com valor de 0,10% e na semente com o valor de 0,27%. Os  
45 óleos essenciais que apresentaram os menores valores de CIM em relação às bactérias  
46 Gram negativas foi às partes da folha e da flor com valores para a bactéria *Escherichia*  
47 *coli* ATCC de 20%. Para as bactérias Gram positivas o óleo essencial que revelou melhor  
48 resultado foi o da semente sobre a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC, valor de CIM  
49 de 25%. O óleo essencial que não apresentou ação bactericida com a concentração testada  
50 contra as bactérias Gram positivas e Gram negativas foi o preparado com o caule, bem

51 como o óleo essencial da semente que não inibiu o crescimento das bactérias Gram  
52 negativas. Diante do potencial apresentado pelos óleos essenciais do chinchilho sugere-se  
53 a continuidade das pesquisas com o intuito de determinar as melhores condições para  
54 obtenção de óleos essenciais e eficácia das propriedades antimicrobianas.

55 **Palavras-chave:** Chinchilho, rendimento, antimicrobianao, óleo essencial

56

57 **ABSTRACT**

58 Many compounds are formed in the leaves, flowers or fruits, and then accumulate in  
59 specific organs *Tagetes* spp. in the form of essential oils that have antimicrobial  
60 properties. *Tagetes minuta* L. aromatic plant is a native of South America, popularly  
61 called Chinchilho. T. draft has assigned properties such as antimicrobial, insecticide,  
62 acaricide, antiviral. Therefore, the objective of this study was to evaluate the performance  
63 and antimicrobial activity of essential oil from different parts of the plant *Tagetes minuta*  
64 L. The essential oil extraction was performed in triplicate by hydrodistillation method  
65 using Clevenger apparatus. To evaluate the antimicrobial activity the work was done by  
66 micro serial plating technique, in order to be determined the minimum inhibitory  
67 concentration (MIC) using oils from different parts of the plant (leaves, flower, stem and  
68 seed) against bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus*  
69 *agalactiae*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus* sp. The result obtained shows that  
70 the highest percentage of essential oil content was on the sheet, with a value of 1.11% and  
71 in bloom with the value of 0.68% and the part of the plant that had the lowest values in the  
72 essential oil content were the stem with a value of 0.10% and the seed with the value of  
73 0.27%. The essential oils showed the lowest MIC values in relation to Gram negative  
74 bacteria were the parts of the leaf and flower with values for the bacterium *Escherichia*  
75 *coli* ATCC 20%. For Gram-positive bacteria essential oil which showed the best results

76 on the seed strain of *Staphylococcus aureus* ATCC MIC 25%. The essential oil which had  
77 no bactericidal activity at the concentration tested against Gram positive and Gram  
78 negative bacteria has the stem, as well as the essential oil of the seed did not inhibit the  
79 growth of Gram negative bacteria. Given the potential presented by the essential oils of  
80 Chinchilho suggest the continuity of research in order to determine the best conditions for  
81 obtaining essential oils and effectiveness of antimicrobial properties.

82 **Keywords:** Chinchilho, income, antimicrobianao, essential oil

83

## 84 1. INTRODUÇÃO

85 Atualmente, as pesquisas realizadas com plantas confirmam a ação medicinal de  
86 muitas espécies tradicionalmente usadas, o que traz aos pesquisadores a convicção de  
87 que há muito a aprender com os costumes populares (DEVIENNE et al., 2004).

88 As plantas têm sido utilizadas como medicina natural pelas populações locais no  
89 mundo inteiro, para o tratamento das mais variadas doenças (DUARTE et al., 2005;  
90 SARTORATTO et al., 2004).

91 Os óleos essenciais são produtos naturais, voláteis e complexos, podendo ser  
92 utilizados para prevenir e tratar doenças, além de ser utilizados por suas propriedades  
93 biológicas como a ação antibacteriana, antiviral e antioxidante entre outros (BAKKALI  
94 et al., 2008; KNAAK; FIUZA, 2010; YE, 2009). Vários compostos são formados nas  
95 folhas, flores ou frutos e em seguida, se acumulam em órgãos específicos de *Tagetes* spp.  
96 sob a forma de óleos essencial que possuem propriedades antimicrobianas (GARCIA et  
97 al., 2009; GREEN et al., 1991). Devido à sua importância, ampla distribuição e grande  
98 capacidade adaptativa, as plantas da família Asteraceae são extensivamente estudadas  
99 quanto à sua composição química e atividade biológica (VERDI; BRIGHENTE;  
100 PIZZOLATTI, 2005).

101 *Tagetes minuta* L. é uma planta aromática nativa da América do Sul, é comum às  
102 seguintes espécies da família das Compostas (Asteraceae): *T. erecta*, *T. patula* e *T.*  
103 *minuta*, sendo todas originárias de espécies selvagens do México e introduzidas no Brasil  
104 há muitos anos, onde se aclimataram perfeitamente, tornando-se até subespontâneas  
105 mesmo nas mais longínquas povoações, conhecida popularmente como chinchilho,  
106 vara-de-rojão, rabo-de-foguete, cravo-de-defunto, cravo-de-urubu (LORENZI et al.,  
107 2008). Suas folhas são compostas, de coloração verde escura, produzindo contraste  
108 acentuado com as flores. As flores são reunidas em capítulos dobrados, de coloração  
109 amarelo a alaranjado, em diferentes tonalidades e apresentam cheiro forte característico.  
110 O florescimento ocorre na primavera e verão. A planta reproduzida por semente apresenta  
111 ciclo de 120-150 dias (ARAÚJO, 2006; GUTIÉRREZ et al., 2006; MOYO et al., 2009).

112 A espécie é rica em óleos essenciais amplamente utilizados na indústria de  
113 produtos cosméticos, perfumes, agentes aromatizantes e medicamentos (BATISH et al.,  
114 2007; HAMAYUN et al., 2006; OSMAN et al., 2008). *T. minuta* tem propriedades  
115 atribuídas como antimicrobiana (ARENAS et al. 2004; OYEDEMI, et al., 2008;  
116 SCHUCH et al., 2008; ROMAGNOLI et al. 2005; TERESCHUK et al., 2005),  
117 inseticida e acaricida (ANDREOTTI et al, 2013; CESTARI et al. 2004; EGUARAS et  
118 al. 2005; IRERI et al., 2010; LÓPEZ et al, 2011; LOVATTO, 2012; MOYO et al., 2009;  
119 RICHTER, 2011; TOMOVA et al, 2005), antiviral (GHAEMI et al, 2010), bem como,  
120 ação alelopática sobre outras plantas (SCRIVANTI et al., 2003).

121 A composição do óleo essencial de *T. minuta* pode variar de acordo a parte da  
122 planta e a sua fase de crescimento, do ponto de vista fitoquímico, *T. minuta* é rica  
123  $\alpha$ -terpineol, (Z) - $\beta$ -ocimeno, dihydrotagetone, (E) -ocimenone, (Z) -tagetone, e (Z)  
124 -ocimenone (CHAMORRO et al., 2008; MOGHADDAM et al. 2007).

125 Apesar da composição química e amplitude de efeitos conferidos à espécie *T.*  
126 *minuta*, sendo facilmente encontrada no Brasil, ainda são escassos os trabalhos de  
127 investigação sobre a ação biológica da espécie e de seus extratos, com isso o objetivo  
128 deste trabalho foi avaliar a o rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial das  
129 diferentes partes da planta de *Tagetes minuta* L.

## 130 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

131

### 132 *2.1. Obtenção e secagem da planta*

133 As amostras da *Tagetes minuta* L. foram colhidas manualmente, no mês de junho  
134 de 2012. A coleta foi realizada no período da manhã antes das 10 horas. O material  
135 vegetal foi coletado das plantas, localizadas na Embrapa Clima Temperado – Estação  
136 Experimental Cascata, Pelotas, RS, com referências geográficas 31°37'S e 52°31'W.  
137 Após a coleta as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Bacteriologia  
138 (DVP/FV/UFPel) para realização da separação manual das folhas, flores, sementes e  
139 caule. As amostras foram secas em telas de secagem em local seco e a sombra, sendo  
140 secas até a umidade de aproximadamente 13% para as flores, folhas e caule e 30% para as  
141 sementes, durante o tempo aproximado de 10 e 15 dias. A identificação botânica e as  
142 exsicatas foram depositadas no herbário do Instituto de Botânica da Universidade Federal  
143 de Pelotas e identificadas, chinchilho (*Tagetes minuta* Linnaeus. - Voucher nº PEL  
144 24659).

145

### 146 *2.2. Determinação da umidade*

147 A determinação da umidade foi realizada depois da secagem, conforme  
148 metodologia descrita em pela Asae Standards (ASAE, 2000) para forrageiras e similares  
149 (plantas ou folhas), com adaptações. Foram utilizadas 2g de amostra, colocando em

150 cacinhos de porcelana, previamente tarados, os quais foram secos em estufa com  
151 circulação forçada de ar em temperatura de  $103\pm 2$  °C, onde permaneciam por 24 horas,  
152 sendo realizadas três repetições. Após esse período, os cacinhos foram retirados e  
153 mantidos em dessecador até atingirem a temperatura ambiente. A percentagem (%) de  
154 matéria seca (MS) a  $103\pm 2$  °C foi obtida através da Equação 1, onde: Pa refere-se ao peso  
155 da amostra, Pu é o peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação, Ps é o peso  
156 do cadinho contendo a amostra após a dessecação. A percentagem de matéria seca das  
157 amostras foi obtida a partir da média de triplicatas conforme Equação 1:

158 **Equação 1:**  $MS(\%) = (Pu - Ps) \times 100/Pa$

159

### 160 2.3. *Extração, separação, quantificação e armazenamento do óleo essencial*

161 A extração do óleo essencial foi realizada em triplicata, pelo método de  
162 hidrodestilação, usando-se aparelho Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo,  
163 com capacidade de 2 L, junto ao Laboratório de Produtos Naturais no Centro de Ciências  
164 Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da UFPel. Foram utilizadas separadamente,  
165 folhas, flores, sementes e caule do chinchilho, ambos triturados, sendo o material pesado.  
166 No balão foram colocadas 20g de amostra juntamente com 1L de água destilada. O tempo  
167 de extração foi de 180 min, contados a partir do momento da ebulição, conforme  
168 determinado pela Farmacopéia Brasileira (1988).

169 O óleo essencial foi extraído da fase aquosa usando diclorometano (3x de 30 mL)  
170 como solvente extrator. A fração orgânica obtida foi tratada com sulfato de magnésio  
171 anidro em excesso, para retirada total da água. Após, a solução foi filtrada e, em seguida,  
172 concentrada em evaporador rotativo a 40 °C até atingir quantidade suficiente para  
173 possibilitar a transferência para um frasco de 10 mL, sendo este colocado em  
174 banho-maria à temperatura de 40 °C, até atingir massa constante.

175 A quantificação do óleo essencial foi realizada através de pesagens em balança  
176 analítica com precisão de 0,0001 g. Após a quantificação, os recipientes com óleo  
177 essencial foram vedados com parafilme, envoltos em papel alumínio e armazenados em  
178 freezer, para posteriormente serem analisados.

179 No momento do uso, os OEs foram previamente diluídos a uma concentração de  
180 5% para as bactérias Gram positivas e 20% para as Gram negativas, em água destilada  
181 estéril com Tween a 1%. Os valores de concentração do óleos foram pré-estabelecidos  
182 por testes anteriores.

#### 183 2.4. *Microorganismos*

184 Os microrganismos testados foram: *Escherichia coli* (ATCC 8739),  
185 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600),  
186 *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus agalactiae*, amostras isoladas de leite do Laboratório  
187 de Doenças Infecciosas da UFPel.

188

#### 189 2.5. *Avaliação da atividade antibacteriana*

190 A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi determinada pela técnica de  
191 microdiluição serial em placas de 96 orifícios em triplicata, a fim de ser determinada a  
192 concentração inibitória mínima (CIM). Os inóculos foram preparados a uma  
193 concentração de  $10^{5-6}$  UFC/mL em meio BHI 2x, para os testes com o óleo essencial, o  
194 BHI foi preparado com água destilada estéril com 1% de tween. A montagem da placa  
195 seguiu como descrita pelo documento CLSI M7-A6 (2005) adaptado para fitoterápicos.  
196 Os testes foram realizados em triplicata. Após a incubação das microplacas por 48h a  
197 37°C, em estufa com agitação a 75 rpm para óleo essencial, transferidas alíquotas de 5µL  
198 de cada orifício para Ágar sangue desfibrinado de ovino à 5% e incubadas à 37°C por  
199 mais 24 horas. Após a leitura dos crescimentos, a interpretação dos resultados foi

200 realizada pela média geométrica das Concentrações Bactericidas Mínimas entendendo  
 201 esta como, a menor concentração de extrato da planta, EHA ou OE, capaz de inibir o  
 202 crescimento bacteriano a partir das alíquotas transferidas para o Ágar sangue.

203

### 204 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

205

#### 206 *3.1. Determinação de umidade*

207 Na Tabela 1 estão apresentados os resultados para a umidade das diferentes partes  
 208 da planta do Chinchilho.

209 Tabela 1. Umidade de diferentes partes das plantas de Chinchilho (*Tagetes minuta* L) submetidas  
 210 à secagem em temperatura ambiente.

Parte da Planta	Umidade (%b.u.)*
Folha	12,87
Caule	12,81
Flor	12,77
Semente	30,34

211 \*Médias de 3 determinações.

212

213 Neste estudo observou que, os valores do teor de umidade da folha, caule e flor  
 214 não diferenciaram muito, 12,87%, 12,81%, 12,77%, respectivamente. Já o valor para o  
 215 teor de umidade das sementes teve um aumento considerável de 30,34%. Em seus estudos  
 216 Haro (2014)  
 217 com a espécie *Tagetes erecta* L.encontrou os maiores teores de umidade nas folhas de 60  
 218 dias (30,12%) e a menor nas folhas de 120 dias (19,45%). O mesmo ocorreu com as flores  
 219 de 60 dias que obtiveram maior teor de umidade (29,57%), enquanto as flores de 120  
 220 apresentaram a menor porcentagem (21,8 %). Sendo superiores ao encontrado neste  
 221 estudo, podendo haver diferenças devido serem de espécies diferentes, mesmo sendo da



222 mesma família. Essa variação na umidade está dentro da faixa de redução de massa  
223 considerada aceitável, a qual deve variar de 10 a 75% (SARTÓRIO et al., 2000).

224

### 225 3.2. Rendimento do óleo essencial

226

227 Na Tabela 2 são apresentados os resultados do rendimento do óleo essencial das  
228 diferentes partes da planta do chinchilho.

229

230

231 Tabela 2. Rendimento (%b.s.) de óleo essencial das diferentes partes das plantas de Chinchilho  
232 (*Tagetes minuta* L.) submetidas à secagem em temperatura ambiente

Parte da Planta	Teor de óleo essencial (%b.s.)*
Folha	1,11
Caule	0,10
Flor	0,68
Semente	0,27

233 \*Médias de 3 extrações.

234 O resultado obtido neste estudo revela que a maior porcentagem de teor de óleo  
235 essencial foi na folha, com valor de 1,11% e na flor com o valor de 0,68%. As partes da  
236 planta que obtiveram os menores valores no teor de óleo essencial foram no caule com  
237 valor de 0,10% e na semente com o valor de 0,27%, sendo estes desaconselháveis para a  
238 obtenção do óleo essencial desta planta. Esse processo pode ocorrer ao grupo Asteraceae,  
239 no qual são relatados acréscimos nos teores de óleo até o momento da floração plena e  
240 decréscimos quando as flores estão com suas sementes formadas e entrando em estado de  
241 senescência (FRANZ; NOVAK, 2010).

242 Em seu estudo Haro (2014) com a espécie *T. erecta* L obteve o maior rendimento

243 de óleos voláteis nas flores com 1,05mg óleo/g matéria seca e menor rendimento nas  
244 folhas com 0,70mg óleo/g matéria seca, resultados semelhantes aos descritos por Worku  
245 e Bertoldi (1996) em *Tagetes minuta* L., os quais registraram maiores rendimentos de  
246 óleos voláteis em plantas durante sua floração e com sementes ainda imaturas.

247 Oliveira et al.(2013) em seu estudo , empregando a mesma metodologia descrita  
248 neste estudo, com a espécie *T. minuta*, utilizando plantas frescas, obteve o rendimento  
249 médio do óleo essencial das inflorescências superior ao rendimento do óleo essencial das  
250 folhas. O rendimento de óleo essencial para as inflorescências frescas da espécie, em  
251 comparação com as folhas, apresentando-se em torno de 0,92%, sendo que as folhas  
252 apresentam um rendimento de 0,26%. Discordando do que foi observado neste estudo, na  
253 qual o maior rendimento de óleo essencial ocorreu na folhas 1,11% e o rendimento das  
254 folhas superou o descrito pelo autor que foi de 0,68%. Este comportamento pode estar  
255 relacionado à diferente localização histológica das estruturas secretoras nos órgãos de *T.*  
256 *minuta* ou à diferença nos constituintes de cada órgão vegetal. Apesar das diferenças  
257 obtidas nas quantidades de óleos entre as diferentes partes da planta, a escolha da época  
258 de colheita para a extração deve ser feita de acordo com a finalidade do uso,  
259 independentemente de seu rendimento, devido a possíveis variações na composição dos  
260 óleos essenciais e, conseqüentemente, em sua atividade biológica (ANGIONI et al., 2006;  
261 MASOTTI et al., 2003).

262

### 263 3.3. Atividade antimicrobiana

264 Os resultados referentes às porcentagens das Concentrações Inibitórias Mínimas  
265 (CIM) dos óleos essenciais das diferentes partes da planta extraídos de *Tagetes minuta* L.  
266 frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus*  
267 *agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Escherichia coli* ATCC, estão descritos na

268 tabela abaixo.

269

270 Tabela 3. Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos óleos da folha, flor, caule e semente  
271 de *Tagetes minuta* Linnaeus (Chinchilho) frente às bactérias.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) - %				
OEs	Folha	Flor	Caule	Semente
<b>Bactérias</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	100	40	79	25
<i>Staphylococcus</i> sp.	100	50	100	63
<i>Streptococcus agalactiae</i>	40	100	100	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	50	31	100	100
<i>Escherichia coli</i> ATCC	20	20	100	100

272 OEs- Óleos Essenciais

273 Analisando a tabela 3 sobre os resultados obtidos dos óleos essenciais do  
274 chinchilho que mostra as Concentrações Inibitórias Mínimas da folha, flor, caule e  
275 semente em relação às bactérias testadas, observamos que o OEs que apresentou os  
276 menores valores de CIM foi às partes da folha e da flor em relação às bactérias Gram  
277 negativas, com valores para a bactéria *Escherichia coli* ATCC de 20%. Em sua pesquisa  
278 feita sobre a atividade de inibição bacteriana (IINIB) através de testes de diluição de  
279 extratos aquoso ou alcoólico Wiest et al. (2009) testou *T. minuta* frente as cepas de *E. coli*  
280 ATCC em doses-desafio  $\leq 108 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , que revelou ação antibacteriana desta planta.  
281 Em outro estudo Lambrecht et al, (2013) testando o óleo essencial e extrato  
282 hidroalcoólico de *T. minuta* sobre a atividade antibacteriana observou eficiência contra a  
283 *E.coli* ATCC como o valores de CIM de 5% mas o extrato hidroalcoólico se mostrou  
284 resistente para essa bactéria. Concordando com estudo de Souza et al. (2000) em que *E.*  
285 *coli* demonstrou-se praticamente resistente a atividade antimicrobiana do decocto desta  
286 espécie. A ação antibacteriana do óleo de *T. minuta* já havia sido comprovada sobre

287 bactérias como *P.aeruginosa* e *E.coli* (OYEDEMI et al., 2008). No presente estudo OEs  
288 da flor também se mostrou eficiente contra outra bactéria Gram negativa, *Pseudomonas*  
289 *aeruginosa* ATCC, com valor de CIM de 31%. Na pesquisa feita por Oyedemi et  
290 al.,(2008), testando o óleo essencial de *T. minuta* sobre as cepas *L. monocytogenes*, *B.*  
291 *cereus*, *E. coli* , *P. vulgaris* e *P. aeruginosa* mostrou eficaz tanto contra bactérias Gram  
292 negativas como bactérias Gram positivas (0,5 a 1,0 mg/mL w/v).

293         Em relação às bactérias Gram positivas o OEs que revelou melhor resultado foi o  
294 da semente sobre a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC, encontrando valor de CIM de  
295 25%, valor este que surpreendeu quando comparado com os demais valores apresentados  
296 das bactérias Gram positivas, 40% o OEs da flor sobre a cepa *Staphylococcus aureus*  
297 ATCC e 40% o OEs da folha sobre a cepa *Streptococcus agalactiae*, valores estes  
298 considerados de média ação antimicrobiana. Discordando dos estudos feitos por Schuch  
299 (2007) que utilizou decoctos (DEC) de chinchilho (*Tagetes minuta* L.) para avaliar suas  
300 atividades antibacterianas frente a microrganismos causadores de mastite e concluiu que  
301 os decoctos de *T. minuta* apresentaram os melhores resultados, inclusive atuando frente a  
302 *P.aeruginosa*, embora em concentração mais alta do que frente às outras bactérias  
303 ( $p<0,05$ ). MOTA et al.,(2011) e Lambrecht et al., (2012), em sua pesquisa concluiu que o  
304 extrato de *T. minuta* produzido a partir de folhas secas com álcool 70°, inativou ambas as  
305 bactérias testadas, tanto bactérias Gram positivas como Gram negativas.

306         Vale ressaltar que existem poucos estudos referentes à ação antimicrobiana desta  
307 espécie, e os que referem alguma ação normalmente utiliza a planta por inteiro, não  
308 havendo a separação da mesma. A comparação dos resultados dos outros autores  
309 referidos com os do presente trabalho deve ser observada com cuidado, pois as  
310 metodologias e o produto de *T.minuta* L., utilizados foram diferentes.

311

#### 312 4. CONCLUSÃO

313 Os dados obtidos no presente estudo reforçam a idéia que existem diferenças no  
314 rendimento dos óleos em relação às diferentes partes da planta, o resultado revelou que a  
315 maior porcentagem de teor de óleo essencial foi na folha de *Tagetes minuta* L. A  
316 avaliação da atividade antimicrobiana do chinchilho, quando testada com os  
317 microorganismos relatados permitiram concluir que desempenhou resultados  
318 promissores os OEs da folha e da flor para as cepas Gram negativas, e o OEs da semente  
319 demonstrou sendo o mais efetivo com as cepas Gram positivas. Diante da escassez de  
320 literatura específica sobre o estudo das diferentes partes de *Tagetes minuta* L., sugere-se  
321 a continuidade das pesquisas com o intuito de determinar as melhores condições para  
322 obtenção de óleos essenciais e eficácia das propriedades antimicrobianas.

323

#### 324 5. REFERÊNCIAS

325 ANDREOTTI, R.;GARCIA, M.V.;CUNHA, R.C.; BARROS, J.C.; Protective action of  
326 *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus*  
327 (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial. **Veterinary Parasitology**, v.197,  
328 n.1, p.341-345, 2013.

329 ANGIONI, A. et al. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity  
330 of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers.  
331 **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 12, p. 4364-4370, May  
332 2006.

333 ARAÚJO, P.V.; CARVALHO, M.P.; RAMOS, M.D.L.R. **Um porto de árvores**. Porto:  
334 C. Aberto, 48p, 2006.

- 335 ARENAS, A.; LÓPEZ, D.; ÁLVAREZ, E.; LLANO, G.; LOKE, J. Efecto de prácticas  
336 ecológicas sobre la población de *Ralstonia solanacearum* Smith, causante de Moko de  
337 plátano. **Fitopatología Colombiana** 28 (2): 76-80, 2004.
- 338 ASAE S572. *Spray nozzle classification by droplet spectra*. In: **ASAE Standards**  
339 **aug.99**. St. Joseph, p. 389-91, 2000.
- 340 BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical**  
341 **Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- 342 BATISH, DR, K. ARORAA, HP SINGHB E RK KOHLIA. Potencial utilização de pó  
343 seco de *Tagetes minuta* como herbicida natural para o gerenciamento de ervas daninhas  
344 de arroz. **rotec cultura**.26: 566-571, 2007.
- 345 CESTARI, I. M.; SARTI, S. J.; WAIB, C. M.; CASTELLO, A. Evaluation of the  
346 potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the  
347 head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). Scientific Note,  
348 **Neotropical Entomology** 33 (6): 805-807, 2004.
- 349 CHAMORRO ER, BALLERINI G, SEQUEIRA AF, VELASCO GA, ZALAZAR MF.  
350 Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. **J**  
351 **Argentine Chem Soc** ; 96(1-2): 80-86, 2008.
- 352 CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for dilution  
353 antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically: **Approved**  
354 **Standard**. M7-A6; 2005.
- 355 DE SOUZA, C. A.S.; AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.. Atividade antimicrobiana de  
356 *Tagetes minuta* L.-Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e  
357 Gram-negativas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.  
358 37, n. 6, p. 429-433, 2000.

- 359 DEVIENNE KF, RADDI MSG, POZETTI GL. Das plantas medicinais aos  
360 fitofármacos. **Rev Bras PI Med.** 6:11-14, 2004.
- 361 DUARTE MCT, FIGURAUEIRA GM, SARTORATTO A, REHDER VLG,  
362 DELARMELINA C. Anti-*Candida* activity of brazilian medicinal plants. **J**  
363 **Ethnopharmacol.** 97:305-11, 2005.
- 364 EGUARAS, M. J.; FUSELLI, S.; GENDE, L.; FRITZ, R.; RUFFINENGO, S. R.;  
365 CLEMENTE, G.; GONZÁLEZ, A.; BAILAC, P. N.; PONZI, M. I. An *in vitro*  
366 evaluation of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens  
367 *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*.  
368 **Journal of Essential Oil Research** 17: 36-340, 2005.
- 369 FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- 370 FRANZ, C.; NOVAK, J. Sources of essential oils. In: BASER, K.; HUSNU, C. N.;  
371 BUCHBAUER, G. (Ed.). **Handbook of essential oils: science, technology, and**  
372 **applications.** Boca Raton: CRC, p. 39-82, 2010.
- 373 GARCÍA AA, CARRIL E, PÉREZ-URRIA. Metabolismo secundario de plantas.  
374 Reduca (Biología). **Serie Fisiología Vegetal** 2: 119-145, 2009.
- 375 GHAEMI, A., et al. "Antiviral activity of root extracts from *Tagetes minuta* against  
376 Herpes simplex virus (HSV-1). **Iranian Journal of Pharmaceutical Research** 72-72,  
377 2010.
- 378 GREEN MM, SINGER JM, SUTHERLAND DJ, HIBBEN CR. Larvicidal activity of  
379 *Tagetes minuta* (marigold) toward *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito**  
380 **Control Association**, United States 7: 282-286, 1991.
- 381 GUTIERREZ, P. R. M., HERNANDEZ, L., HELIODORO e HERNANDEZ G. S..  
382 **Antioxidant activity of *Tagetes erecta* L. essential oil.** **J. Chil. Chem. Soc.**, v.51, n.2,  
383 p.883-886, 2006.

- 384 HAMAYUN, M., F. HUSSAIN, S. AZAL E N. AHMAD. Alelopático *Cyperus rotundus*  
385 efeito e *Echinochloa crus-galli* em sementes germinação e plumule e crescimento radical  
386 na cultura do milho (*Zea mays* L.). Pak. **J. Weed Sci. Res.**11 (1-2): 81-84, 2006.
- 387 HARO, M.M. Recursos florais de *Tagetes erecta* L. mediando à composição de redes  
388 tróficas. **Tese (doutorado)** – Universidade Federal de Lavras – Lavras : UFLA, 109 p.,  
389 2014.
- 390 IRERI LN, KONGORO J, NGURE P, MUTAI C, LANGAT B, TONUI WK. The  
391 potential of the extracts of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae), *Acalypha fruticosa*  
392 Forssk (Euphorbiaceae) and *Tarhonianthus camphorates* L. (Compositae) against  
393 *Phlebotomus duboscqi* Neveu Lemaire (Diptera: Psychodidae), the vector for  
394 *Leishmania major* Yakimoff and Schokhor. **J. Vect. Borne Dis.** 47: 168-174, 2010.
- 395 KNAAK N, FIUZA LM. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos  
396 e microrganismos. **Neotrop. Biol.Conserv**, 5(2):120-132, 2010.
- 397 LAMBRECHT. G. C. et al. Actividad antibacteriana de los extractos de *Cymbopogon*  
398 *citratius*, *Elionurus* sp. y *Tagetes minuta* contra bacterias que causan mastitis. **Revista**  
399 **Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 3, p. 487-494, 2013.
- 400 LAMBRECHT. G. C.; FACCIN, Â.; SCHIAVON, D.B.A.; SCHUBERT, R. N.;  
401 SCHIEDECK, G.; SCHUCH L.F.D.; Sensibilidade de bactérias isoladas de leite ao óleo  
402 essencial de *Tagetes minuta* L. XXII Simpósio de Plantas Mediciniais, Bento Gonçalves/  
403 RS. In: **Anais XXII Simpósio de Plantas Mediciniais**, 2012.
- 404 LÓPEZ, S.B.; LÓPEZ, M.L.; ARAGÓN, L. M.; TERESCHUK, M.L.; SLANIS, A.C.;  
405 FEREN, G.E.; ZYGADLO, J.A.; TAPIA, A.A. Composition and anti-insect activity of  
406 essential oils from *Tagetes* L. species (Asteraceae, *Helenieae*) on *Ceratitis capitata*  
407 Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. **Journal of Agricultural and Food**  
408 **Chemistry**, v.14, n. 10, p.25-59, 2011.



- 409 LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**  
410 **cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2 ed. p. 160-161, 2008.
- 411 LOVATTO PB. *As Plantas Bioativas como Estratégia Tecnológica à Transição*  
412 *Agroecológica na Agricultura Familiar*. **Tese**. Universidade Federal de Pelotas. Brasil.  
413 392 p, 2012.
- 414 MASOTTI, V. et al. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the  
415 narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of**  
416 **Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 24,p. 7115-7121, Oct. 2003.
- 417 MOGHADDAM M, OMIDBIAGI R, SEFIDKON F. Chemical composition of the  
418 essential oil of *Tagetes minuta* L. **J Essent Oil Res** ; 19(1): 3-4, 2007.
- 419 MOTA, F.M.; GONÇALVES, C.L.; SCHUCH, L.F.D.; COIMBRA, H.S.; HARTWIG,  
420 C. Comparación de distintas extracciones hidroalcohólicas de plantas con indicativo  
421 etnográfico antiséptico/desinfectante. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.16,  
422 n.3, p. 236-246, 2011.
- 423 MOYO B, MASIKA PJ, DUBE S, MAPHOSA V. An *in-vivo* study of the efficacy and  
424 safety of ethno-veterinary remedies used to control cattle ticks by rural farmers in the  
425 Eastern Cape Province of South Africa. **Trop Anim Health Prod** 41(7): 1569–1576,  
426 2009.
- 427 OLIVEIRA. M.A, CUNHA.A.J, MACHADO.M.C, GELAIN.G, AMARAL.P.L.  
428 Rendimento comparativo dos óleos essenciais de folhas e inflorescências de *Tagetes minuta*  
429 L. coleta em Itaara-RS. **Centro de Ciências da Saúde CCS – UFSM, PPG.**  
430 Pós-Graduação em Farmacologia, n.164, 2013.
- 431 OSMAN, HA, AY Al- GINDI, HS TAHA, AA Al-KAZZAZ, MMA YOUSSEF, HH  
432 AMEEN E AM LASHEIN. O controle biológico do nematóide *Meloidogyne incognita*:  
433 2- Avaliação da os efeitos nematicidas de cultura de tecidos de *Tagetes erecta* sob

- 434 condições de laboratório e casa de vegetação. Egito. **J. Phytopathol.** 35 (1- 2): 33-44,  
435 2008.
- 436 OYEDEMI SO, PIROCHENVA G, MABINYA LV, BRADLEY G, AFOLAYAN AJ.  
437 Compositions and comparisons of antimicrobial potencies of some essential oils and  
438 antibiotics against selected bacteria. **African J Biotechnology.**7(22):4140-6, 2008.
- 439 RICHTER JM. *Investigation into Alternative Wheat Aphid Control Strategies for*  
440 *Emerging Farmers.* **Tese.** University of the Free State. Bloemfontein, África do Sul.  
441 106 p, 2011.
- 442 ROMAGNOLI, C.; BRUNI, R.; ANDREOTTI, E.; RAI, M. K.; VIVENTIN, C. B.;  
443 MARES, D. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of  
444 capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. **Protoplasma** 225 (1-2): 57-65, 2005.
- 445 SARTORATTO A, MACHADO ALM, DELARMELENA C, FIGURAEUEIRA GM,  
446 DUARTE MCT, REHDER VLG. Composition and antimicrobial activity of essential  
447 oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz J Microbiol.** 35:275-80, 2004.
- 448 SARTÓRIO, M. L. et al. Cultivo orgânico de plantas medicinais. Viçosa, MG: **Aprenda**  
449 **Fácil**, 258 p, 2000.
- 450 SCHUCH, L. F. D.; WIEST, J. M.; COIMBRA, H.S.; PRESTES, L.S.; TONI, L.;  
451 LEMOS, J. S. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a  
452 microrganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p.  
453 161-169, 2008.
- 454 SCHUCH, L.F.D. Plantas medicinais em atenção primária veterinária: atividade  
455 antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e com dermatófitos.  
456 **Tese de Doutorado.** PPG em Ciências Veterinárias, UFRGS. 256p. 2007.
- 457 SCRIVANTI LR, ZUNINO MP, ZYGDALO JÁ. *Tagetes minuta* and *Schinus areira*  
458 essential oils as allelopathic agents. **Biochem. Systemat. Ecol.** 31: 563-572, 2003.

- 459 TERESCHUK ML. Actividad biológica de flavonoides de Especies de *tagetes* más  
460 representativas del noroeste argentino (**tesis doctoral**). Tucumán: Universidad Nacional  
461 de Tucumán; 2005.
- 462 TOMOVA BS, WATERHOUSE JS, DOBERSKI J. The effect of fractionated *Tagetes* oil  
463 volatiles on aphid reproduction. *Entomol Exp App* , 115(1): 153-159, 2005.
- 464 VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis*  
465 (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v.  
466 28, n. 1, p. 85-94, 2005.
- 467 WIEST, J. M. et al. Inibição e inativação de *Escherichia coli* por extratos de plantas com  
468 indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.  
469 29, p. 474-480, 2009.
- 470 WORKU, T.; BERTOLDI, M. Essential oils at essential oils at different development  
471 stages of Ethiopian *Tagetes minuta* L. In: FRANZ, C. H.; MATHE, A.; BUCHBAUER,  
472 G. (Ed.). **Essential oils: basic and applied research**. Carol Stream: Allured, p. 339-341,  
473 1996.
- 474 YE J. Application of gas chromatography--mass spectrometry in research of traditional  
475 Chinese medicine. **Chemical Papers**.63(5)506–11, 2009.

## 4.5 Artigo 5

**Citotoxicidade, fitoquímica e sinergismo dos extratos de *Schinus terebinthifolius***

**Raddi e *Tagetes minuta* L.**

**Cytotoxicity, and synergism of phytochemical extracts of *Schinus terebinthifolius***

**Raddi and *Tagetes minuta* L.**

Katiúscia Barbosa Bilhalva, Fernanda Voigt Mota, Cristina Jansen, Rui Zambiasi, Luiz

Filipe Damé Schuch, João Roberto Braga de Mello

**Artigo submetido à Revista Ciência Rural**

1 **Citotoxicidade, fitoquímica e sinergismo dos extratos de *Schinus terebinthifolius***

2 **Raddi e *Tagetes minuta* L.**

3 **Cytotoxicity, and synergism of phytochemical extracts of *Schinus terebinthifolius***

4 **Raddi and *Tagetes minuta* L.**

5

6 Katiúscia Barbosa Bilhalva, Fernanda Voigt Mota, Cristina Jansen, Rui Zambiasi, Silvia

7 de Oliveira Hübner Luiz Filipe Damé Schuch, João Roberto Braga de Mello

8

9 Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias-UFRGS- Porto Alegre,RS

10 Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Pelotas, RS

11 [\\*kbilhalva@ibest.com.br](mailto:*kbilhalva@ibest.com.br)

12

### 13 **RESUMO**

14 Atualmente as várias propriedades biológicas de plantas medicinais têm sido  
15 confirmadas, sendo que os relatos de ação antimicrobiana destas aumentam  
16 proporcionalmente ao surgimento de linhagens de bactérias patogênicas resistentes aos  
17 antimicrobianos conhecidos. O interesse por medicamentos a base de produtos naturais  
18 que substituam ou atuem como adjuvante à medicina convencional cresce dentre a  
19 população. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos, a  
20 caracterização fitoquímica e a interação de extratos vegetais produzidos com solventes de  
21 diferentes polaridades, com antibióticos comumente utilizados no tratamento de doenças  
22 infecciosas. Os extratos foram analisados quanto à possibilidade de interação realizada  
23 com os antimicrobianos Amoxicilina, Ampicilina, Penicilina, Gentamicina e  
24 Tetraciclina. Quanto à fitoquímica, avaliou-se a presença de compostos fenólicos totais e  
25 antocianinas em todos os extratos e os efeitos citotóxicos por meio do teste de Vermelho  
26 neutro em células MDBK. As análises fitoquímicas indicaram diferentes valores de  
27 compostos fenólicos totais e antocianinas. O gênero *Streptococcus* apresentou uma maior

28 susceptibilidade às interações entre antimicrobianos, havendo efeitos sinérgicos frente  
29 aos antibióticos utilizados nas associações com os extratos. Dos testes referentes à  
30 citotoxicidade das espécies vegetais, apontou o extrato Chinchilho Folha (ECFl) como  
31 menos tóxico, com uma viabilidade celular de 96%. Estes resultados possibilitam a  
32 caracterização das espécies vegetais quanto as suas propriedades biológicas e seus efeitos  
33 citotóxicos, sendo de relevância na elaboração de novos fitoterápicos e quanto ao seu uso  
34 pela população.

35 **Palavras-chave:** plantas medicinais; sinergismo; fitoquímica; citotoxicidade de extratos  
36 vegetais.

37

### 38 **ABSTRACT**

39 Currently the various biological properties of medicinal plants have been confirmed, and  
40 the antimicrobial activity of these reports increase proportionally to the emergence of  
41 strains of pathogenic bacteria resistant to the known antibiotics. Interest in drugs based on  
42 natural products that replace or act as adjuvants to conventional medicine grows among  
43 the population. The objective of this study was to evaluate the cytotoxic effects,  
44 phytochemical characterization and the interaction of plant extracts produced with  
45 solvents of different polarities from antibiotics commonly used to treat infectious  
46 diseases. The extracts were analyzed for the ability to interact with the antimicrobial  
47 performed Amoxicillin, Ampicillin, Penicillin, Tetracycline, and Gentamycin. As  
48 phytochemical evaluated for the presence of phenolic compounds and anthocyanins in all  
49 extracts and cytotoxic effects by neutral red assay in MDBK cells. The phytochemical  
50 analysis indicated different values of total phenolics and anthocyanins. The genus  
51 *Streptococcus* showed a higher susceptibility to antimicrobial interactions, with  
52 synergistic effects compared to the antibiotics used in association with the extracts of the

53 tests related to cytotoxicity of plant species, said the Chinchilho leaf extract (ECFI) as less  
54 toxic, with a cell viability 96% .These results allow the characterization of plant species  
55 and their biological properties and their cytotoxic effects, being of importance in the  
56 development of new herbal and for their use by the population.

57 **Keywords:** medicinal plants; synergism; phytochemical; cytotoxicity of plant extracts.

58

## 59 INTRODUÇÃO

60 As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos,  
61 muitos dos quais são utilizados para a produção de um grande número de fármacos.  
62 Apesar do amplo uso dos fitomedicamentos pela população, poucos estudos têm sido  
63 feitos para avaliar a eficácia terapêutica e a toxicidade potencial das preparações  
64 fitoterápicas. O uso de preparações a base de plantas, ao contrário do senso comum, que  
65 as classifica como sendo naturais e isentas de reações adversas, podem apresentar vários  
66 agravos à saúde incluindo reações alérgicas, tóxicas, interações medicamentosas e efeitos  
67 mutagênicos. O uso indiscriminado e a desinformação de plantas medicinais podem  
68 gerar efeitos tóxicos que comprometem a saúde dos usuários (PITTLER & ERNEST,  
69 1998).

70 Devido ao controle cada vez maior e rigoroso em relação à experimentação com  
71 modelos biológicos, desse modo, o uso de modelos experimentais *in vitro* para o estudo  
72 da resposta inflamatória e triagens iniciais de produtos farmacológicos tem sido  
73 considerado uma alternativa ao uso de animais vivos em pesquisas (WALLUM et al.,  
74 2005; WEI et al., 2014). Os métodos de análise citotóxica *in vitro* apresentam vantagens  
75 em relação aos *in vivo* tais como a limitação do número de variáveis experimentais e a  
76 obtenção de dados significativos de forma mais fácil e rápida (ROGERO et al., 2003).

77 Outro aspecto importante sobre as plantas medicinais é o estudo da ação

78 antimicrobiana para derivados vegetais e a possibilidade de sinergismos com drogas  
79 antimicrobianas convencionais que tem sido freqüente (BETONI, et al., 2006) sendo que  
80 a interação sinérgica para associações de antibióticos com extratos de plantas medicinais  
81 sobre linhagens microbiana resistentes pode ser uma nova estratégia para tratamento de  
82 infecções, possibilitando o uso de drogas antimicrobianas quando esta de forma isolada  
83 não apresentar-se eficaz sobre determinadas linhagens bacterianas.

84 Estudos de combinação com produtos naturais de plantas e drogas sintéticas são  
85 limitadas a poucos relatos, porém os resultados apresentados são muitas vezes positivos  
86 (KUMAR, et al., 2009).

87 O estudo fitoquímico de plantas é realizado a séculos por diversos pesquisadores  
88 em todo o mundo, com a intenção de purificar substancias e avaliar suas atividades  
89 biológicas afim da obtenção de novas substancias bioativas para serem incorporadas em  
90 medicamentos que podem ser inovadores. Desta forma, este trabalho tem por objetivo  
91 verificar in vitro interações possíveis entre os extratos de *Schinus terebinthifolius* Raddi e  
92 *Tagetes minuta* L. com drogas antimicrobianas como amoxicilina, oxacilina,  
93 gentamicina, tetraciclina e penicilina, sobre bactérias da mastite, além da citotoxicidade e  
94 estudo fitoquímicos destas plantas.

95

## 96 **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 97 **Material vegetal**

98 Nesse trabalho foram utilizadas as seguintes plantas: *Tagetes minuta* L. e *Schinus*  
99 *terebinthifolius* Raddi. As partes utilizadas do chinchilho foram a folha, flor e caule e da  
100 aroeira as folhas e frutos, verdes e maduros. As amostras coletadas foram encaminhadas  
101 para o Laboratório de Bacteriologia (DVP/FV/UFPel) para realização da separação



102 manual dos galhos e talos. Ambos permaneceram durante quinze dias em telas de  
103 secagem em local seco e a sombra, protegido de insetos e outros animais.

#### 104 **Preparação dos extratos**

105 Para preparação dos extratos as plantas coletadas, foram submetidas ao método  
106 Soxhlet de extração, com os seguintes solventes orgânicos polares e apolares: éter,  
107 acetato de etila, hexano, metanol e clorofórmio, por um período de 6 horas consecutivas.  
108 Esses extratos foram subsequentemente concentrados e dessecados por rotaevaporação, e  
109 os sólidos resultantes foram ressuspensos em DMSO a 25 %. Os extratos obtidos foram  
110 armazenados em frascos âmbar hermeticamente fechados, sob abrigo da luz a uma  
111 temperatura de 4°C.

112

#### 113 **Interação entre extratos e antibióticos**

114 Para a verificação de possíveis interações entre os extratos metanólicos e  
115 antibióticos, utilizou-se uma concentração igual a ¼ do valor referente à CIM 90% do  
116 extrato, calculado segundo Reed & Muench (1938), obtida na Macrodiluição para cada  
117 grupo bacteriano. Os microrganismos testados foram: *Escherichia coli* (ATCC 8739),  
118 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) e  
119 *Streptococcus agalactiae*, amostras isoladas de leite do Laboratório de Doenças  
120 Infeciosas da UFPel. Foram realizados antibiogramas controle (sem extrato) e  
121 tratamento (com extrato) através da metodologia dos discos, preconizadas por BAUER  
122 et al.,(1966), (CLSI, 2005) e adaptada por Betoni et al. (2006). Os efeitos das interações  
123 foram verificados com os seguintes antibióticos: Amoxicilina, Ampicilina,  
124 Gentamicina, Penicilina e Tetraciclina.

125 Após, as placas foram incubadas (37°C/24h) e os halos de inibição obtidos  
126 (milímetros) foram comparados entre os ensaios tratamentos e controles, sendo

127 classificados como: sinérgicos, indiferentes ou antagônicos através da análise feita pelo  
128 teste pareado de T, onde  $p \leq 0,05$  indicava diferença, com média com sinal positivo  
129 indicando sinergismo e média negativa indicando antagonismo. Nos casos onde  $p \geq 0,05$   
130 indicou indiferença (ZAGO et al., 2009).

131 Os experimentos foram realizados em duplicatas e para a análise estatística  
132 utilizou-se a média dos valores observados.

### 133 **Citotoxicidade**

134 Em microplacas de 96 poços contendo Meio Essencial Mínimo (MEM), soro fetal  
135 bovino a 10% (Gibco), enrofloxacina ( $10\text{mg ml}^{-1}$ ) e anfotericina B ( $0,025\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ), foram  
136 preparadas células da linhagem MDBK (Madin-Darby bovine kidney), as quais foram  
137 mantidas a  $37^\circ\text{C}$  em uma estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ .

138 Após o tapete celular ter atingido 90% do seu crescimento,  $20\ \mu\text{l}$  dos extratos, nas  
139 concentrações de 1:10 à 1:40 foram adicionadas ao cultivo de células com MEM, onde  
140 permaneceram incubadas por 48 horas adicionais nas mesmas condições. Células não  
141 tratadas com os extratos foram mantidas como controle. O ensaio de vermelho neutro  
142 ocorreu após 48 horas de incubação com as diferentes concentrações dos extratos  
143 vegetais, sendo retirado o meio contendo os extratos e adicionado meio contendo  $3.3\ \text{mg}^{-1}$   
144 de vermelho neutro. Com incubação de 2 horas a  $37\ ^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , a solução foi  
145 removida e as células lavadas com MEM.

146 A penetração do corante nas células foi verificada pela adição de  $100\ \mu\text{L}$  de  
147 solução contendo etanol 50%, ácido acético 1% e água destilada q.s.p. A placa foi  
148 mantida a temperatura ambiente por 10 minutos e a leitura das densidades ópticas  
149 realizadas em um espectrofotômetro em comprimento de onda de  $540\ \text{nm}$ .

150 Foram consideradas concentrações não tóxicas aquelas em que foi possível uma  
151 viabilidade celular maior que 90% quando comparada com o controle de células. A

152 porcentagem de viabilidade celular foi calculada mediante a equação 1.

153 **Equação 1:** Fórmula para o cálculo de viabilidade celular, sendo At a absorbância dos  
154 tratados e Ac a absorbância dos controles.

$$\frac{At}{Ac} .100$$

## 155 **Estudo Fitoquímico**

156

### 157 **Conteúdo total de compostos fenólicos**

158 A quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras dos  
159 extratos ocorreu de acordo com Swain e Hillis (1959) com adaptações. Em um tubo de  
160 Falcon adicionou-se 4 mL de água destilada, 250µL de álcool metílico, 100µL do extrato  
161 e 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteau 0,25M, com agitação em vortex e repouso de 3  
162 minutos, em seguida, 500µL de carbonato de sódio 1M foi adicionado a reação por 2h,  
163 sendo realizada a leitura em espectrofotômetro em 725nm (JENWAY 6705 UV/Vis.).

164 Para a quantificação dos compostos fenólicos utilizou-se uma curva padrão  
165 preparada com ácido gálico, sendo os resultados expressos em mg de ácido gálico  
166 100g<sup>-1</sup>de amostra.

167

### 168 **Conteúdo total de antocianinas**

169 A determinação do total de antocianinas foi realizada segundo o método descrito  
170 por Lees & Francis (1972), com algumas adaptações. Pesou-se 1g de amostra,  
171 adicionou-se 25 mL de álcool etílico acidificado (pH 1,00) com ácido clorídrico e  
172 deixou-se por 1h em repouso, agitando a cada 5 minutos. Após esse período, filtrou-se a  
173 amostra, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL e avolumou-se com o etanol  
174 acidificado. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.) a  
175 520nm, usando álcool etílico acidificado como branco. O cálculo da concentração de

176 antocianinas foi baseado na Lei de Beer e os resultados foram expressos em mg de  
177 cianidina 3-glicosídeo 100 g<sup>-1</sup> de amostra em base úmida.

178

## 179 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

180

### 181 **Estudo Fitoquímico**

182 Para a extração dos compostos fenólicos foram utilizados solventes de diferentes  
183 polaridades, com o intuito de verificar a influência da polaridade na extração. As tabelas  
184 abaixo, demonstram os valores em mg EAG.g P.U dos compostos fenólicos e  
185 antocianinas para os extratos de *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Tagetes minuta* L.

186

187 Tabela 1. Compostos fenólicos totais do Chinchilho expressos em mg EAG.g P.U.

<b>Compostos fenólicos (mg EAG.g P.U.)</b>			
<b>Solventes</b>	<b>Folha</b>	<b>Caule</b>	<b>Flor</b>
<b>Metanol</b>	73,36 ± 0,6		
<b>Hexano</b>		131,25 ± 0,9	286,37 ± 0,9
<b>Éter</b>	48,17 ± 0,3	42,55 ± 0,7	
<b>Acetato de etila</b>		217,38 ± 0,8	
<b>clorofórmio</b>	138,17 ± 0,7	140,48 ± 0,9	284,17 ± 0,9

188

189 A distribuição dos fenóis nas diferentes partes da planta é quantitativamente  
190 variável. A tabela 1 mostra os valores médios encontrados, com base no peso úmido  
191 (P.U.). O caule extraído com o solvente éter apresentou o menor valor, 42,55 ± 0,7 mg  
192 EAG.g de peso úmido.

193 O caule e a flor do chinchilho apresentaram os maiores teores de compostos  
194 fenólicos do que a folha, 217,38 ± 0,8, 284,17 ± 0,9 e 138,17 ± 0,7, respectivamente,

195 todos expressos em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de amostra em peso  
 196 úmido. Este valor difere do encontrado por Queires e Rodrigues (1998), que encontrou  
 197 maior teor de compostos fenólicos na folha e na flor, e apenas 32,10 + 3,61 no caule da  
 198 aroeira. O teor de compostos fenólicos totais encontrados, nas diferentes partes da aroeira  
 199 deste estudo apresentou valores superiores ao encontrado por outros autores.

200 A variação ocorrida entre os diferentes estudos pode ser atribuída em função da  
 201 idade e tamanho da planta, da parte coletada, da época ou do local de coleta (MONTEIRO  
 202 et al., 2005).

203 O uso dos solventes, clorofórmio, acetato de etila e hexano mostraram capacidade  
 204 de extrair os compostos fenólicos das diferentes partes da planta.

205 Tabela 2. Compostos fenólicos totais da Aroeira expressos em mg EAG.g P.U.

Solventes	Compostos fenólicos (mg EAG.g P.U.)			
	Folha madura	Folha verde	Fruto maduro	Fruto verde
Metanol	5,87	5,70	30,57	5,71
Hexano	137,93		190,51	96,02
Éter				31,09
Acetato de etila		230,01	127,71	117,22
Clorofórmio	39,45		31,85	

206

207 O acetato de etila mostrou uma boa extração dos compostos fenólicos na folha e  
 208 no fruto da aroeira. Já o uso dos solventes metanol e clorofórmio não apresentou boa  
 209 extração dos compostos fenólicos.

210 A folha verde apresentou maior teor de compostos fenólicos do que a folha  
 211 madura. Entre o fruto maduro e o fruto verde ocorreram grandes variações de acordo com  
 212 o solvente usado na extração, sendo a melhor extração com o uso do acetato de etila. O

213 fruto maduro extraído com acetato de etila apresentou 127,71 mg equivalente em ácido  
 214 gálico por g. da amostra em peso úmido, o que já era esperado devido aos níveis de  
 215 compostos fenólicos serem menores quando o fruto ainda está na fase de maturação  
 216 (QUEIRES E RODRIGUES, 1998).

217 Tabela 3. Antocianinas totais da aroeira expressos em mg de cianidina 3-glicosídeo /100g P. U.

<b>Solventes</b>	<b>Folha madura</b>	<b>Folha verde</b>	<b>Fruto Maduro</b>	<b>Fruto verde</b>
<b>Metanol</b>	0,02		0,05	0,01
<b>Hexano</b>	0,19	0,12		0,11
<b>Éter</b>				0,03
<b>Acetato de etila</b>		0,97	0,05	0,08
<b>Clorofórmio</b>	0,08		0,03	

218

219 O hexano mostrou ser eficaz na extração das antocianinas tanto na folha  
 220 madura quanto no fruto verde. Já o solvente metanol, clorofórmio e éter não foram  
 221 eficazes, mostrando baixa extração de antocianinas. As antocianinas representaram  
 222 pequena quantidade dos compostos fenólicos presentes nas partes da aroeira, indicando a  
 223 presença de diversos tipos de grupos de fenóis ou dos seus conjugados, presentes nestes  
 224 órgãos.

225

226 Tabela 4. Antocianinas totais da chinchilho expressos em mg de cianidina 3-glicosídeo /100g P.  
 227 U.

<b>Solventes</b>	<b>Caule</b>	<b>Flor</b>	<b>Folha</b>
<b>Metanol</b>			0,47
<b>Hexano</b>	0,35	0,19	
<b>Éter</b>	0,01		0,57
<b>Acetato de etila</b>	0,47		
<b>Clorofórmio</b>	0,02	0,08	0,02

228

229 A folha e o caule apresentaram o maior teor de antocianinas. O solvente  
 230 clorofórmio não mostrou boa capacidade para extração desta classe de fitoquímicos. O  
 231 que pode ser explicado pela baixa polaridade deste solvente, quando comparado com os  
 232 demais.

233

### 234 Sinergismo

235 As figuras abaixo descrevem as médias referentes aos controles e aos tratamentos  
 236 com os extratos metanólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Tagetes minutas* L.,  
 237 frente à *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* ATCC, *Escherichia coli* ATCC  
 238 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC. Os extratos utilizados neste ensaio foram  
 239 selecionados como mais eficientes a partir do teste de Concentração Inibitória Mínima  
 240 (CIM), com as mesmas amostras bacterianas.

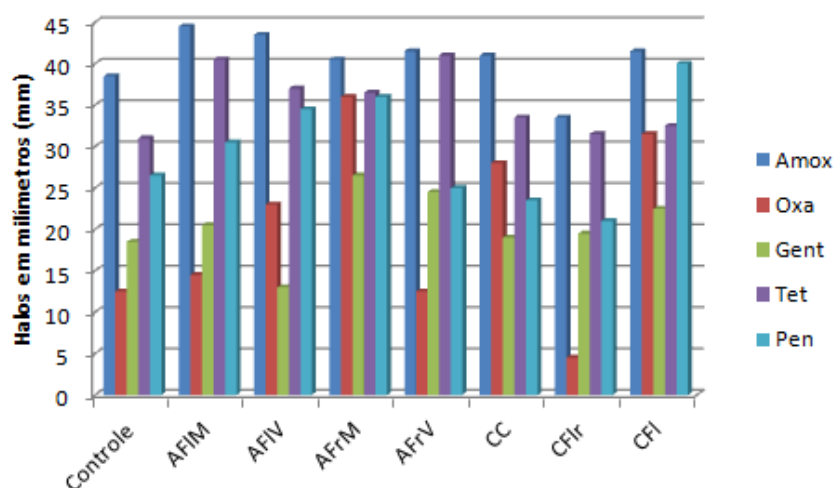
241 Diferentes efeitos foram observados nas associações entre os extratos metanólicos  
 242 e os antibióticos em cada grupo bacteriano. Do total das 100 combinações entre os  
 243 extratos das plantas e as drogas antimicrobianas avaliadas neste estudo, 48% destas  
 244 apresentaram efeito sinérgico, indicando que houve potencialização da ação do  
 245 antibiótico frente à bactéria testada.

246 A amostra de *Streptococcus agalactiae* demonstrou maior susceptibilidade à

247 interferência das associações entre antimicrobianos, sendo verificando 23% de  
 248 interações sinérgicas para todos os extratos analisados. Seguido pelo *Staphylococcus*  
 249 *aureus* ATCC, com 15 eventos sinérgicos. Enquanto que *E. coli* e *P. aeruginosa*  
 250 apresentou 10 casos sinérgicos, ou seja, 10% de sinergismo. A diferença de  
 251 sensibilidade dentre os grupos bacterianos, em ensaios sinérgicos, foram observadas por  
 252 Zago et al., (2009), sendo estes resultados justificados devido a estrutura complexa das  
 253 bactérias Gram negativas, as quais apresentam-se menos sensíveis às interações entre  
 254 drogas antibacterianas e plantas medicinais (OLIVEIRA et al., 2006).

255

256



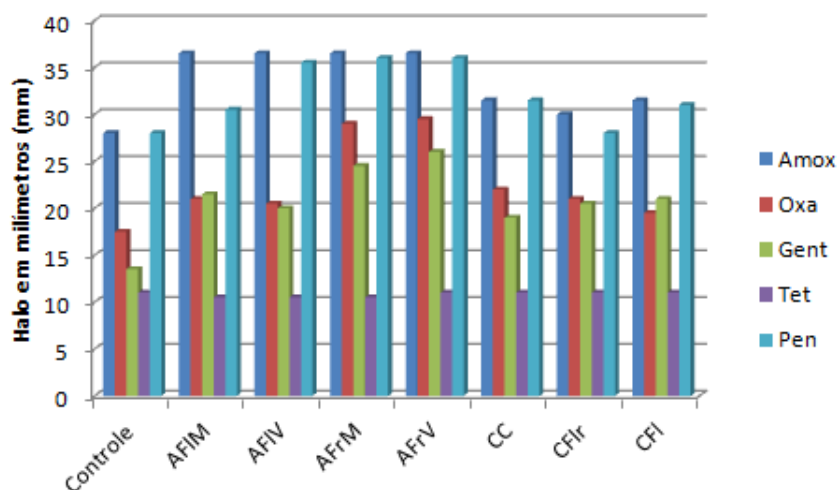
257

258 **Figura 1:** Valores das médias encontradas para os controles (C) em mm e para os tratamentos (T)  
 259 em mm realizados com extratos metanólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) e  
 260 *Tagetes minuta* L. (Chinchilho) frente aos cinco antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* ATCC.

261

262





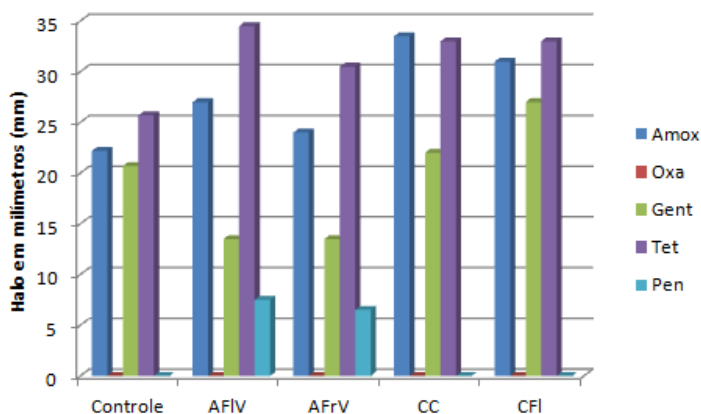
263

264 **Figura 2:** Valores das médias encontradas para os controles (C) em mm e para os tratamentos (T)  
 265 em mm realizados com extratos metanólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) e  
 266 *Tagetes minuta* L. (Chinchilho) frente aos cinco antibióticos sobre *Streptococcus agalactiae*.

267

268

269

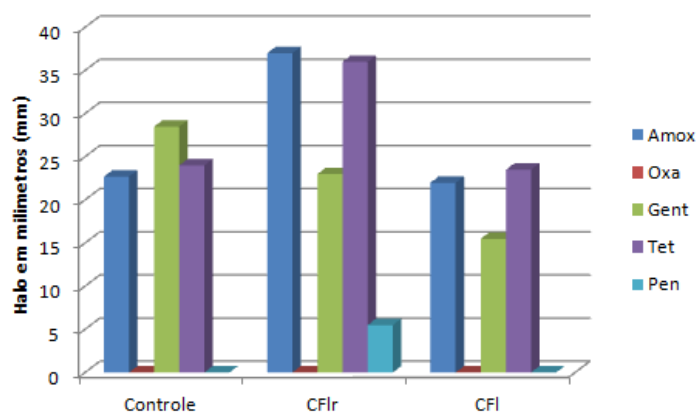


270

271 **Figura 3:** Valores das médias encontradas para os controles (C) em mm e para os tratamentos (T)  
 272 em mm realizados com extratos metanólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) e  
 273 *Tagetes minuta* L. (Chinchilho) frente aos cinco antibióticos sobre *Escherichia coli* ATCC.

274

275



276

277 **Figura 4:** Valores das médias encontradas para os controles (C) em mm e para os tratamentos (T)  
 278 em mm realizados com extratos metanólicos *Tagetes minuta* L. (Chinchilho) frente aos cinco  
 279 antibióticos sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC.

280

281 Os dados obtidos neste estudo indicam a possibilidade da associação entre  
 282 extratos vegetais e drogas antimicrobianas, considerando as plantas medicinais como  
 283 importantes veículos no controle da resistência bacteriana e no tratamento das doenças  
 284 infecciosas.

285

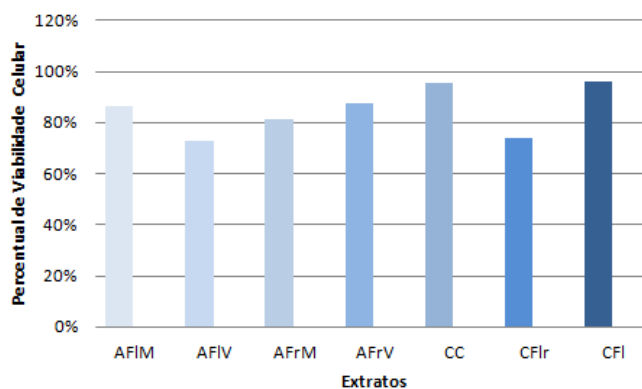
## 286 Citotoxicidade

287

288 A viabilidade celular foi verificada em relação ao controle de células não tratadas  
 289 com os EHA. Nas concentrações testadas, observaram-se percentuais de viabilidade  
 290 distintas aos diferentes extratos. Neste ensaio foram utilizados apenas os extratos  
 291 metanólicos, que obtiveram eficiência antibacteriana em teste anterior com o mesmo  
 292 microrganismo através da técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

293

294



295

296 **Figura 5:** Valores do percentual da viabilidade celular referente aos extratos obtidos no teste de  
 297 citotoxicidade.

298

299 De acordo com os resultados, o extrato Chinchilho Folha (ECFI) apresentou-se  
 300 menos tóxico, com uma viabilidade celular de 96% na concentração de 1:40, seguido do  
 301 extrato Chinchilho Caule (ECC) com viabilidade de 95,32%.

302 Com 86,5% e 81,3% de viabilidade celular os extratos Aroeira Folha Madura  
 303 (EAFIM) e Aroeira Fruto Maduro(EAFrM), nas concentrações de 1:80 e 1:40,  
 304 respectivamente. Já os extratos de Aroeira Folha Verde (EAFIV) e Chinchilho Flor  
 305 (ECFlr) apresentaram os menores valores de viabilidade celular, com 72,8% e 73,8% nas  
 306 concentrações de 1:80 e 1:40. E o extrato metanólico de Aroeira Fruto Verde (AFrV),  
 307 apresentou na concentração de 1:80 uma viabilidade celular de 87,8%.

308 A toxicidade de algumas plantas pode estar relacionada à sua composição  
 309 química, sendo a presença de triterpenóides e esteróides, exemplos de compostos  
 310 responsáveis por esses efeitos os quais são responsáveis por inúmeros efeitos deletérios  
 311 ao organismo humano e animal (ALMEIDA et al., 2002; PEREIRA; CASTRO, 2007).

312 Na literatura, são escassos os estudos encontrados quanto aos efeitos citotóxicos  
 313 de extratos vegetais, o que pode contribuir com a exposição dos usuários de plantas  
 314 medicinais e fitoterápicos aos seus possíveis efeitos nocivos. Por se tratar de um estudo *in*  
 315 *vitro*, os dados obtidos requerem um maior detalhamento quanto à caracterização de seus

316 componentes químicos individuais.

## 317 **CONCLUSÃO**

318 A partir dos dados obtidos no presente estudo foi possível caracterizar as duas  
319 espécies vegetais quanto as suas propriedades biológicas, características químicas e  
320 efeitos citotóxicos. Assim, observou-se que:

321 O teor de compostos fenólicos totais variou dentre os extratos e as partes das  
322 plantas, o caule e a flor do chinchilho apresentaram os maiores teores de compostos  
323 fenólicos, enquanto que a presença de antocianinas foi predominante na espécie *Schinus*  
324 *terebinthifolius* Raddi.

325 A interação entre extratos vegetais e antimicrobianos sintéticos foi considerada  
326 positiva devido ao índice de efeitos sinérgicos.

327

## 328 **REFERÊNCIAS**

- 329 ALMEIDA, D. P. F. Cucurbitáceas hortícolas. Apontamentos, Porto, p. 1-2, 2002.  
330 Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. Disponível em:  
331 <<http://dalmeida.com/hortnet/apontamentos/Cucurbitaceas.pdf>>. Acesso em: 16 nov.  
332 2014.
- 333 BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk  
334 method. **American journal of clinical pathology**, v.45, n.4, p.493, 1966.
- 335 BETONI J, E. C., MANTOVANI, R. P., BARBOSA, L. N., DI STASI, L. C.,  
336 FERNANDES, A., Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on  
337 *Staphylococcus aureus* diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 101: 387-90, 2006.
- 338 BETONI, J.E. C. et al. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on  
339 *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.4,  
340 p.387-390, 2006.

- 341 CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for dilution  
342 antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically: **Approved**  
343 **Standard**. M7-A6; 2005.
- 344 KUMAR A. S., VENKATESHWARAN, K., VANITH, J., SARAVAN, A.N. V. S.,  
345 GANESH, M., VASUDEVAN, M., SIVAKUMAR, T. Synergistic activity of methanolic  
346 extract of *Thespesia populnea*(Malvaceae) flowers with oxytetracycline. **Bangladesh J**  
347 **Pharmacol** 4: 13-6, 2009.
- 348 LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries.  
349 **HortScience**, 1972.
- 350 MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química**  
351 **Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.
- 352 OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V.  
353 N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA FILHO, R. N. Estudo da  
354 interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na  
355 clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**,v.16, n.14, p. 77-82, 2006.
- 356 PEREIRA, A. C.; CASTRO, D. L. Prospecção fitoquímica e potencial citotóxico de  
357 *Unxia kubitzkii* H. Rob. (Asteraceae-Heliantheae). **Revista Brasileira de Biociências**, v.  
358 5, n. 2, p. 231- 233, 2007.
- 359 PITTLER, M. H.; ERNST, E. Peppermint oil for irritable bowel syndrome: a critical  
360 review and metaanalysis.**The American journal of gastroenterology**, v.93, n.7,  
361 p.1131-1135, 1998.
- 362 QUEIRES, L. C. S.; RODRIGUES, L. E. A. Quantificação das Substâncias Fenólicas  
363 Totais em Órgãos da Aroeira *Schinus terebenthifolius* (RADDI). 1998.
- 364 REED, L. J.; MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty percent end points.  
365 **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

- 366 ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de  
367 Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v.  
368 6, n. 3, p.317-320, 2003.
- 369 SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The  
370 quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and**  
371 **Agriculture**, v 10, n.1, p.63-68, 1959.
- 372 WALLUM, E.; HEDANDER, J.; GABERG, P. Research perspectives for prescreening  
373 alternatives to animal experimentation: On the relevance of cytotoxicity measurements,  
374 barrier passage determinations and high throughput screening in vitro to select potentially  
375 hazardous compounds in large sets of chemicals. **Toxicology and Applied**  
376 **Pharmacology**, vol. 207, n. 2, p. 393-397, 2005.
- 377 WEI, W.; DEJIE, L.; XIAOJING, S.; TIANCHENG, W.; YONGGUO, C.; ZHENGTAO,  
378 T.; NAISHENG, Z. Magnolol inhibits the inflammatory response in mouse mammary  
379 epithelial cells and mouse mastitis model. **Inflammation**, August, 31. 2014.
- 380 ZAGO, J.A.A.;USHIMARU,P.I.; BARBOSA, L.N.; JUNIO,A.F. Sinergismo entre óleos  
381 essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureuse*  
382 *Escherichia coli*isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de**  
383 **Farmacognosia**, v.19, n.4, p. 828-833, 2009.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi., apresenta resultados promissores com extrato metanólico quanto ao potencial antimicrobiano;
- A espécie *Tagetes minuta* L., demonstrou resultados eficazes do extrato metanólico quanto ao potencial antimicrobiano;
- O fruto de aroeira apresentou quantidade superior de óleo essencial quando comparadas com as folhas;
- A aroeira obteve resultado promissor com os óleos essenciais da folha verde e do fruto maduro contra as cepas Gram positivas;
- A folha de chinchilho apresentou quantidade superior de óleo essencial quando comparada com as demais partes da planta;
- O chinchilho obteve resultado promissor com os óleos essenciais da folha e da flor para as cepas Gram negativas, e os óleos essenciais da semente demonstrou sendo o mais efetivo com as cepas Gram positivas;
- O caule e a flor do chinchilho apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos;
- A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi. apresentou maior quantidade de antocianinas;
- A interação entre extratos vegetais e antimicrobianos sintéticos foi considerada positiva devido ao índice de efeitos sinérgicos.

## REFERÊNCIAS

ABBASI, AM, MA KHAN, M. AHMAD, R. QURESHI, M. ARSHAD, S. JAHAN, M. ZAFAR E S. SULTANA. 2010. Estudo etnobotânico das ervas que curam ferida entre as comunidades tribais no Norte Himalaya Ranges Distrito Abbottabad, Paquistão. *Pak. J. Bot.* 42 (6): 3747- 3753.

ABEDINI, A.; ROUMY, V.; MAHIEUX, S.; BIABIANY, M.; STANDAERT-VITSE, A.; RIVIÈRE, C.; SAHPAZ, S.; BAILLEUL, F.; NEUT, C.; HENNEBELLE, T. Rosmarinic Acid and Its Methyl Ester as Antimicrobial Components of the Hydromethanolic Extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. v.4, n.11, p.41-47, 2013.

ABIFISA – Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplementos e de Promoção à Saúde. Serviço de Referência. Disponível em: <<http://www.abifisa.gov.br>> Acesso em: 12 nov. 2014

AGUIAR, J. S.; ARAÚJO, R. O.; DO DESTERRO RODRIGUES, M.; SENA, K. X.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M.; OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; NASCIMENTO, S. C. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Extract, Fractions and Isolated Compounds from the Stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 4, p. 4124-4140, 2012.

AGRA, M. F, FRANÇA P.F, BARBOSA-FILHO J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn** 17:114-140.2007.

AGRA, M. F. SILVA K.N., BASÍLIO I.J.L.D; FRANÇA P.F.; BARBOSA-FILHO J.M. Survey of Medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev. Bras Farmacogn** 18: 472-508.2008.

AHMED, A. S.; ELGORASHI, E. E.; MOODLEY, N.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.;



ELOFF, J. N. The antimicrobial, antioxidative, antiinflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African Bauhinia species used traditionally to treat diarrhoea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 3, p. 826-839, 2012.

ALBERTASSE PD, THOMAZ LD, ANDRADE MA. Medicinal plants and their uses in Barra do Jucu community, Vila Velha Municipality, Espírito Santo State, Brazil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2010;12(3):250-60.

ALLAHVERDIYEV, A. M., BAGIROVA, M., ABAMOR, E. S., ATES, S. C., KOC, R. C., MIRALOGLU, M., ELCICEK, S., YAMAN, S., UNAL, G. The use of platensimycin and platencin to fight antibiotic resistance. *Infection and Drug Resistance* 6: 99–114, 2013.

ALMEIDA, A. C.; SOARES, T. M. P.; SILVA, D. B.; SILVA, B. C. M.; ALMEIDA, P. N. M.; SANTOS, C. A. Atividade do tratamento de bioterápicos para mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 6, n. 2, p. 134-141, 2011.

ALMEIDA, L.S. (2005) *Avaliação morfológica de mudas de Allophylus Edulis (A. St.-HIL., A. Juss. & Cambess.) RADL. (Vacum) e Schinus terebinthifolius Raddi (aroeira) produzidas em diferentes substratos*. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Curitiba – PR, Universidade Federal do Paraná, 105f.

ALONSO, J., Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos., 1a.ed., Rosario-Argentina., Corpus., 2004., Pp. 1001,1002.

ALVES, T. M. D. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. D. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

ARAÚJO, P.V.; CARVALHO, M.P.; RAMOS, M.D.L.R. **Um porto de árvores**. Porto: C. Aberto, 48p. 2006.

ARIAS, B.; Y OTROS. Uso de plantas medicinales en relación al estado de conservación del bosque en Córdoba., Vol.20., No2., Córdoba-Argentina., Ecol. Austral., 2010., Pp. 235-246.

AVANCINI, César A. M. Saneamento Aplicado em Saúde e Produção Animal: Etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de hipericum caprifoliatum cham. E schlecht- Hypericaceae (guttiferae) - (escadinha/ sinapismo) para uso como desinfetante e antisséptico. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias, na especialidade de Medicina Veterinária

Preventiva) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

AVANCINI, C. A. M; FISCH, E.;GRAVINO, I.; CORINO, R.B. Atividade antibacteriana “*in vitro*” de extração vegetal (decocto) frente microrganismos padronizados de interesse em medicina veterinária: resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureoides* D.C. – Asteraceae (“macela”). In: XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária do Rio Grande do Sul, 2006, Gramado. **Anais**, v 97, 2006.

AVANCINI, C., WIEST, J.M., DALL'AGNOL, R., HAAS, J.S., VON POSER, G.L. Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy** 27, 894-899, 2008.

BABU, K.G. D; KAUL, V.K; Variations in Quantitative and Qualitative Characteristics of Wild Marigold (*Tagetes minuta* L.) Oils Distilled Under Vacuum and at NTP **Industrial Crops and Products**, v.26, 241–251, 2007.

BANDES. A cultura da aroeira em São Mateus e arredores: um pioneirismo que o BANDES deve apoiar. *Estudos BANDES*. Banco de Desenvolvimento do Espírito Santo. Vitória: Bandes. 39p, 2008.

BARATA, L. Empirismo e ciência: fonte de novos fitomedicamentos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 57, n. 4, p. 4-5, out/dez. 2005.

BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTE, A. D.; Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Quím. Nova**, v. 30, n.8, p.1959-1965, 2007.

BARBOSA, S. B. P.; MONARDES, H. G.; CUE, R. I.; RIBAS, N. P.; BATISTA, Â. M. V. Avaliação da contagem de células somáticas na primeira lactação de vacas holandesas no dia do controle mensal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.1, p.94-102, 2007.

BATISH, DR, K. ARORAA, HP SINGHB E RK KOHLIA. Potencial utilização de pó seco de *Tagetes minuta* como herbicida natural para o gerenciamento de ervas daninhas de arroz. **rotec cultura**.26: 566-571, 2007.

BELHAMEL, K.; ABDERRAHIM, A.; LUDWIG R. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Schinus Molle* L. growth in Algeria. **Acta Hort** (ISHS) 826:201–4p, 2009.

BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J.P.; CAZAUX S.; BOUAJILA, J.

Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. **Journal of Food Science** Vol. 75, Nr. 6, 2010.

BERTOLDI, M. C. Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleoresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa, 96p. **Tese de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2006.

BEZERRA, D.A.C. et al. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastites bovina **Rev. Bras. Farmacogn.** 19(4):814-817, 2009.

BII, C. C.; SIBOE, G. M.; MIBEY, R. K. Plant essential oils with promising antifungal activity. **East African Medical Journal**, v. 77, n. 6, p. 319-322, jun. 2000.

BIAVATTI, M., MARENSI, V., LEITE, S.N., REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Rev. Bras. Farmacogn** 17: 640-653.2007.

BONA, C.; REZENDE, I.M. D.E; SANTOS, G. D.E O.; SOUZA, L.A. DE. Effect of soil contaminated by diesel oil on the germination of seeds and the growth of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) seedlings. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba-PR, 54(6):1379-1387, 2011.

BOSCOLO OH, MENDONÇA-FILHO RFW, MENEZES FS, SENNA-VALLE L. The antioxidant power of some restinga plants cited as medicines. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. 9(1):8-12, 2007.

BOROS, L.F. Ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira). **Tese de Mestrado (Microbiologia, Parasitologia e Patologia)** do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, 2007.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, J. P.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G.; THOMAZ, L. W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 848 – 854, 2006.

BUFFON, M. C. M.; LIMA, M. L. C.; GALARDA, I.; COGO, L. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma*

*zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo “*in vitro*”. **Revista Visão Acadêmica**, v.2, n.1, p.31-38, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**, 126p, 2011.

BRANCO NETO, M. L. C.; RIBAS FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA FILHO, M. A.; CZECZKO, N. G. AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V. R.; TEIXEIRA, H. M.; AGUIAR, L. R. F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cir. Brás. Suppl.**, v.2, p.15-20, 2006.

BRAZ R, WOLF LG, LOPES GC, DE MELLO JCP. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 22(5):1111-8, 2012.

BREME, K, P. TOURNAYRE, X. FERNANDEZ, UJ MEIERHRNRICH, H. BREVARDS, D. JOULAINS E JL BERDAGUE. Identificação de Odor Os compostos de impacto de *Tagetes minuta* L. Óleo Essencial: Comparação de dois métodos GC-olfatometria. **J. Agric. Comida Chem**. 57 (18): 8.572-8.580, 2009.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos. 416 p, 2010.

CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 20, p. 140-6, 2010.

CARLINI E.A., ALMEIDA-DUARTE J.M., TABACH R. Assessment of the Toxicity of the Brazilian Pepper Trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira-do-sertão). **Phytother. Res**. 27: 692–698, 2013.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, N.S.M.S.A.Q.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v.5, n.11, p.26-32, 2007.

CARVALHO, M.G., MELO, A.G.N., ARAGÃO, C.F.S., RAFFIN, F.N., MOURA, T.F.A.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.15, n.1, p.158-169, 2013.

CASAGRANDE, A. Plantas medicinais e ritualísticas utilizadas pela comunidade do Morro da Cruz, Porto Alegre – RS. **Tese** (Bacharel em Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CASTILHO, A.R. et al. Produtos Naturais em Odontologia. **Rev Saúde**, p.11-19, 2007.

CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. M. P; ARRUDA, T. A.; PEREIRA, M. S.V; HIGINO, J. S.; ALVES, J. A.; PASSOS, M. G. V. M.; SANTOS, V. L. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” do extrato etanólico de *Punica granatum* Linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 111-114, abr-jun. 2006.

CEOLIN, TILA et al. Plantas medicinais utilizadas como calmantes por agricultores ecológicos da região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Journal of Nursing UFPE on line** [JNUOL/DOI: 10.5205/010120073.4 , 1034-1041, 2009.

CERUKS, M. *et al.* Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (*Anacardiaceae*). **Química Nova**. v. 30, nº3, pág. 507-599, 2007.

CESÁRIO, L.F.; GAGLIANONE, M.C. Biologia Floral e Fenologia Reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (*Anacardiaceae*) em Restinga do Norte Fluminense. **Acta Botânica Brasileira**, Belo Horizonte-MG, 22(3):828-833, 2008.

CESTARI, I.M; SARTI, S.J; WAIB, C.M; Junior, A.C.B; Evaluation of the Potential Insecticide Activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) Essential Oil Against the Head Lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae), **Neotropical Entomology**, v.33(6), 805-807, 2004.

COFRE, C. Determinación de la actividad insecticida y/o anti alimentario del aceite esencial de *Tzinsu Tagetes minuta* en *Drosophila melanogaster*. **Tesis** Bioquímico Farmacéutico. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias, pp. 15, 16, 2011

COLOMBO R.B., SILVA A.V., MARTINS L.A., MELLO P.L., AGOSTINIS R.O. & BARZON E.M. Prevalência da mastite subclínica e associação dos agents etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região sudoeste do Paraná. **Vet. Zootec**. 19:513-521, 2012.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. Espécies nativas da flora brasileira de valor

econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – região sul. **MMA**, Brasília-DF. p.934, 2011.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E. Plantas Medicinais: do cultivo a terapêutica. 7ª ed.. Petrópolis, RJ, **Ed. Vozes**, p.248, 2008.

COSTA, E.M.M.B.; BARBOSA, A.S.; ARRUDA, T.A.; OLIVEIRA, P.T.; DAMETTO, F.R.; CARVALHO, R.A.; MELO, M.D. Estudo *in vitro* da Ação Antimicrobiana de Extrato de Plantas contra *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica e Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 175–180, 2010.

CHAMORRO, E.R.; BALLERINI, G.; SEQUEIRA, A. F.; VELASCO, G. A.; ZALAZAR, M. F. Chemical composition of essential oil from tagetes minuta l. leaves and flowers.

**Journal of the Argentine Chemical Society** – Vol. 96 - N° (1-2), 80-86. 2008.

CHOVANOVÁ,R.; MIKULÁŠOVÁ,M.; VAVERKOVÁ, S.In vitro antibacterial and antibiotic resistance modifying effect of bioactive plant extracts on methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **International Journal of Microbiology**, v.13,n.7, p.176-184. 2013.

CLEFF, M.B.; SANTIN, R. Homeopatia e fitoterapia. In: NOBRE, M.O.; MUELLER, E. N.; CAMPELLO-FÉLIX, A. O.; TILLMANN, M. T. **Tópicos em criação e clínica de cães**. Pelotas : Editora e Gráfica Universitária da UFPel, 178p, 2009.

CLEMENTE A.D. Composição química e atividade biológica do óleo essencial da pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius Raddi*) **Dissertação** de Mestrado em Agroquímica – Viçosa, Minas Gerais, 50p, 2006.

COSTA, G. M. Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais. **Tese** (doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,123p, 2008.

DA CUNHA, M. G.; FRANCHIN, M.; GALVÃO, L. C. C. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 23, 2013.

DIAB, Y.; ATALLA, K.; ELBANNA, K. Antimicrobial screening of some Egyptian plants and active flavones from Lagerstroemia indica leaves. **Drug discoveries & therapeutics**, v. 6, n. 4, p. 212, 2012.

DIAS, R. V. C. Principais metodos de diagnostico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.1, n.1, p.23-27, 2007.

DOMINGUES, B.S.L. et al. A produção de leite orgânico e aspectos de segurança alimentar, **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 4, p. 490-501, 2012.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PERERIRA, B; MAGALHÃES, P;M; & DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognósia**. v.4, p:06-08, 2004.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATO, A.; REHDER, V.L.; DELARMELINA, C. Anti- *Candida* acitivity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.305-311, 2005.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Construindo a história dos produtos naturais. **Multiciência**, v.7, n.4, p.41-44, 2006.

ETHUR, L.Z.; JOBIM, J.C.; RITTER, J.G.; OLIVEIRA, G.; TRINDADE, B.S. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaquí – RS. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu-SP, 13(2):121-128, 2011.

FEBLER A.T., KASPAR H., LINDEMAN C.J., STEGEMANN M.R., PETERS T., MANKERTZ J., WATTS J.L. & SCHWARZ S. A proposal of interpretive criteria for cefoperazone applicable to bovine mastitis pathogens. **Vet. Microbiol.** 157:226-231, 2012.

FERNANDEZ, V. N. V.; SILVA, R. K. P.; XIMENES, R. S. F.; AVANCINI, C. A. M. Atividade desinfetante e antisséptica de extrações de plantas nativas no sul do Brasil, frente bactérias de interesse na área da Medicina Veterinária: I - resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureoides* D.C. ASTERACEAE (macela). In: **XV Salão e XII Feira de Iniciação Científica/UFRGS**, 2003, Porto Alegre, p. 222-222, 2003.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. de. O controle de fitonematoides por plantas antagonistas e produtos naturais. Universidade Federal de Vicosa, 2004. Disponível em: <http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/antagonistas.pdf>. Acesso em: nov. 2014.

FERREIRA, J. L et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. **Ciênc. Anim. Bras.**, Teresina, v. 8, n. 2, p. 261-266, abr./jun. 2007.

FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L. F.; SOUZA, V. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**. v. 36, p. 1228-1234, 2006.

FIGUEIREDO, L. Aroeira Vermelha. **Revista Terra da Gente**, 57:44-49, 2009.

FIORI GP, GARCIA KB, GONÇALVES V, SANTOS, TRB. Ação acaricida de extratos de *Tagetes minuta* sobre larvas de *Rhipicephalus* e *Boophilus microplus*. **Anais XX Congresso de Iniciação Científica e III Mostra Científica da Universidade Federal de Pelotas**. Brasil, 2011.

FONTANA, V. L. D. S.; GIANNINI, M. J. S. M.; LEITE, C. Q. F.; MIRANDA, E. L.; ALMEIDA, A. M. F.; FONTANA, C. A. P.; SOUZA, C. M.; STELLA, A. E. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da b- lactamase em *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 17, n. 4, p. 552-559, dez. 2010.

FURTADO, F. N. *et al.* Atividade carrapaticida do óleo essencial de *Tagetes minuta*. In: V Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia; Guarulhos, SP. Anais do V Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia. **Revista Saúde**, v. 4, p. 111, 2010.

FRAGA, H. F.; ROSA, P. M.; MORAIS, A. A.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. Análise dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Gallesia integrifolia* (Sprengel) Harms (Phytolaccaceae). **XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia – SP, maio 2006.

FREIBURGHAUS, F.; KAMINSKY, R.; NKUNYA, M. H. H.; BRUN, R. Evaluation of african medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 14, p. 1-11, 1996.

FRIEDMAN, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. **Molecular nutrition & food research**, v. 51, n. 1, p. 116-134, 2007.

GALDINO M.C., DOMINGUES P.F. & LAPENNA B.S.L. A produção de leite orgânico e aspectos de segurança alimentar. **Vet. Zootec**. 19:490-501, 2012.

GALUPPI, R.; AURELI, S.; BONOLI, C.; OSTANELLO, F.; GUBELLINI, E.; TAMPIERE, M. P. Effectiveness of essential oils against *Malassezia* spp.: comparison of two *in vitro* tests. **Mikologia Lekarska**, v.17, n.2, p.79-84, 2010.



GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. PÉREZ-URRIA. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GARCIA *et al.* Chemical identification of *Tagetes minuta* Linnaeus (asteraceae) essential oil and its acaricidal effects on thicks. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n.4, p.405-411, 2012.

GIL, A; GHERSA, C.M; LEICACH, S. Essential Oil Yield and Composition of *Tagetes minuta* Accessions from Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.28, 261 - 274, 2000.

GIL, E.S.; Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 2ª Ed. São Paulo. **Pharmabooks**, 2007.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil medicina**. Rio de Janeiro: Elsevier, p.3458, 2009.

GOMES, M.D.G.; GÓIS, S.N.; SILVA, C.M.da; GOMES, L.J.. Extrativismo e comercialização da aroeira ( *Schinus terebentifolius* Raddi) na região do Baixo São Francisco. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/2/602.pdf>>. Acesso em: 16 nov.2013.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11ª. Porto Alegre: Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill. 1821 p, 2010.

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R., MITCHELL, G., GATTUSO, M., DIARRA, M. S., MALOUIN, F., BOUARAB, K. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**. 10(8): 3400-19, 2009.

GRAVENA, R.A. et al. Efeitos fisiológicos e comportamentais do uso do extrato de Valeriana em dietas de codornas em crescimento. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 3, p. 407-414, 2010.

HADJIAKHOONDI, A., H. VATANDOOST, M. KHANAVI, MR ABAEE E M. KARAMI. Biochemical Investigação de diferentes extratos e Actividade larvicida de *Tagetes minuta* L.em *Anopheles* larvas *stephensi*. Iranian **J. Pharmaceut. Sci.** 1 (2): 81-84, 2005.

HAMAYUN, M., F. HUSSAIN, S. AZAL E N. AHMAD. Alelopático *Cyperus rotundus* efeito e *Echinochloa crus-galli* em sementes germina o e plumule e crescimento radical

na cultura do milho (*Zea mays* L.). Pak. **J. Weed Sci. Res.** 11 (1-2): 81-84, 2006.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HULINA, N. Selvagem marigold-*Tagetes minuta* L. New Weed no Ilha de Hvar, e Nova Contribuição para o conhecimento da sua Distribuição na Dalmácia (Croácia) Agricultura **Conspectus Scientificus**. 73: 23-26, 2008.

IBENS. (2007). *Instituto Brasileiro de Educação em Negócios Sustentáveis*. Disponível em: <<http://www.ibens.org/>>. Acesso em: 12 nov. 2014.

IBRAHIM, M.A.; MÄENPÄÄ, M.; HASSINEN, V.; KONTUNEN-SOPPELA, S.; MALEC, L.; ROUSI, M.; PIETIKÄINEN, L.; TERVAHAUTA, A.; KÄRENLAMPI, S.; HOLOPAINEN, J.K.; OKSANEN, E.J. Elevation of night-time temperature increases terpenoid emissions from *Betula pendula* and *Populus tremula*. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 6, p. 1583–1595, 2010.

IRERI LN, KONGORO J, NGURE P, MUTAI C, LANGAT B, TONUI WK. The potential of the extracts of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae), *Acalypha fruticosa* Forssk (Euphorbiaceae) and *Tarhonanthus camphorates* L. (Compositae) against *Phlebotomus duboscqi* Neveu Lemaire (Diptera: Psychodidae), the vector for *Leishmania major* Yakimoff and Schokhor. **J. Vect. Borne Dis.** 47: 168-174, 2010.

JESUS, S. D.E; FILHO, E. L. A. M.; Frugivoria por aves em *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) e *Myrsine coriacea* (Myrsinaceae). **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.15, n.4, p.585-591, 2007.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNICI, C. L.; RESENDE, M. A. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 632-7, 2007.

JOHANN, S.; SÁ, N.P.; LIMA, L. A.; CISALPINO, P.; COTA, B.B.; ALVES, T.M.A.; SIQUEIRA, E.P.; ZANI, C.L. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Annals of Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v.9, n.30, p.01-06, 2010.

JUNGES, Emanuele *et al.* Efeito do Extrato Aquoso e do Óleo Essencial de *Tagetes minuta* Aplicados ao Solo Sobre a Penetração de J2 de *Meloidogyne incognita* em Tomateiros. **Rev. Bras. de Agroecologia**, v.4, 118-126, 2009.

KAUL, P.N. et al–Essencial Oil Composition of *Tagetes minuta* L. Fruits–**Journal of Essencial Oil Research**–mar/abr, 2005.

KHALED, F.; EL-MASSRY,; EL-GHORAB, A. H.; SHAABAN, H. A.; SHIBAMOTO, T.; **J. Agric. Food Chem.** v.57, p.5265, 2009.

KUETE, V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. **Planta medica**, v. 76, n. 14, p. 1479-1491, 2010.

KUETE, V.; WIENCH, B.; ALSAID, M. S.; ALYAHYA, M. A.; FANKAM, A. G.; SHAHAT, A. A.; EFFERTH, T. Cytotoxicity, mode of action and antibacterial activities of selected Saudi Arabian medicinal plants. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v.13, n. 7, p. 354- 365, 2013.

LANGONI, H., PENACHIO, D. S., CITADELLA, J. C. C. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**.v 31, n.12, p. 1059-65, 2011.

LANGONI H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.** 33: 620-626, 2013.

LIMA, E.de.O.; PEREIRA, F.de.O.; LIMA, I.O.; TRAJANO, V.N.; SOUZA, E.L.de. *Schinus terebentifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. **Infarma**. v.16, n.7-8, p.83-85, 2004.

LIMA a, J.F.; DIMENSTEIN, M. A Fitoterapia na Saúde Pública em Natal/RN: visão do odontólogo. **Saúde Rev.** v.8,p.1937-44, 2006.

LIMA b, M. R. F., LUNA, J. S., SANTOS, A. F., ANDRADE, M. C. C., SANT'ANA, A. E.G., GENET, J. P., MARQUEZ, B., NEUVILLE, L., MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v.105, n. 14, p.137-147, 2006.

LIMA, S.M.G.; LIMA, A.F. & DONAZZOLO, J. Resgate do conhecimento popular e uso de plantas Medicinais na promoção da saúde em Sananduva – RS. **Revista Brasileira de Agroecologia**, 2(1):256-59, 2007.

LIMA, J.DOS.S.. Diversidade genética e RNAdf de isolados de *Colletotrichum spp.*

endofíticos da planta medicinal *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira). 102p. **Dissertação** (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

LIMA, T.; SILVA, O.; SILVA, L.; ROCHA, T.; GROSSI-DE-SÁ, M.; FRANCO, O.; LEONARDECZ, E. In Vivo Effects of Cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) Leaf Extracts on Diarrhea Treatment. Evidence-based **Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. n., p. 10, 2011.

LOGUERCIO, A. P.; GROFF, A. C. M; PEDROZZO, A. F. et al. Atividade in vitro do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, n. 2, p. 347-349, 2006.

LOOKERMAN, DJ, BL TURNER e RK JANSEN. Filogenética relações dentro da *Tagetes* (Asteraceae) com base em nuclear ITS ribossomais e sequências de genes de cloroplastos ndhF. **Syst.Bot.**28 (1): 191- 207, 2003.

LOPEZ, ML, NE BONAZANI E JA ZYGADLO. Alelopático potencial de *Tagetes minuta* terpenos por uma substância química, anatomia e abordagem phytotoxic. **Biochem. Sistema. Ecol.** 36: 882- 890, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. **Nova Odessa**: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais do Brasil – Nativas e Exóticas. Ed. Plantarum: **Nova Odessa** – SP; 2ª ed., p. 63-64, 2008.

LUCENA, L. H. de; FILHO, J. M. R.; MAZZA, M.; CZECHKO, N. G.; DIETZ, U. A.; NETO, M. A. C.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J. D.OS. Evaluation of the aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in the healing process of surgical incision in the bladder of rats Periguari. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, 2006.

MAIA, R. R.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; ALBUQUERQUE, A. C. L.; PEREIRA, L. F.; MACEDO-COSTA, M. R.; PEREIRA, A. V. Efeito antimicrobiano do extrato de *Momordica charantia* Linn isolado e em associação com antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* multirresistentes. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.4, p.12-17, 2008.

MACHADO, T. R. O.; CORREA, M. G.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitis cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p. 278-282, 2008.

MARQUES V.F., SOUZA M.M.S., MENDONÇA E.C.L., ALENCAR T.A., PRIBUL B.R., COELHO S.M.O., LASAGNO M. & REINOSO E.B. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.** 33:161-170, 2013.

MARODIN, S.M. ,BAPTISTA, L.R. de M. Uso de plantas com fins medicinais no município de Dom Pedro de Alcântara, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas medicinais.** 4(1):57-68, 2001.

MAROTTI, M. et al. Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. **Journal of Essential oil Research**, v. 16, n. 5, p. 440-444, 2004.

MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; FILHO, E. S. A. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MELO, J.G.; MARTINS, J.D.G.R.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf ) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban).**Acta Bot Bras.**v. 21, p.27-36, 2007.

MELLO-PEIXOTO E.C.T., JARDIM J.G., HEINZEN E.L., DOMINGUES P.F., PADOVANI C.R. & OLIVEIRA ORSI R. Própolis no controle da mastite bovina. **Archs Vet. Sci.** 17:43-52, 2012.

MELLO-PEIXOTO, E. C. T.; PELANDA, A. G; RADIS, A. C; HEINZEN, E. L.; ARCIA, R. G.; VALÉRIO, A.P. Incidência de mastite bovina em animais homeopatizados. **Instituto Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 64, n. 368, p. 66-71, 2009.

MENEZES, S. M. S.; PINTO, D. N.; CORDEIRO, L. N. Atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de *Punica granatum* L. (romã). **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 65, n. 11, p. 388-391, 2008.

MESHKATALSADAT, H. M.;SAFAEI-GHOMI, J.; SAEID MOHARRAMIPOUR, S.; NASSERI, M. Chemical characterization of volatile components of tagetes minuta L. cultivated in south west of iran by nano scale injection. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures.** vol. 5, n.1, 2010.

MICHIELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6615-23, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2009). Plantas de interesse ao SUS. Portal da Saúde - [www\\_Saude.gov.br](http://www.Saude.gov.br) - Fitoterapia. Site acessado em 12 de nov. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Terapias aliadas à medicina convencional são regulamentadas no SUS*. Brasília. Serviço de Referência. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br> > Acesso em: 12 nov. 2014.

MOREIRA, D. L.; GUARIM-NETO, G. USOS MÚLTIPLOS DE PLANTAS DO CERRADO: UM ESTUDO ETNOBOTÂNICO NA COMUNIDADE SÍTIO PINDURA, ROSÁRIO OESTE, MATO GROSSO, BRASIL *Polibotânica*, Núm. 27, abril, 2009, pp. 159-190 Instituto Politécnico Nacional México. **Polibotânica**, v., n. 27, p. 159-190, 2009.

MORGAN, E.C.; OVERHOLT, W.A.. Potential allelopathic effects of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Anacardiaceae*) aqueous extract on germination and growth of selected Florida native plants. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v.132, n.1, p.11-15, 2005.

MOURA-COSTA GF, NOCCHI SR, CEOLE LF, MELLO JCPD, NAKAMURA CV, DIAS FILHO BP, et al. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Parana, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 143(2):631-8, 2012.

MOUSTAFA, A. M. Y.; KOUAM, S. F.; KULSOOM, A.; EJAZ, A.; ALI, S.; ANJUM, S.; CHOUDHARY, M. I. Phytochemical investigation and biological evaluation of *Schinus terebinthifolius*. **Research Journal of Phytochemistry**, v.01, n.01, p.01-11, 2007.

MOYO M, KATSVANGA CAT, NYAKUDYA IW, TAFIREI R. Efficacy of the botanical pesticides *Derris elliptical*, *Capsicum frutescens* and *Tagetes minuta* for the control of *Brevicoryne brassicae* in vegetables. **J. Sust. Devel. Afr.** 8: 216-222, 2006.

MURGA-GUTIÉRREZ SN. Nemátodos Fitoparásitos asociados al cultivo de *Tagetes erecta* en el distrito Virú, La Libertad, Perú. **Neotrop. helminthol.** 1(1): 15-20, 2007.  
MCPHEE, S. J.; PAPADAKIS, M. A.; RABOW, M. W. **CURRENT Medical Diagnosis & Treatment**. 15ª. Rio de Janeiro. 2011.

NADER TT, et al. Avaliação in vitro da eficácia de extratos de plantas medicinais do cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolado de diferentes fontes de propriedades leiteiras. **Arq. Inst. Biol.** 77(3):429-433, 2010.

NEWMAN, D.; CRAGG, G. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NAQINZHAD, A. E SS MEHRVARZ. Alguns novos registros para o Irã e flora área Iranica coletadas de Parque Nacional Boujagh, N. Iran. Iran. **J. Bot.** (2) 13: 112- 119, 2007.

ODIEK J.O., OGORE P.B., SHAKALA E.K. & KABURU G.M. Prevalence of bovine mastitis, its therapeutics and control in Tatton Agriculture Park, Egerton University, Njoro District of Kenya. **Basic Res. J. Agricult. Sci. Rev.** 2:15-20, 2013.

OLIVEIRA, A. A.; MELO, C. B.; AZEVEDO, H. C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Ciênc. Anim. Bras.**, Sergipe, v. 10, n. 1, p. 226-230, 2009.

OLIVEIRA, R.A.G. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.16, n.1, p.77-82, 2006.

OLIVEIRA C.M.C., SOUZA M.G.S., SILVA N.S., MENDONÇA C.L., SILVEIRA J.A.S., OAIGEN R.P., ANDRADE S.J.T. & BARBOSA J.D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesq. Vet. Bras.** 31:104-110, 2011.

OMS/Organización mundial de la salud. Pautas para la evaluación de Medicamentos **Herbarios**. Ginebra, 2002.

OMS. WHA guidelines to asseing quality. 2007.

OYARZABAL, M. E., SCHUCH, L. F. D., PRESTES, L. S., SCHIAVON, D. B. A., RODRIGRES, M. R. A., MELLO, J. R. B. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas em leche de bovino. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.16, n. 3, p. 260-266, 2011.

OSMAN, HA, AY AI- GINDI, HS TAHA, AA AI-KAZZAZ, MMA YOUSSEF, HH AMEEN E AM LASHEIN. O controle biológico do nematóide *Meloidogyne incognita*: 2- Avaliação da os efeitos nematicidas de cultura de tecidos de *Tagetes erecta* sob

condições de laboratório e casa de vegetação. Egito. **J. Phytopathol.** 35 (1- 2): 33-44, 2008.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.M.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R.F. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p. 301-307, 2008.

OYEDEMI SO, PIROCHENVA G, MABINYA LV, BRADLEY G, AFOLAYAN AJ. Compositions and comparisons of antimicrobial potencies of some essential oils and antibiotics against selected bacteria. **African J Biotechnology**. 7(22):4140-6, 2008.

PARK, K.H., LEE, M., HONG, H.L., KIM, T., PARK, H.J., PARK, S.Y., MOON, S.M., CHONG, Y.P., KIM, S.H., LEE, S.O., CHOI, S.H., JEONG, J.Y., KIM, M.N., WOO, J.H., KIM, Y.S. Persistent catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia after catheter removal and initiation of antimicrobial therapy. **PLoS One** 7:e46389. doi: 10.1371/journal.pone.0046389, 2012.

PAULO, P. T. C.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; MORAIS, L. C. S. L. de; ANDRADE, F. B. DE; SANTOS, H. B.; (Schinus terebinthifolius Raddi, Plectranthus amboinicus Lour e Eucalyptus globulus Labill). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.1, p.68-76, 2009.

PEREIRA, C. A et al. Ação antimicrobiana in vitro de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L. , *Syzygium cumini* L. e *Pimpinella anisum* L. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2008, Universidade do Vale do Paraíba. **Anais**. Vale do Paraíba, 2008.

PEREIRA, E. M.; GOMES, R. T.; FREIRE, N. R.; AGUIAR, E. G.; BRANDAO, M. G.; SANTOS, V. R. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. **Planta Medica**, v. 77, p. 401-4, 2011.

PIO, C.M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, **Imprensa Nacional**; 2001.

PIRES, O.C.; TAQUEMASA, A.V.C.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; ARAÚJO, C.E.P. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) comparativa entre os frutos de Pimenta do Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do Reino (*Piper nigrum* L). **Acta Farmacéutica Bonarense**, v. 23, n. 02, p. 176-182, 2004.



POLAKOWSKA, K., LIS, M.W., HELBINA, W.M., DUBIND, G., DUBIND, A., NIEDZIOLKAB, J.W., MIEDZOBRODZKIA, J., WLADYKAD, B. The virulence of *Staphylococcus aureus* correlates with strain genotype in a chicken embryo model but not a nematode model. **Microbes and Infection**. 14(14):1352-1362, 2012.

PULLINGER, G. D.; COFFEY, T. J.; MAIDEN, M. C.; LEIGH, J. A. Multilocus-sequence typing analysis reveals similar populations of *Streptococcus uberis* are responsible for bovine intramammary infections of short and long duration. **Veterinary Microbiology**, 119, 194–204, 2007.

PLANTAMED. Agrião. Disponível em: <[www.plantamed.com.br/PG/TEXTOS/NCP/Nasturtium officinale.htm](http://www.plantamed.com.br/PG/TEXTOS/NCP/Nasturtium_officinale.htm)> . Acesso em: 12 de nov.de 2014.

QURESHI, RA, MA GHUFRAN, SA GILANI, K. SULTANA e M. ASHRAF. Estudos etnobotânico das plantas selecionadas de Sudhan Gali e Ganga Chotti Hills, Distrito Bagh, Azad Kashmir. **Pak.J. Bot.** 39 (7): 2275- 2283, 2007.

RAMIREZ, L.S.; DIAZ, H.E. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo. **Scientia et Technica**, v.13, n. 33, p. 397-400, 2007.

RANG, H.; DALE, M.; RITTER, J.; FLOWER, R. **Farmacologia. Tradução da 6ª edição Americana**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. p 829, 2007.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**,v. 11, n.2, p. 57-69, 2001.

RAVISHANKAR, K., KIRANMAYI, G.V.N., APPA REDDY, G.V., SOWJANYA, V.V.L., SAINADH, V.B., DURGA, V.G.L., PRASAD, V.S., SWAMINAIDU, P.V., PRASAD, T. Preliminary phytochemical screening and in-vitro antibacterial activity of Cucurbita maxima seed extract. **International journal of research in pharmacy and chemistry**. 2:86-91, 2012.

RAZA A., MUHAMMAD G., SHARIF S. & ATTA A. Biofilm producing *Staphylococcus Staphylococcus aureus* and bovine mastitis: a review. **Molec. Microbiol. Res.** 3:1-8, 2013.

RIBAS, M.O. et al. Efeito da *Schinus terebenthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Rev. Odonto Cienc.** – Fac. Odonto/PUCRS, v.21, n. 53, p. 245-252, 2006.

RIET-CORREA, F. SCHILD, A. L. LEMOS, R. A. A. BORGES, J. R. J. (Org.) Doenças de ruminantes e equídeos. 3. Ed. v.1. Santa Maria: **Pallotti**, 2007.

RITTER, M.R.; SOBIERAJSKI, G.R.; SCENKEL, E.P. & MENTZ, L.A. Plantas utilizadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 12(2):51-62, 2002.

REGASSA, F., ARAYA, M. In vitro antimicrobial activity of *Combretum molle* (Combretaceae) against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* isolated from crossbred dairy cows with clinical mastitis. **Tropical Animal Health and Production** 44, 1169-1173, 2012.

RESTELLO, R.M.; MENEGATT,C.; MOSSI,A.J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Sao Paulo, v.2, n.53, 2009.

RICHTER JM. Investigation into Alternative Wheat Aphid Control Strategies for Emerging Farmers. **Tese**. University of the Free State. Bloemfontein, África do Sul. 106 p., 2011.

RODRIGUES, A. R. O. Influencia da mastite na qualidade do leite in natura: revisão de literatura. Recife: UFERSA, **Monografia** (Especializacao em Higiene e Inspecao de Produtos de Origem Animal), Universidade Federal Rural do Semi-Arido, 2009.

SAEKI, E. K.; MELLO-PEIXOTO, E. C. T.; MATSUMOTO, L. S.; MARCUSSO, P. F.; MONTEIRO, R. M. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinária Basílica**, Brasília, v. 5, n. 3, p. 284-290, 2011.

SALVI JÚNIOR, A. *Schinus terebinthifolius* Raddi: Estudo Anatômico e Histoquímico das folhas e investigação do potencial farmacêutico do extrato etanólico e suas frações. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara. 15p, 2009.

SANTANA, J. S, SARTORELLI, P., LAGO, J. H. G. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 35, p. 2245-2248, 2012.

SANTOS, A.C.A. et al. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n.2, p.1011-1013, 2007.

SANTOS a, A.C.A. dos; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SERAFINI, L.A.; SANTOS, P.L. dos; MORLON, R.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Chemical composition of the essential oils from leaves and fruits of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi from southern Brazil. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 12, n. 1, p. 16-25, 2009.

SANTOS, L. L.; COSTA, G. M.; PEREIRA, U. P.; SILVA, M. A.; SILVA, N. Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus coagulase-negativa*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 1-7, 2011.

SANTOS b, L. M. Avaliação dos constituintes químicos polares e da atividade alelopática de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). **Dissertação** de Mestrado. Campos dos Goytacazes- RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, p.90, 2009.

SANTOS MMPD. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais das espécies *mangifera indica*, *eugenia jambolana*, *schinus terebinthifolius*, *capsicum annum*, e de análogos sintéticos da capsaicina **tese** (Doutorado): UENF; 2010.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 314 p, 2007.

SENATORE, F.; NAPOLITANO, F.; MOHAMED, M. A-H.; HARRIS, P. J. C.; MNKENI, P. N. S.; HENDERSON, J. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. **Flavour and Fragrance Journal**. 19: 574–578, 2004.

SILVA, E. R. D. Produção De Hemolisinas Por *Staphylococcus Aureus* Isolados De Casos De Mastite Bovina Subclínica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 2, p. 118-123, 2012.

SILVA-LUZ CL, PIRANI JR. *Anacardiaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil** Jardim Botânico, Rio de Janeiro 2012. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/index>

SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, J. V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; PEREIRA, M.S.V. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 209-212, 2008.

SILVA, P.. Inovação em fitoterápicos: uma corrida de obstáculos para acesso a recursos genéticos. **Revista Facto ABIFINA**. n.30, p.11, 2011.

SOARES, E.L.C.; VENDRUSCOLO, G.S.; EISINGER, S.M. & ZACHIA, R.A. Estudo etnobotânico do uso dos recursos vegetais em São João do Polêsine, RS, Brasil, de outubro de 1999 a junho de 2001. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 6(3):69-95, 2004.

SOUZA,C,A,S.; AVANCINI,C.A.M.; WIEST,J.M. Atividade antimicrobiana de *T. minuta* L. – Compositae (Chinchilho) frente a bacterias Gram-positivas e Gram-negativas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Sao Paulo,v. 6, n. 37, 2000.

SOUSA, M.H.de. Efeito do Extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre osteítes induzidas em maxilares de ratos. **Dissertação** de mestrado, área de concentração em estomatologia. PUC do Paraná. Curitiba, PR, 2004.

SOUZA C.M.P., BRANDÃO D.O., SILVA M.S.P., PALMEIRA A.C., SIMÕES M.O.S. & MEDEIROS A.C.D. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do Serviço Público de Saúde em Campina Grande-Paraíba. **Revta Bras. Plantas Mediciniais** 15:188-193, 2013.

SOUZA, L. F. L. Atividade antimicrobiana de extratos de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) frente a bactérias relacionadas à mastite bovina. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, 62p.,2011.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C. BRITO, M.A.V.P.; BASTOS, R.R. Fatores associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.251-260, 2005.

SCHEREINER, F.; RETZLAFF, G.; SIQUEIRA, M. F. R.; REZENDE, E. C.; SIMÃO, L. C.; KOZLOWSKIJUNIOR, V. A.; SANTOS, E. B. Uso do chá de *Punica granatum* (Romã) no controle da aderência de bactérias orais em ligaduras ortodônticas. **Revista Odontológica do Brasil Central**, Goiânia, v. 18, n. 45, p. 56-61, 2009.

SCHUCH, L. F. D.; WIEST, J. M.; COIMBRA, H.S.; PRESTES, L.S.; TONI, L.; LEMOS, J. S. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados a mastite bovina. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 161-169, 2008.

SCRIVANTI, L.R., ZUNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A.. *Tagetes minuta* and *Schinus aroeira* essential oils as allelopathic agents. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n.6, p. 563-572, 2003.

SHARMA, N.; RHO, G. J.; HONG, Y. H.; KANG, T. Y.; LEE, H. K.; HUR, T. Y.; JEONG, D. K. Bovine Mastitis: An Asian Perspective. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 6, p. 454-476, 2012.

SMITH-HALL, C.; LARSEN, H. O.; POULIOT, M. People, plants and health: a conceptual framework for assessing changes in medicinal plant consumption. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 8, n., p. 43, 2012.

SHAHZADI, I., A. HASSAN, UW KHAN E MM SHAH. Avaliando atividades biológicas dos extratos de sementes de *Tagetes minuta* L. encontrado em Nothern Paquistão. **J. Med. Planta Res.** 4 (20): 2108-2112, 2010.

SPELLBERG, B.; BARTLETT, J.; GILBERT, D. The future of antibiotics and resistance. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 4, p. 299-302, 2013.

TERESCHUK ML. Actividad biológica de flavonoides de Especies de *tagetes* más representativas del noroeste argentino (**tesis doctoral**). Tucumán: Universidad Nacional de Tucumán; 2005.

TOMOVA BS, WATERHOUSE JS, DOBERSKI J. The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction. **Entomol. Exp. Appl.** 115: 153-159, 2005.

TONIAL, F. Atividade Antimicrobiana de Endófitos e de Extratos Foliares de *Schinus terebenthifolius Raddi* (Aroeira). **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 17p, 2010.

TORBATI, M.; NAZEMIYEH, H.; LOTFIPOUR, F.; ASNAASHARI, S.; NEMATI, M.; FATHIAZAD, F. Composition and antibacterial activity of *Heracleum transcaucasicum* and *Heracleum anisactis* aerial parts essential oil. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.3, n.2, p. 415-418, 2013.

TOZZETTI, D.S. et al. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n.10, 2008.

TRESOLDI, G.; OLIVEIRA, F. C.; AVANCINI, C. A. M. Atividade antibacteriana desinfetante "in vitro" de extração vegetal frente a microrganismos padronizados de interesse em Medicina Veterinária: V - resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureoides* D.C. - Asteraceae. In: **XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS**, v.243, p. 205-206, 2006.

THORNE R, REVEAL J. An updated classification of the class Magnoliopsida ("Angiospermae"). 1era edición. **The New York Botanical Garden** (Nueva York): Enero: NYBG Press; 2007.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Methods Plant Biochemistry*, v.6, p. 47-69, 1991.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n.8, p. 519-528, 2005.

VENDRUSCOLO, G.S. & MENTZ, L.A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, 61(1-2):83-103, 2006.

VERMANI, K. e GRAG, S. Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. **Journal of Ethnopharmacology**, 80, 49-66, 2002.

VISITIN, A.; BERNADELLO, G., Morfología y Anatomía floral de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae), n.12., Córdoba-Argentina., Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal CONICET., p. 8-15, 2005.

VIVOT, E. P; SANCHEZ, C.; CACIK, F.; SEQUIN, C. Actividad antibacteriana em plantas medicinales de la flora de Entre Rios (Argentina). **Ciencia, docencia y tecnologia**, v. 2, n.45, p. 165-185, 2012.

VUONG, C., GÖTZ, F., OTTO, M. Construction and characterization of an agr deletion mutant of *staphylococcus epidermidis*. **Infection and Immunity**. 68(3):1048-1053, 2000.

WILLAMS, D. A.; OVERHOLT, W. A.; CUDA, J. P.; HUGHES, C. R.; Chloroplast and microsatellite DNA diversities reveal the introduction history of Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius*) in Florida. **Molecular Ecology**, v.14, n.12, p.3643-3656, 2005.

WEI, L., YU, L., XUE-ZHI, Z., NING, L., HONG, C. In vitro bactericidal activity of Jinghua Weikang capsule and its individual herb *Chenopodium ambrosioides* L. against antibiotic-resistant *Helicobacter Pylori*. **Chin J. Integr. Med.** v. 19, n. 1, p. 54-57, 2013.

WERKMAN, C.; GRANATO, D. C.; KERBAUY, W. D.; SAMPAIO, F. C.; BRANDÃO, A. A. H.; RODE, S. M. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L.

(romã). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 104-111, jul. 2008.

ZAFALON, L.F., NADER FILHO, A., OLIVEIRA, J.V., RESENDE, F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.577-585, 2008.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E. M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc & Ciência – ACBS**, Santa Catarina, v. 1, n. 1, p. 65-70, 2010.