

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

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DO DECOCTO DE *Achyrocline
satureioides* (Lam.) D.C. – ASTERACEA – (“macela”), SOBRE BACTÉRIAS
ISOLADAS DE MASTITE BOVINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

VITOR DA ROCHA SPEROTTO

PORTO ALEGRE

2010

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

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DO DECOCTO DE *Achyrocline
satureioides* (Lam.) D.C. – ASTERACEA – (“macela”), SOBRE BACTÉRIAS
ISOLADAS DE MASTITE BOVINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vitor da Rocha Sperotto

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: **Prof. Dr. César Augusto Marchionatti Avancini.**

PORTO ALEGRE

2010

S749a Sperotto, Vitor da Rocha

Atividade antibacteriana in vitro do decocto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – Asteracea – (“macela”), sobre bactérias isoladas de mastite bovina. / Vitor da Rocha Sperotto. – Porto Alegre: UFRGS, 2010.

56 f. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2010. César Augusto Marchionatti Avancini, Orient.

1. Medicina veterinária preventiva 2. Antimicrobianos naturais
3. *Achyrocline satureioides* I. Avancini, César Augusto Marchionatti, Orient.
II. Título.

CDD 619.4

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Vitor da Rocha Sperotto

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DO DECOCTO DE *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – ASTERACEA – (“macela”), SOBRE BACTÉRIAS ISOLADAS DE MASTITE BOVINA

Aprovada em 22 FEV 2010

APROVADO POR:

Prof. Dr. César Augusto Marchionatti Avancini

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Guiomar Pedro Bergmann

Membro da Comissão

Prof. Dr. Jorge Damián Stumpfs Diaz

Membro da Comissão

Profª. Dr. Verônica Schimidt

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A minha esposa, Rita e aos meus filhos Pedro e Rafael, pelo amor, carinho e pela compreensão nas horas ausentes;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cesar Avancini, pela oportunidade, confiança e ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento do trabalho;

Aos meus pais, Maria de Lourdes e Victor, pelo apoio e incentivo sempre demonstrados.

RESUMO

A *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – ASTERACEA – (“macela”) é uma planta nativa no estado do Rio Grande do Sul/BR, tradicionalmente considerada medicinal para distúrbios do sistema digestivo, tendo estudos evidenciado sua atividade antimicrobiana frente bactérias padrões internacionais. Com os objetivos de verificar a presença de marcador fitoquímico e avaliar a atividade antibacteriana do decocto sobre isolados em situações-problema sanitários em saúde e produção animal, amostra da planta foi colhida de vegetação espontânea e as inflorescências submetidas a cocção por 15 min, repondo-se o volume perdido na evaporação. A técnica de cromatografia analítica em camada delgada (CCD) detectou a presença de quercitina. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de diluição, técnica *pour plate*, em dois tempos de contato (1 h e 24 h), sem neutralizador químico (placa indicando inibição bacteriana) e com neutralizador (placa indicando inativação bacteriana). Inicialmente foram confrontados os padrões *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 11229 em 3 proporções planta : volume, tendo a de 7,5 g : 100 mL demonstrado maior atividade de inativação. Pelo mesmo método, técnica e proporção de maior atividade, confrontou-se o decocto com 26 isolados em leite de vacas com mastite: 14 *S. aureus*, 5 *Streptococcus dysgalactiae*, 1 *Streptococcus uberis*, 3 *Corynebacterium* sp., 1 *E. coli*, 1 *Klebsiella* sp. e 1 *P. aeruginosa*. Sobre as bactérias Gram positivas, com 1 h de contato a leitura das placas evidenciou que 70,83% delas estavam inibidas, tendo sido confirmado que 12,5% delas estavam inativadas; com 24 h de contato 87,5% estavam inibidas e 79,17% inativadas. Sobre as bactérias Gram negativas, em 100 % das vezes as ações de inibição e inativação ocorreram na leitura do tempo de contato de 24 h. Concluiu-se que o indicador fitoquímico flavonóide está presente também na forma decocto, e que esta solução apresenta atividade antimicrobiana tanto sobre amostras padronizadas quanto sobre isolados “de campo”.

Palavras-chave: *Achyrocline satureioides*, antimicrobianos, inibição bacteriana, inativação bacteriana, Medicina Veterinária.

ABSTRACT

The *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC - Asteraceae - ("camomile") is a native plant in the state of Rio Grande do Sul / BR, traditionally considered medicinal for disorders of the digestive system, studies have demonstrated its antimicrobial activity against bacteria standards. Aiming to verify the presence of phytochemical marker and to evaluate the antibacterial activity of the decoction on isolated situations-health problem in animal health and production, the plant sample was collected from weeds and inflorescences subjected to cooking for 15 minutes, replacing them the volume lost to evaporation. The technique of analytical thin layer chromatography (TLC) detected the presence of quercetin. Antimicrobial activity was evaluated by the dilution *pour plate* technique in two contact times (1 h and 24 h) without neutralizing chemical (sign indicating bacterial inhibition) and neutralizing (sign indicating bacterial inactivation). Initially the standards were confronted *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 11229 in 3 proportions plant: volume, with 7.5 g: 100 mL demonstrated higher activity of inactivation. By the same method, technique and proportion of higher activity, confronted the decoction with 26 isolates in milk from cows with mastitis: 14 *S. aureus*, 5 *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* 1, 3 *Corynebacterium* sp., 1 *E. coli*, 1 *Klebsiella* sp. and 1 *P. aeruginosa*. On the Gram positive bacteria, with 1 h contact reading of the plates showed that 70.83% were inhibited, it was confirmed that 12.5% were inactivated, with 24 h of contact 87.5% were inhibited and 79,17% inactivated. On the Gram negative bacteria, in 100% of the time the actions of inhibition and inactivation occurred in reading the contact time of 24 h. It was concluded that the flavonoid phytochemical indicator is also present in the decoction form, and that this solution has antimicrobial activity on both standard sampling as on isolated "field".

Keywords: *Achyrocline satureioides*, antimicrobial, bacterial inactivation, bacterial inhibition, veterinary medicine.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01 -** Atividade antibacteriana do decoto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – ASTERACEA – (“macela”), em três diferentes proporções, usando técnica *pour plate*, sobre bactérias padrões *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*..... 40
- Tabela 02 -** Atividade antibacteriana do decoto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – ASTERACEA – (“macela”), na concentração de 7,5 g : 100 mL, usando técnica *pour plate*, sobre bactérias do gênero *Staphylococcus aureus* (Stapa), padrão e isolados em leite de vacas com mastite..... 41
- Tabela 03 -** Teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA), pela técnica de disco difusão, sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* (Stapa), *Streptococcus dysgalactiae* (Stred) *Streptococcus uberis* (Streu), *Escherichia coli* (Eschc) e *Pseudomonas aeruginosa* (Pseua), isolados em leite de vacas com mastite..... 42
- Tabela 04 -** Atividade antibacteriana do decoto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – ASTERACEA – (“macela”), na concentração de 7,5 g : 100 mL, usando técnica *pour plate*, sobre as bactérias *Streptococcus dysgalactiae* (Stred) *Streptococcus uberis* (Streu) isolados em leite de vacas com mastite..... 43
- Tabela 05 -** Atividade antibacteriana do decoto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – ASTERACEA – (“macela”), na concentração de 7,5 g : 100 mL, usando técnica *pour plate*, sobre as bactérias Gram negativas *Escherichia coli* (Eschc), *Klebsiella* sp. (Klebs) e *Pseudomonas aeruginosa* (Pseua), padrão e isolados em leite de vacas com mastite..... 44

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Considerações Iniciais.....	12
1.2	Problemas de Pesquisa.....	14
1.3	Objetivos.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Mastite.....	15
2.2	Agentes Causadores de Mastite.....	16
2.2.1	Bactérias Gram Positivas.....	17
2.2.1.1	<i>Staphylococcus</i> spp.....	17
2.2.1.2	<i>Streptococcus</i> spp.....	18
2.2.1.3	<i>Corynebacterium</i> spp.....	21
2.2.2	Bactérias Gram Negativas.....	22
2.2.2.1	<i>Escherichia coli</i>	22
2.2.2.2	<i>Klebsiella</i> spp.....	24
2.2.2.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
2.3	Controle de Mastite.....	26
2.4	Plantas Medicinais.....	29
2.5	<i>Achyrocline satureioides</i>.....	31
2.6	Princípio Ativo.....	32

CAPÍTULO II

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Atividade biológica antibacteriana *in vitro* do decocto de *Achyrocline*

<i>satureioides</i> (Lam.) D.C. – Asteracea – (“macela”), sobre bactérias isoladas de mastite bovina.	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

A inflamação da glândula mamária é denominada de mastite e na grande maioria das vezes o agente causador é um microrganismo, sendo que as bactérias são os principais agentes etiológicos (FONSECA e SANTOS, 2000.a). As infecções bacterianas na glândula mamária são consideradas como as principais causas de perdas econômicas na atividade leiteira, tanto para o produtor como para a indústria.

Estimativas informam que os prejuízos econômicos mundiais causados pela mastite atinjam 35 bilhões de dólares por ano, e especificamente nos EUA estariam entre 2 e 4 bilhões de dólares (PEREIRA *et al.*, 2001). 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).

Além do alto custo com tratamentos, existe também o problema com resíduos de antibióticos no leite, caso este não tenha recebido o cuidado adequado pelo produtor em ser descartado durante o tempo de duração do procedimento terapêutico. Tais resíduos podem provocar tanto agravos à saúde dos consumidores quanto tecnológicos para a indústria de laticínios.

Procedimentos adotados na gestão sanitária da mastite infecciosa incluem a prevenção e controle com desinfetantes/antissépticos e o controle com as terapias a base de antibacterianos antibióticos. No entanto, a implantação de programas sanitários, freqüentemente, enfrenta limitações, como as referentes ao custo dos produtos comerciais ou até mesmo possíveis resistências dos agentes causais (CHAPMANN, 1998; O.I.E., 2003) aos grupos químicos biocidas existentes. Também, sistemas tecnológicos de criação animal referenciados nos modelos agroecológico e orgânico demandam insumos veterinários considerados sustentáveis, para que sejam usados em substituição ou em complementaridade aos produtos convencionais.

Entre as alternativas que têm sido propostas para enfrentar tanto a questão de custos, quanto a de possíveis resistências bacterianas e a de insumos adequados para os modelos agropecuários sustentáveis está, entre outros, o uso de plantas medicinais e de fitoterápicos.

As plantas medicinais têm sido usadas por agricultores/criadores tradicionais como recurso no tratamento de doença de animais. McCorkle (1989) comenta que cientistas e especialistas em desenvolvimento internacional estariam percebendo a etnomedicina-veterinária (conhecimento tradicional/popular sobre o tratamento de doenças dos animais) como uma fonte potencialmente valiosa de novas idéias e produtos farmacêuticos com aplicação tanto em países do primeiro mundo como os do terceiro mundo, bem como um fator de manutenção da biodiversidade e como um aprendizado à agricultura sustentável de baixos insumos.

É necessário, contudo, colocar a medicina tradicional em bases científicas. Como consultor da Organização Mundial de Saúde, Akerele (1988) sugere que os países devam fazer um exame crítico das praticas e matéria médica locais, identificar acuradamente as plantas e outras substâncias naturais empregadas, e decidir quais remédios ou práticas são aproveitáveis e suprimir aquelas que são inseguras. É um trabalho enorme. Mas seria fato inegável que no mundo de hoje a medicina com ervas joga um papel vital nos cuidados de saúde humana e animal para enormes faixas da população mundial, especialmente nos países em desenvolvimento.

Com esse sentido, Fernandez *et al.* (2003), Avancini *et al.* (2006) e Tresoldi *et al.* (2006) realizaram ensaios experimentais usando as inflorescências da planta medicinal *Achyrocline satureioides* D.C. – Asteraceae – (“macela”), confrontando o decocto com bactérias padronizadas, evidenciando o seu potencial antibacteriano.

A *A. satureioides* é uma espécie de planta nativa no Rio Grande do Sul distribuída em todo o estado; usada tradicionalmente como medicinal, sua colheita ocorre entre março e abril, época em que os capítulos estão maduros (PEREIRA *et al.*, 2006).

Em função da referida atividade biológica da planta justifica-se a realização de novos estudos *in vitro* para verificação da atividade antibacteriana da *A. satureioides*, agora sobre bactérias de campo que causaram mastite em bovinos leiteiros.

1.2 Problemas de Pesquisa

Foi questionado qual seria a concentração do decocto de *Achyrocline satureioides* com atividade antibacteriana sobre bactérias causadoras de mastite em bovinos leiteiros. Também foi questionado quanto à possibilidade do decocto de *A. satureioides* apresentar ação antibacteriana com a mesma intensidade sobre amostras bacterianas padronizadas e os isolados “de campo”.

1.3 Objetivos

Como objetivo geral, pretende-se gerar novas tecnologias em antimicrobianos para serem usados em procedimentos preventivos e de controle nas doenças infecciosas, como as da glândula mamária de animais de produção.

Como objetivo específico, submeter o decocto da planta *A. satureioides* a testes *in vitro* para avaliar a atividade antibacteriana sobre isolados causadores de mastite bovina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mastite

O termo mastite derivado do grego “mastos”, glândula mamária e do sufixo “ite”, inflamação, caracteriza-se por ser um processo inflamatório da glândula mamária (COSTA, 1998). A reação inflamatória é uma resposta às agressões bacterianas, químicas, térmicas ou mecânicas e caracteriza-se por alterações físico-químicas, celulares e bacteriológicas do leite, além de modificações patológicas do tecido glandular (MAGALHÃES *et al.*, 2006). São inflamações agudas ou crônicas das mamas, sendo mais frequentes nos ruminantes, e neles, os agentes etiológicos são predominantemente bacterianos (CORRÊA e CORRÊA, 1992). Estes agentes são oriundos do ambiente ou do próprio animal (BARBOSA *et al.*, 2007).

A mastite divide-se em dois grupos conforme a sua manifestação: clínica ou sub-clínica (FONSECA e SANTOS, 2000b). Quando na forma clínica, é de fácil diagnóstico e apresenta sinais como edema no úbere, endurecimento das glândulas afetadas, aquecimento do teto infectado, reação ao toque em razão da dor, além da presença de grumos, filamentos, pus e sangue no leite, o qual fica mais aquoso e sofre descoloração. A forma sub-clínica é difícil de ser identificada e não apresenta sintomas visíveis (MAGALHÃES, *et al.*, 2006). Esta forma se destaca por ser a de maior prevalência, ficando responsável por 90 a 95% dos casos da doença (FONSECA e SANTOS, 2000b).

As perdas ao produtor determinadas pela mastite ocorrem tanto pela redução na produção de leite das vacas, quanto pelos gastos com medicamentos, principalmente, antibióticos, na tentativa de controle da doença (BARBOSA, *et al.*, 2007). O custo de um caso clínico de mastite fica em média de US\$ 107 por caso, e deste custo total aproximadamente 85% ocorrem pela diminuição da produção e descarte do leite (FONSECA e SANTOS, 2000a). As perdas na produção de leite atribuídas às mastites sub-clínicas alcançam de 10 a 26% do total da produção, de acordo com grau de intensidade do processo inflamatório, da prevalência da doença, da patogenicidade do agente infeccioso e do estágio de lactação (REIS *et al.*, 2003).

Em um rebanho típico dos Estados Unidos, a diminuição da produção de leite associada à mastite sub-clínica representa de 70% a 80% de todas as perdas econômicas advindas da mastite (COLDEBELLA *et al.*, 2003). Além da diminuição na produção, observa-se perda da qualidade do leite e da função do parênquima glandular, tornando o úbere uma reserva de patógenos. O animal não apresenta alterações visíveis na glândula, porém o leite apresenta alta contagem de células somáticas (CCS). Essas infecções, além de contribuírem com significativas perdas econômicas, podem ser consideradas como um problema sério para a saúde pública (REIS *et al.*, 2003).

Para o produtor, a mastite infecciosa significa menor retorno econômico, em decorrência da redução na produção, dos gastos com medicamentos e também das penalidades aplicadas pelos laticínios. Para a indústria, significam problemas no processamento do leite e redução no rendimento, em razão dos teores inferiores de caseína, gordura e lactose, que resultam em produtos de baixa qualidade e estabilidade (MAGALHÃES *et al.*, 2006).

A ocorrência de mastite pode resultar em perdas de produção não só na lactação atual, mas também na lactação seguinte, comprometendo a produção total do animal. As estimativas das perdas de produção podem variar de 10 a 30% da produção leiteira por lactação (CUNHA *et al.*, 2008). Conforme Langford *et al.*, (2003), existe uma estimativa entre 2 e 55% dos animais em lactação de uma propriedade apresentem mastite, e a maioria dos casos o tratamento é a base de infusões intra-mamárias com antibióticos.

Os prejuízos econômicos causados pela mastite, aliados às questões de saúde pública, tornam a doença, uma das maiores preocupações da Medicina Veterinária por várias razões: epidemiologia abrangente, ser de causa plurietiológica e apresentar controle complexo na dependência dos agentes envolvidos e do meio ambiente no qual os animais são criados (STAMFORD *et al.*, 2006).

2.2. Agentes causadores de Mastite

Infecções bacterianas intra-mamárias são as principais causa de mastite (PULLINGER *et al.*, 2007). Os microrganismos causadores de mastites foram agrupados de acordo com as fontes de infecção e as vias de transmissão, e classificados como contagiosos ou ambientais (MOREIRA *et al.*, 2008). Mastites contagiosas são causadas por bactérias do tipo *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis* e as ambientais ocorrem pelos microrganismos *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Escherichia coli* (CALVINHO *et al.*, 1998; FERREIRA *et al.*, 2006; PULLINGER *et al.*, 2007).

2.2.1. Bactérias Gram Positivas

2.2.1.1. *Staphylococcus* spp.

Os estafilococos são importantes agentes causadores de mastites, destacando se entre eles o *Staphylococcus aureus* (SÁ *et al.*, 2004). Sendo este apontado como o que mais prevalece mundialmente como agente causador de infecções intra-mamárias de fêmeas bovinas em lactação (STAMFORD *et al.*, 2006; NADER FILHO *et al.*, 2007). As taxas de isolamento são variáveis de acordo com diferentes autores, entretanto, o mesmo tem sido considerado como de maior significado nas mastites, sejam clínicas ou subclínicas (SÁ *et al.*, 2004; ZARZOSA *et al.*, 2008).

Ferreira *et al.* (2006) afirmam que a espécie *Staphylococcus aureus* é reconhecida como o patógeno mais freqüentemente isolado em casos de mastite subclínica e relacionado entre os microrganismos mais contagiosos, onde as principais vias de transmissão do agente são os quartos mamários infectados, a pele do úbere e dos tetos, bocais da ordenhadeira e as mãos dos ordenhadores, além destas também podem ser isolados tanto em vacas e novilhas quanto no alimento, na sala de ordenha. Devido a estes motivos, durante a ordenha, destacam a importância do manejo na prevenção da transmissão e disseminação do agente no rebanho.

O *Staphylococcus aureus* é capaz de causar infecções de longa duração, com tendência a se tornarem crônicas, com baixa taxa de cura e grande perda na produção de

leite (ZAFALON *et al.*, 2007). Este tipo de mastite merece importância devido ao risco potencial para transmissão deste patógeno ao homem, pelo leite e derivados (STAMFORD *et al.*, 2006). Algumas cepas de *S. aureus* podem produzir uma grande variedade de toxinas extracelulares e de fatores de virulência, cuja presença no leite e seus derivados podem representar sério problema de saúde pública (NADER FILHO *et al.*, 2007).

Relacionado à saúde pública, um grande problema está na produção de enterotoxinas pelo *S. aureus*, sendo a enterotoxina biótipo A, reconhecida como a principal implicada em casos de toxinfecções alimentares (SÁ *et al.*, 2004). A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída à ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento, representando um risco para a saúde humana. A toxina é termoestável, podendo permanecer no alimento mesmo após o cozimento, favorecendo a ocorrência da intoxicação (STAMFORD *et al.*, 2006). O período de incubação é bastante curto, variando de 15 minutos a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado (NADER FILHO *et al.*, 2007).

Amostras de *S. aureus* enterotoxigênicos têm sido isoladas de leite pasteurizado, iogurte caseiro, leite em pó, achocolatados e sorvetes, bem como de outros subprodutos lácteos. A fonte de contaminação pode ser tanto o leite oriundo de vacas com mastite como os manipuladores envolvidos (SÁ *et al.*, 2004). Enterotoxinas estafilocócicas estão relacionadas a maior frequência de intoxicação de origem bacteriana no homem, e vêm sendo relatadas em vários surtos de doenças transmissíveis por alimentos. Uma mesma cepa de *S. aureus* pode produzir mais de um tipo de toxina, que em quantidades inferiores a 1µg podem desencadear os sintomas de intoxicação, representados, principalmente por vômitos e diarreias (NADER FILHO *et al.*, 2007).

2.2.1.2. *Streptococcus* spp.

Os estreptococos ambientais são capazes de causar mastite bovina, devido a sua capacidade de produzir importantes fatores de virulência como adesão, interiorização e persistência intracelular (PATEL *et al.*, 2009). Medidas higiênicas fazem parte de programas de controle de mastite e visam diminuir a prevalência da doença. Esses

procedimentos, entretanto, não são eficazes contra as infecções intramamárias produzidas por microrganismos das espécies *Streptococcus uberis* e *S. dysgalactiae* (REIS *et al.*, 2003).

Streptococcus uberis é um patógeno ambiental responsável por uma elevada proporção de mastite clínica e sub-clínica em vacas em lactação. Nos Estados Unidos da América, o *S. uberis* é o organismo predominante isolado de glândulas mamárias de vacas multíparas durante o período seco, e representa uma grande proporção de mastites estreptocócicas em novilhas durante o período pós-parto. Infecções intra-mamárias bovina, causadas por *S. uberis*, resultam em mastite clínica ou sub-clínica e pode levar a infecções crônicas que podem persistir ao longo da lactação e até mesmo para lactações múltiplas (PATEL *et al.*, 2009).

Para estabelecer uma infecção intramamária, o *Streptococcus uberis* evoluiu suas estratégias para superar as defesas celulares, solúveis e físicas da glândula mamária de bovinos. Pesquisas mostraram que *S. uberis* é capaz de aderir e interiorizar em células do epitélio mamário de bovinos e que a exploração de vários fatores do hospedeiro aumentou a eficiência destes mecanismos patogênicos (ALMEIDA *et al.*, 2003).

Durante o período pós-parto, a glândula mamária bovina tem uma maior susceptibilidade a novas infecções intra-mamárias por *Streptococcus uberis*. A susceptibilidade da glândula é geralmente baixa na secagem, mas aumenta à medida que avança o período seco e a incidência de mastite clínica peri-parto é geralmente maior em novilhas de primeira lactação do que nos animais mais velhos (LOPEZ-BENAVIDES *et al.*, 2009).

Na Nova Zelândia, o *S. uberis* é o patógeno mais comumente associado com a mastite no final da lactação, período seco e início de lactação. Alguns pesquisadores observaram 8% de novilhas próximas ao parto com mastite e que destas 67% dos casos foram por *S. uberis*. Este patógeno ambiental é comumente isolado no final do teto de vacas leiteiras. O *S. uberis* pode estar presente em número elevado nas pastagens muito usadas. Altas concentrações *S. uberis* no ambiente são encontradas geralmente nos meses mais frios do ano na Nova Zelândia, que coincidem com o período pós-parto para a maioria do gado leiteiro. As maiores concentrações de *S. uberis* em determinados pontos dentro de fazendas, foram associadas com menores condições de radiação solar,

ar e temperatura do solo e maiores teores de umidade do solo (LOPEZ-BENAVIDES *et al.*, 2009).

Nos países onde *Streptococcus agalactiae* foi erradicado, os *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* são os mais importantes patógenos de mastite. O *S. dysgalactiae* é comumente isolado de novilhas e vacas no período seco e é um dos patógenos mais prevalentes isolados em mastites de verão. Em relação às mastites de verão, existe a possibilidade de transmissão por moscas. Cepas de *S. dysgalactiae* causadoras de mastite bovina, já foram isoladas a partir da pele do úbere de bovinos, feridas de pele, vagina, amígdalas de gado, mas o significado a associação desses reservatórios com prevalência de mastite em um rebanho é desconhecida (AARESTRUP e JENSEN, 1996).

Streptococcus dysgalactiae foi definido como patógeno primário da glândula mamária de bovinos e é responsável por cerca de 8% das infecções intramamárias no Reino Unido. Apesar destes dados, pouco se sabe sobre os fatores que afetam a virulência da bactéria para colonização da glândula mamária bovina, apenas a capacidade de ativação de plasmídeo espécie-específico para invasão desta (LEIGH *et al.*, 1998).

Para Hirsh e Zee (2003), o *Streptococcus agalactiae* é o principal agente da mastite estreptocócica, considerando as outras espécies como causas de menor frequência. O *S. agalactiae* é um agente causador de mastites crônicas em bovinos leiteiros, classificado no grupo B conforme Lancefield (QUINN *et al.*, 1994). Brito *et al.* (1998) afirmam que este agente tem como único reservatório a glândula infectada. Podendo ser encontrado em amostras de leite do tanque, indicando que ele está sendo eliminado a partir de quartos mamários.

A infecção inicia pelo canal da teta e prolifera para os dutos lactíferos e alvéolos, provocando inflamação aguda acompanhada de fibrose. As recrudescências sucessivas levam a incapacidade secretora da glândula devido à fibrose. Durante as fases ativas de infecções crônicas a produção de leite é reduzida e este pode apresentar-se anormal e conter grumos. Já na fase aguda, a glândula poderá estar aumentada de volume e quente e o animal apresentar febre e anorexia (HIRSH e ZEE, 2003).

Streptococcus agalactiae foi uma das principais causas de mastite na era pré-antibiótica. Continua a ser uma importante causa de mastite crônica em muitos rebanhos, embora possam ser facilmente eliminados. Procedimentos para o diagnóstico e tratamento das infecções intra-mamárias devido à bactéria estão bem estabelecidos. Como ele pode sobreviver por períodos longos somente dentro da glândula mamária e é suscetível à terapia com penicilina, a erradicação dentro de um rebanho fechado é possível. Rebanhos podem ser mantidos livres de infecção por *S. agalactiae* em condições de campo (KEEFE, 1997).

2.2.1.3. *Corynebacterium* spp.

Corynebacterium bovis é a espécie mais frequentemente isolada de infecções intra-mamárias de bovinos por *Corynebacterium* spp. (WATTS *et al.*, 2000). O *C. bovis* é um habitante normal do canal do teto, sendo comumente isolado de amostras de leite. Devido à baixa patogenicidade é sempre duvidosa a sua capacidade de provocar mastite clínica. O *C. bovis* causa leves infecções persistentes no epitélio do ducto do teto, mas provoca aumento significativo na contagem de leucócitos. Considerado como agente suscetível a desinfetantes utilizados em procedimentos de imersões de tetos (QUINN *et al.*, 1994).

Conforme Watts *et al.* (2000), nos rebanhos em que a anti-sepsia dos tetos não é praticada na pós-ordenha é muito comum *C. bovis* ser isolado de mais de 60% das amostras de leite. No entanto, destacam que estas altas taxas de infecção podem não ser consideradas, devido à colonização do canal teto e posterior contaminação de amostras de leite em vez de verdadeira infecção intra-mamária.

Brito *et al.* (1999), em isolamentos de agentes causadores de mastites de amostras de leite de bovinos na Zona da Mata e Campo das Vertentes, do Estado de Minas Gerais, apontam o *Corynebacterium* sp. como microrganismo mais frequentemente isolado, presente em todos os rebanhos, com porcentagens de quartos mamários infectados que variaram entre 1% e 58,6%. A presença de *C. bovis* nos rebanhos tem sido relacionada com a ausência ou com a ineficiência do processo de desinfecção de tetos após a ordenha.

2.2.2. Bactérias Gram Negativas

2.2.2.1. *Escherichia coli*

Mastites agudas em vacas leiteiras podem ter como agente primário bactérias da espécie *Escherichia coli*, estas sendo classificadas como patógenos ambientais, que podem produzir variado número de sinais clínicos (RANGEL e MARIN, 2009). As infecções ocorrem sob a forma clínica, de maneira hiperaguda ou aguda, nas primeiras semanas pós-parto, caracterizadas pela difícil resolução terapêutica, nos casos com comprometimento sistêmico, e morte ocasional de animais por toxemia (RIBEIRO *et al.*, 2006).

As infecções por *E. coli* na glândula mamária estão relacionadas ao comportamento oportunista do agente, veiculado das fezes dos animais, pela via ascendente, para o canal galactóforo (RIBEIRO *et al.*, 2002). Mastites ambientais causadas por bactérias do grupo dos coliformes, onde a *E. coli* se destaca, vêm aumentando em muitos países e a ocorrência no rebanho acontece em propriedades que apresentam sucesso no controle das mastites do tipo contagiosa (KAIPAINEN *et al.*, 2002), resultando em infecções persistentes na glândula mamária, tanto na lactação quanto no período seco (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Sabe-se que *E. coli* faz parte da microbiota intestinal dos animais, inclusive do homem, e que os ambientes humanos e animais não são separados, razão pela qual as bactérias de origem animal podem passar para os seres humanos. Além disso, os determinantes de resistência às drogas de diferentes fontes podem ser transferidos entre as bactérias (MOREIRA *et al.*, 2008).

Ribeiro *et al.* (2006) citam os principais fatores de virulência, iniciando pelas estruturas da parede conhecidas como endotoxinas, que são constituídas por componentes lipopolissacarídicos (LPS) da estrutura bacteriana, outros fatores são representados por diferentes cito ou exotoxinas (hemolisinas, fator necrosante citotóxico-CNF, verotoxinas-VT, enterotoxinas), assim como propriedades que permitem a multiplicação da bactéria em meios com restrição de ferro (sideróforos), a

multirresistência aos antimicrobianos, ou a colonização celular (pili, adesinas ou fimbrias). Enfatizam também a preocupação que deve haver em função desta pluralidade de fatores de virulência da *E. coli* e com o envolvimento destes mecanismos de virulência, em estirpes isoladas de mastite bovina.

Dentre os fatores de virulência, a produção do chamado fator necrosante citotóxico (CNF) se destaca, este tem sido associado a uma grande variedade de infecções no homem e nos animais. Este fator é subdividido em CNF1 e CNF2, e é considerado importante mecanismo de virulência de *E. coli*. Em geral, a ocorrência de CNF em *E. coli* de origem animal e/ou humana está relacionada à produção de alfa-hemolisina. A presença de *E. coli* produtora de fator de necrosante citotóxico isolada de vaca com mastite alerta para o risco na saúde pública, representado pela transmissão da linhagem necrotoxigênica do agente pelo leite (RIBEIRO *et al.*, 2002).

Ruminantes domésticos, especialmente vacas, são sugeridos por Rangel e Marin (2009) como os principais reservatórios de cepas de *E. coli* produtora Shigatoxina causadora de infecções em humanos. *E. coli* produtoras de Shigatoxina são consideradas os mais importantes patógenos entre um recente grupo emergente de amostras contaminantes de alimentos. Estas linhagens de *E. coli* são causadoras de gastroenterites e também responsabilizadas por colites hemorrágicas ou síndrome urêmica hemorrágica, a maior causa de doença renal aguda em crianças. Para Sandrini *et al.* (2007) a maioria dos surtos de infecções humanas causadas por esta bactéria deve-se ao consumo de carne bovina mal cozida, de leite de vaca não pasteurizado e de águas de abastecimento e recreação contaminadas pelo conteúdo intestinal de animais e afirma ainda, que diversos autores em diferentes países têm isolado sorotipos patogênicos a partir de fezes de bovinos assintomáticos.

As diferentes linhagens de *E. coli* responsáveis principalmente por distúrbios entéricos são agrupadas em seis tipos: enterotoxigênicas, enteroinvasoras, enteropatogênicas, enterohemorrágicas, enteroagregativas e de aderência difusa, subdivididas, fundamentalmente, pela capacidade de produção de determinadas toxinas, de invasão celular ou de manifestação de sintomas clínicos no homem e/ou nos animais. *E. coli* enteroemorrágica sorotipo O157:H7 tem emergido como causa de graves manifestações clínicas de colite hemorrágica, trombocitopenia e distúrbios renais no homem, freqüentemente fatais em crianças (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Também deve ser ressaltada a capacidade de multiplicação em meio com restrição de ferro (aerobactina) e produção de alfa-hemolisina, postulando o risco de infecção cruzada entre linhagens de *E. coli* de origem animal e humana, especialmente para pessoas que residem em propriedades rurais. Alguns achados apontam que linhagens de *E. coli* produtoras de fator necrosante citotóxico, hemolisinas e sideróforos deteriam mecanismos adicionais de patogenicidade na glândula mamária e estariam ligadas a casos severos de mastite clínica, com tendência à evolução hiperaguda e ocasionalmente fatal (RIBEIRO *et al.*, 2002).

2.2.2.2. *Klebsiella* spp.

Klebsiella pneumoniae é a espécie mais comum do gênero bacteriano *Klebsiella* a infectar animais e é também a espécie mais comum a causar mastite em bovinos leiteiros (MUNOZ *et al.*, 2007). *Escherichia coli*, várias espécies de *Enterobacter* e *Klebsiella pneumoniae* constituem os patógenos implicados nas mastites por coliformes (BANNERMAN *et al.*, 2004). Nas mastites por *K. pneumoniae* as perdas são maiores quando comparadas as perdas devido às mastites por *E. coli*, em termos de produção de leite e sobrevivência. Infecções por *K. pneumoniae* são menos propensas a responder a tratamento e duram muito mais tempo do que infecções por *E. coli* (MUNOZ *et al.*, 2007).

Vacas convalescentes de mastite por *K. pneumoniae* desenvolvem prognóstico desfavorável ou perdem a capacidade de produção de leite (KIKUCHI *et al.*, 1995). Para Guerreiro *et al.* (1984), as mastites causadas por este agente são consideradas como um quadro grave, muito difícil de tratar e muitas vezes ocorre a morte do animal. As glândulas mamárias de vacas que morreram devido à mastite por *K. pneumoniae* mostram sinais de inflamação maciça e generalizada necrose do tecido (BANNERMAN *et al.*, 2004).

No norte dos Estados Unidos a *Klebsiella pneumoniae* foi relatada por Munoz *et al.* (2007), como sendo um importante causador de mastite clínica, onde os resultados das infecções resultaram em altas perdas e mortalidade dos animais afetados. Terapias antimicrobianas e vacinação foram relatadas como de efeitos limitados contra *K.*

pneumoniae em casos de mastite clínica. A redução de exposição de vacas para *K. pneumoniae* tem sido o fator principal no controle de mastite, por este agente, em fazendas leiteiras americanas.

2.2.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são encontradas amplamente distribuídas na natureza e poucas espécies são consideradas patogênicas para animais. A espécie *P. aeruginosa* é considerada uma das mais importantes, classificada como bactéria patogênica oportunista podendo ser encontrada em casos de mastites em vacas (GUERREIRO *et al.*, 1984). A mastite bovina por *Pseudomonas* spp. está intimamente relacionada à água contaminada utilizada na lavagem dos tetos, dos insufladores (teteiras), da canalização do equipamento de ordenha, do conteúdo reutilizável de pré ou pós-dipping, ou mesmo em cânulas contaminadas durante a terapia intra-mamária (FERNANDES *et al.*, 2009).

As infecções na glândula mamária causadas por *P. aeruginosa* podem ter uma patogênese similar às mastites por coliformes, podendo ocorrer grave endotoxemia. A infecção pode resultar em uma mastite sub-clínica com o patógeno persistente na glândula mamária (QUINN *et al.*, 1994). A mastite por este agente é considerada incomum. Entretanto, já foram descritos surtos de mastite com manifestações clínicas graves, hiper-agudas, nas primeiras semanas pós-parto. A glândula mamária apresenta-se hiperêmica, edemaciada e sensível à palpação. O leite revela a presença de grumos, pus e mostra-se amarelado a escurecido (FERNANDES *et al.*, 2009).

É considerada uma bactéria de difícil controle depois de estabelecida em determinados ambientes, devido a sua grande capacidade de resistência a maioria dos desinfetantes comuns e também muito resistente a antibióticos (GUERREIRO *et al.*, 1984). Classicamente, apresenta multirresistência aos principais grupamentos de antimicrobianos convencionais, devido a mutações que determinam linhagens resistentes às drogas derivadas do anel β -lactâmico e fluorquinolonas (FERNANDES *et al.*, 2009).

2.3. Controle da Mastite

Apesar das estratégias de controle extensivo, a mastite bovina continua sendo um grande problema, onde a causa mais comum são patógenos ambientais e contagiosos. Onde os patógenos contagiosos podem ser mantidos sob controle através da prevenção da propagação de bactérias na ordenha e pelo tratamento com antibióticos. No entanto, hoje o uso de antibióticos na produção de alimentos é questionado e outros meios para prevenir a infecção são desejáveis (JACOBSSON, 2003).

Antibióticos ou antibacterianos são os produtos mais utilizados em pecuária. Os antibióticos trouxeram inicialmente grandes resultados terapêuticos, porém revelaram também limitações como a alteração da biocenose microbiana, a crescente resistência e os inúmeros efeitos colaterais aos hospedeiros tratados, tanto pela atuação direta destes fármacos, quanto pela sua acumulação em alimentos de origem animal ou no próprio ambiente (SOUZA e WIEST, 2007).

Moreira *et al.* (2008) relatam a observação de aumento considerável do número de bactérias resistentes aos antimicrobianos, inclusive resistentes a mais de um, simultaneamente. Para Freitas *et al.* (2002), embora o desenvolvimento da resistência seja um fenômeno espontâneo, as drogas atuam como agentes seletores de amostras resistentes. Pacientes com o sistema imune comprometido contribuem para a disseminação destas linhagens.

Os mecanismos de resistência bacteriana são complexos e numerosos, podendo ocorrer resistência por meio de mutações ou transferências horizontais de genes, que codificam bombas de efluxo, enzimas degradativas e modificadoras e proteínas de proteção ribossomal. Os genes envolvidos na resistência aos antimicrobianos localizam-se no cromossomo e em elementos móveis, como plasmídeos e transposons. A localização desses genes em elementos móveis facilita sua transferência entre as bactérias, mesmo de espécies diferentes (MOREIRA *et al.*, 2008).

Para Reis *et al.* (2003), os programas de controle de mastite visam diminuir a prevalência da doença a níveis aceitáveis, uma vez que sua erradicação não é viável. Medidas higiênicas e redução da duração de infecções intra-mamárias estão entre as

medidas recomendadas, como componentes para programas de controle de mastites produzidas pela maioria dos microrganismos.

Alguns fatores foram apontados por Souza *et al.* (2005) como procedimentos redutores de contagem de células somáticas no leite. Estes seriam a troca de matéria orgânica por areia na cama de vacas em lactação, boas condições higiênicas do estábulo, tratamento à secagem, tratamento imediato dos casos clínicos com antimicrobianos, descarte de animais-problema, segregação de animais infectados no momento da ordenha, bem como a utilização de unidades de ordenha específicas para esses animais e imersão dos tetos em solução desinfetante após a ordenha.

Para Amaral *et al.* (2004), a higienização dos tetos, além de prevenir a mastite tem papel importante na qualidade microbiológica do leite e destaca, também, que a higienização das mãos do ordenhador e do local de ordenha é de grande importância para reduzir o número de microrganismos patogênicos no leite, servindo para melhorar as condições higiênicas do mesmo.

Programas sanitários de prevenção e controle da mastite bacteriana têm como objetivos, estabelecer barreiras para impedir a sua ocorrência ou transmissão dos agentes causais, a hospedeiros suscetíveis sadios. Para tanto, entre os procedimentos adotados estão ações sobre os agentes causais transmissíveis ao nível das fontes de infecção e reservatórios existentes no ambiente onde os animais são manejados. Os procedimentos com essas características são denominados como desinfecção e antisepsia, e servem como recursos para eliminar ou diminuir as doses infectantes de microrganismos, quando em vida livre (AVANCINI e WIEST, 2008).

Desinfecção é conceituada como sendo o controle ou a eliminação dirigida, de microrganismos considerados indesejáveis em situações-problema específicas, pela atuação em sua estrutura ou em seu metabolismo, independente de seu estado funcional, visando a prejudicar a transmissão desses microrganismos e/ou reduzir a sua dose infectante (GUERREIRO *et al.*, 1984). A ação do agente desinfetante ocorre em superfícies inanimadas e do agente antisséptico em superfícies de tecidos vivos (BOROWSKY *et al.*, 2006).

A falência das terapias vigentes tem motivado a pesquisa de novas drogas para combate de microrganismos resistentes (FREITAS *et al.*, 2002). A pesquisa de fatores

de proteção antibacteriana entre recursos naturais renováveis como as plantas com indicativo medicinal, condimentar ou aromático, se justifica na epidemiologia e na profilaxia de doenças transmissíveis, constituindo prioridade segundo a orientação da Organização Mundial da Saúde/Conferências Mundiais de Saúde, com ênfase aos aspectos culturais tradicionais envolvidos e sua relação com a sustentabilidade e a atenção básica em saúde (WIEST *et al.*, 2009).

O descobrimento das propriedades curativas das plantas foi no início meramente intuitivo ou, pela observação dos animais quando doentes que buscavam nas ervas a cura para as suas afecções. No Brasil, desde a chegada dos portugueses, no começo do século XVI, já era observado o uso de propriedades medicinais das plantas brasileiras, como o urucum para pintar e proteger o corpo de alguns povos indígenas, das picadas dos insetos. O grande território nacional abriga uma enorme quantidade de plantas nativas que nascem espontaneamente do Amazonas até o Rio Grande do Sul, que poderiam servir de base para a alimentação, medicamentos, cosméticos e temperos de nossa população e ainda ser exportada (MARINHO *et al.*, 2007).

Conforme Avancini *et al.* (2000), o Brasil integra um grupo de países que pactuaram convenções com atenção primária em saúde, firmada na Conferência da Organização Mundial de Saúde (OMS) em Alma-Ata, no ano de 1978 e na de Chiang-Mai, em 1988, reafirmadas na Conferência Mundial de Saúde de 1997. Essas convenções internacionais justificam e fundamentam as proposições do uso alternativo de plantas medicinais, como substitutos ou complementares ao uso desinfetantes e anti-sépticos químicos-convencionais.

O Brasil possui 3,57 milhões de quilômetros quadrados de florestas tropicais, é a nação mais rica do mundo em biodiversidade, são descritas a existência de 55 mil espécies vegetais, representando 22% do total registrado no planeta (VASCONCELOS, 2005). Em função deste grande potencial de matéria prima vegetal para composição de produtos terapêuticos, o país não possuía instruções claras para produção destes. Somente após várias décadas, desde a Portaria n.º 22, de 30 de outubro de 1967, do Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia (extinto em 1976), foram detalhadas as normativas técnicas para identificação botânica, manipulação, produção, registro e comercialização de medicamentos originados de plantas através da RDC

(Resolução da Diretoria Colegiada) – ANVISA, nº 48 de 16 de maio de 2004, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 1967; BRASIL, 2004).

2.4. Plantas Medicinais

As plantas medicinais representaram durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. No início do século XIV, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (MOTA, 2008).

No Brasil, diferentes tradições terapêuticas contribuíram para a formação da medicina popular. Além da assimilação dos conhecimentos indígenas, as colaborações trazidas pelos escravos e imigrantes representaram papel importante para o surgimento de uma medicina popular rica e original, na qual a utilização de plantas medicinais ocupa lugar de destaque (BALDAUF *et al.*, 2009).

Muitas comunidades tradicionais possuem uma ampla farmacopéia natural e o interesse acadêmico pelo conhecimento que estas têm sobre as plantas medicinais, aumentou após a constatação de que este saber, desenvolvido ao longo dos séculos, pode ter uma comprovação científica, habilitando a extensão do seu uso pela sociedade industrializada. A exploração de recursos naturais por estes povos tradicionais, pode fornecer subsídios para estratégias de manejos sustentáveis em longo prazo (SOUZA e WIEST, 2007).

Para Vasconcellos *et al.* (2002), deve haver um cuidado ético no estudo científico sobre plantas medicinais. Ressalta que, na busca de novos “princípios ativos”, esta pode se inserir dentro de uma lógica apropriacionista, onde a “novidade absoluta” seria utilizada como requisito para garantia do direito de propriedade intelectual. Muitas vezes marginalizando ou até mesmo negando os conhecimentos etnobotânicos, principalmente das populações indígenas e tradicionais.

Baldauf *et al.* (2009) falam sobre a diminuição do número de espécies empregadas para tratamento das enfermidades, isto, devido as perdas de conhecimento tradicional associado à biodiversidade brasileira. Entre os fatores relacionados à perda

do conhecimento sobre plantas medicinais no Brasil, encontram-se a redução das áreas naturais e a desvalorização dos saberes tradicionais pelas novas gerações, associados a crescente acesso à medicina convencional. Desta forma, torna-se importante a realização de registros do conhecimento tradicional, antes que as espécies e o conhecimento associado a elas sejam eliminados.

Mota (2008) destaca que deve haver prioridade aos estudos de investigação química e farmacologicamente de espécies vegetais em certas regiões brasileiras devido ao extermínio destas. Exemplo dado ocorre no cerrado, onde cerca de 700 a 750 espécies medicinais estão em risco declarado de extinção. Vários investigadores têm feito importantes revisões sobre o uso medicinal e efeitos tóxicos de plantas por populações não ocidentalizadas. Relata também que aproximadamente 80 a 85% da população mundial ainda utiliza medicamentos a base de plantas.

Atualmente, grande parte da população brasileira encontra nas plantas medicinais importantes fontes de recurso terapêutico. Isso se deve a vários fatores, dentre os quais é possível destacar a crise econômica e o alto custo dos medicamentos industrializados, bem como, o difícil acesso da população à assistência médica. Aliada a essa situação verifica-se crescente tendência dos consumidores de utilizar “produtos naturais” e ainda o fato de muitas pessoas se renderem à facilidade de obtenção de plantas medicinais, as quais muitas vezes são cultivadas nos quintais de suas casas (BALDAUF *et al.*, 2009).

O desenvolvimento galênico de fitoterápicos visa à obtenção de formas farmacêuticas onde o potencial químico e terapêutico do vegetal deve ser preservado e valorizado (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Muitos projetos desenvolvidos para verificação de extratos vegetais são utilizados em sistemas tradicionais/populares de saúde possuem viabilidade de uso, cientificamente assegurada, ecológica, econômica e socialmente sustentáveis como desinfetante ou antisséptico para aplicação em saúde pública e animal, substituindo ou complementando os produtos convencionais (AVANCINI e WIEST, 2008b).

Conforme Mota (2008), atualmente apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e 120 compostos de origem natural, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizados na terapia moderna.

Destaca também que produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todas as novas drogas.

A utilização de plantas medicinais busca ampliar os recursos tecnológicos nacionais/locais no setor de desinfetantes e anti-sépticos biológicos, contornando possíveis efeitos negativos que algumas substâncias químicas sintéticas possam ter sobre o usuário, o hospedeiro/susceptível, o ambiente, a resistência de agentes causais, além da redução de custos das práticas de higiene (AVANCINI *et al.*, 2000).

2.5. *Achyrocline satureioides*

Achyrocline satureioides é popularmente conhecida como “macela” tem sido usada na medicina natural por muitos anos na Argentina, Uruguai, Brasil e Paraguai (RIVERA *et al.*, 2004). Seu centro de origem é a América Intertropical, ocorrendo naturalmente em todo o Brasil. É uma espécie de planta medicinal nativa do estado do Rio Grande do Sul, onde é também conhecida popularmente por marcela ou marcela-da-terra (PEREIRA *et al.*, 2006). É uma erva anual da família Asteraceae, possui ramificações de até 1,5 m de altura coberta de pilosidades brancas. As folhas são alternas, inteiras, sésseis lineares, lanceoladas de até 12 cm de comprimento por 1,8 cm de largura. Possui inflorescências do tipo capítulos em dois tipos de flores, reunidas em panículas corimbosas. As flores são amarelo-dourado, as centrais hermafroditas, em número de uma a duas, e as flores marginais são quatro ou cinco. O fruto é do tipo aquênio, glabro e pardo (FACHINETTO *et al.*, 2007).

Existem muitos relatos sobre atividade do seu extrato aquoso, de sua parte aérea sendo usado como colerético, hepatoprotetor, antiespasmódico e contra a impotência masculina. Outras investigações relataram ação sedativo antiinflamatório, analgésico, imunoestimulante, antiviral, antibacteriana e propriedades antioxidantes. Análises fitoquímica mostraram a presença de flavonóides, cumarinas, óleo essencial, terpenos, sesquiterpenos e monoterpenos, bem como dois polissacarídeos pécnicos com atividade imunológica e, recentemente, um novo composto, aquirofurano, com atividade hipoglicemiante. A alta quantidade de flavonóides presentes nos extratos polares desta

planta tem sido considerada responsável por muitos dos relatos de atividade biológica (HNATYSZYN *et al.*, 2004).

Muitos estudos mostram que preparações aquosas ou hidroalcólicas de macela, tem sido utilizadas na América do Sul principalmente pelos seus efeitos antiespasmódico, antiinflamatório e atividades analgésicas no tratamento de problemas gastrointestinais. Estas aplicações tradicionais tem recebido muitas investigações científicas, estas atribuídas a propriedades presentes como flavonóides e terpenos (LEMOS *et al.*, 2000).

2.6. Princípio Ativo

O conhecimento de plantas medicinais e suas propriedades terapêuticas vêm sendo acumulados durante séculos, contribuindo para a seleção e incorporação de espécies vegetais como plantas medicinais eficazes e direcionando os estudos detalhados para a obtenção de novos medicamentos. Ao longo das últimas décadas, tem-se comprovado que as plantas produzem substâncias químicas com propriedades antimicrobianas, como cumarinas, flavonóides, terpenóides, alcalóides, taninos, entre outros, os quais encontram-se distribuídos nas diferentes partes das plantas (RESCHKE *et al.*, 2007).

Os flavonóides são a maior parte do grupo dos polifenóis fitoquímicos ubíquos, podem ser encontrados em frutas, vegetais, flores, chás e vinhos. Estes compostos podem prevenir injurias oxidativas em vários caminhos, além de capturarem radicais livres, podem quelar íons metais e inibir a atividade de várias enzimas incluindo lipoxigenase, ciclooxigenase, xantina-oxidase, fosfolipase A2 e proteína quinase (ARREDONDO *et al.*, 2004). Os flavonóides vêm sendo estudados com muita frequência devido a variedade de efeitos farmacológicos, podendo citar: ação antiinflamatória, antimicrobiana, antiúlceras, antimalárica, inseticida e antioxidante (WADT *et al.*, 1998).

A alta concentração de flavonóides presentes na *Achyrocline satureioides* tem sido considerada responsável pela atividade biológica relatada sobre a planta

(KADARIAN *et al.*, 2004). Diversos trabalhos sobre a composição química da marcela têm indicado quercitina, 3-O-methylquercetin e luteolina, como os principais flavonóides constituintes. Também foram confirmadas através de estudos fitoquímicos as presenças de ácidos cafeícos, ácidos clorogênicos e isoclorogênicos, coumarins, terpenos e óleos essenciais (POLYDORO *et al.*, 2004).

As substâncias antibióticas nas plantas são detectadas pela observação do crescimento de microrganismos colocados em contato com tecidos ou extratos destas plantas. Para detectar estas substâncias são usados vários métodos, que se diferenciam na sensibilidade ou em seus princípios. Os resultados obtidos serão influenciados pelo método escolhido, assim como pelos microrganismos usados nos testes. A parte da planta utilizada também interfere nos resultados bem como a forma de uso: suco, extrato (extração por água ou outros solventes) ou óleo essencial (SOUZA *et al.*, 2000).

Oliveira *et al* (2001) e Sonaglio *et al.* (1986) afirmam que os constituintes fitoquímicos dos extratos da planta medicinal *Achyrocline satureioides* apresentam propriedades biológicas antibacterianas. Avancini *et al.* (2006) comprovaram, em estudo *in vitro* realizado com decocto da planta, que esta apresenta atividade biológica bacteriostática e bactericida contra amostras bacterianas Gram positivas padronizadas.

Rivera *et al.* (2004) demonstraram que o extrato aquoso da marcela utilizado na tradicional forma de administração oral, não apresenta risco tóxico algum.

CAPÍTULO II

**Atividade antibacteriana *in vitro* do decocto de *Achyrocline satureioides* (Lam.)
D.C. – Asteracea – (“macela”), sobre bactérias isoladas de mastite bovina**

***In vitro* antibacterial activity of the decocto of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C.
- Asteracea - (“macela”), on bacteria isolated from bovine mastitis**

Vitor da Rocha Sperotto^I; Anelise Levay Murari^{II}; Décio Adair Rebellatto da Silva^I,
Cecília Gabriela Rubert Possenti^{III}; José Maria Wiest^{IV}; Cesar Augusto Marchionatti
Avancini^{IV}

^ICurso de Medicina Veterinária / Universidade de Cruz Alta. Rua Andrade Neves, 308,
Cep 98025-810, Cruz Alta, RS, Brasil. Email: vitorsperotto@gmail.com; ^{II}
Departamento de Farmácia Industrial/ Universidade Federal de Santa Maria, Santa
Maria, RS, Brasil; ^I Curso de Medicina Veterinária / Universidade de Cruz Alta, Cruz
Alta, RS, Brasil; ^{III} Curso de Biologia / Universidade de Cruz Alta, Cruz Alta, RS,
Brasil; ^{IV} Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias / Faculdade de Veterinária / Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO

A *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – Asteracea – (“macela”) é uma planta nativa no estado do Rio Grande do Sul/BR, tradicionalmente considerada medicinal, tendo estudos evidenciado sua atividade antibacteriana frente organismos padrões internacionais. Com os objetivos de verificar a presença de flavonóides e de avaliar a atividade antibacteriana do decocto da planta sobre bactérias isoladas em situações-problema sanitários em saúde e produção animal, amostra foi colhida de vegetação espontânea e as inflorescências submetidas a cocção por 15 min, repondo-se o volume perdido na evaporação. A técnica de investigação de marcador fitoquímico foi o de cromatografia analítica em camada delgada (CCD). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de diluição, técnica *pour plate*, em dois tempos de contato (1 h e 24 h), sem neutralizador químico (placa indicando inibição bacteriana) e com neutralizador (placa indicando inativação bacteriana). Inicialmente foram confrontados os padrões *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 11229 em 3 proporções planta : volume, tendo a de 7,5 g : 100 mL demonstrado maior atividade de inativação. Pelo mesmo método, técnica e proporção de maior atividade, confrontou-se o decocto com

26 isolados em leite de vacas com mastite: 14 *S. aureus*, 5 *Streptococcus dysgalactiae*, 1 *Streptococcus uberis*, 3 *Corynebacterium* sp., 1 *E. coli*, 1 *Klebsiella* sp. e 1 *P. aeruginosa*. Sobre as bactérias Gram positivas, com 1 h de contato a leitura das placas evidenciou que 70,83% delas estavam inibidas, tendo sido confirmado que 12,5% delas estavam inativadas; com 24 h de contato 87,5% estavam inibidas e 79,17% inativadas. Sobre as bactérias Gram negativas, em 100 % das vezes as ações de inibição e inativação ocorreram na leitura do tempo de contato de 24 h. Concluiu-se que o flavonóide quercetina está presente na forma decocto, e que esta solução apresenta atividade antimicrobiana tanto sobre amostras bacterianas padronizadas quanto sobre isolados “de campo”.

Palavras-chave: plantas medicinais : Medicina Veterinária, antimicrobianos, inibição bacteriana, inativação bacteriana; *Achyrocline satureioides*

ABSTRACT

The *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC - Asteraceae - ("macela") is a native plant in the state of Rio Grande do Sul / BR, traditionally considered medicinal, studies having shown their antibacterial activity against international standards. Aiming to verify the presence of phytochemical marker and to evaluate the antibacterial activity of the decocto on bacteria isolated situations-health problem in animal health and production, the plant sample was collected from weeds and inflorescences subjected to cooking for 15 minutes, replacing them the volume lost to evaporation. The technique of analytical thin layer chromatography (TLC) detected the presence of quercetin. Antimicrobial activity was evaluated by the dilution *pour plate* technique in two contact times (1 h and 24 h) without neutralizing chemical (sign indicating bacterial inhibition) and neutralizing (sign indicating bacterial inactivation). Initially the standards were confronted *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 11229 in 3 proportions plant: volume, with 7.5 g : 100 mL demonstrated higher activity of inactivation. By the same method, technique and proportion of higher activity, confronted the decocto with 26 isolates in milk from cows with mastitis: 14 *S. aureus*, 5 *Streptococcus dysgalactiae*, 1 *Streptococcus uberis*, 3 *Corynebacterium* sp., 1 *E. coli*, 1 *Klebsiella* sp. and 1 *P. aeruginosa*. On the Gram positive bacteria, with 1 h contact reading of the plates showed that 70.83% were inhibited, it was confirmed that 12.5% were inactivated, with 24 h of contact 87.5% were inhibited and 79,17% inactivated. On the Gram negative bacteria, in 100% of the time the actions of inhibition and inactivation occurred in

reading the contact time of 24 h. It was concluded that the flavonoid quercetin is present in the decoction form, and that this solution has antimicrobial activity on both standard sampling as on isolated "field".

Keywords: medicinal plants : Veterinary Medicine, antimicrobial, bacterial inactivation, bacterial inhibition, *Achyrocline satureioides*.

INTRODUÇÃO

A mastite é fator de prejuízos financeiros para a indústria de laticínios, sendo considerada economicamente a doença mais importante do gado leiteiro (RANGEL & MARIN, 2009). O desenvolvimento de bactérias no interior da glândula mamária é a causa mais comum desta enfermidade em bovinos (PEREIRA et al., 2001), provoca redução na produção de leite e gastos com medicamentos, principalmente antibióticos (BARBOSA et al., 2007). A observação de aumento considerável no número de organismos resistentes aos antimicrobianos agrava o problema sanitário dessa enfermidade (MOREIRA et al., 2008), o que tem motivado pesquisa de novas drogas para seu controle (FREITAS et al., 2002).

Tendo como finalidade descobrir soluções antimicrobianas, projetos de pesquisa têm sido desenvolvidos para verificar se extratos vegetais utilizados em sistemas tradicionais/populares de saúde possuem viabilidade de uso, cientificamente assegurada, ecológica, econômica e socialmente sustentável para aplicação em saúde pública e animal, com a possibilidade de complementar ou até substituir produtos/insumos químicos convencionais (AVANCINI & WIEST, 2008). Com esse sentido, FERNANDEZ et al. (2003), AVANCINI et al. (2006) e TRESOLDI et al. (2006) realizaram ensaios experimentais usando as inflorescências da planta *Achyrocline satureioides*, confrontando o decocto com bactérias padronizadas, evidenciando o seu potencial antibacteriano.

A *Achyrocline satureioides* é uma espécie de planta considerada medicinal, nativa no estado do Rio Grande do Sul, ocorrendo naturalmente em todo o Brasil. Sua origem é a América intertropical (PEREIRA et al., 2006), sendo que em nosso meio social é popularmente conhecida como “marcela” ou “macela”. Relatos de atividades biológicas da planta estão relacionados à concentração de flavonóides presentes em seus extratos (HNATYSZYN et al., 2004; KADARIAN et al., 2004).

Os objetivos do presente estudo foram o de verificar a presença de marcador fitoquímico bioativo e avaliar a ação antibacteriana “*in vitro*” do decocto de *A.*

satureioides, contra bactérias padrões e isolados de situações-problema sanitários causadores de mastite bovina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. foram obtidas de um único local, em duas coletas entre março e abril de 2008, no município de Cruz Alta-RS/BR (28° 38 '19" S - 53° 36' 23" O). Foram secas em estufa com temperatura constante de 35°C, e exsicata da planta foi depositada, sob o número ICN 161.026, no Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A obtenção da forma decocto deu-se pela cocção (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988) das inflorescências da planta em frasco Erlenmeyer, em fogo brando, por 15 minutos, com posterior reposição do volume evaporado. As proporções avaliadas foram de 5 g, 6,5 g e 7,5 g das inflorescências para um volume de 100mL de água destilada estéril. O controle de esterilidade da solução foi realizado colocando alíquota de 1 mL em 5 mL de caldo Mueller Hinton (Mueller-Hinton Broth, Micromed[®]), mantido cinco dias em estufa bacteriológica.

Análise fitoquímica (proporção de 7,5 g : 100 mL), para verificação da presença de flavonóides, foi realizada submetendo o decocto à hidrólise ácida com ácido clorídrico concentrado. A técnica utilizada foi a cromatografia analítica em camada delgada (CCD) utilizando cromatofolhas com gel de sílica GF₂₅₆ Merck[®], de espessura de 0,2 mm, com suporte de alumínio 20 x 20 cm. A análise da CCD foi realizada em cuba saturada, com migração ascendente. A fase móvel utilizada foi acetato de etila : ácido fórmico : água (6:1:1).

Foram usadas duas amostras bacterianas padrão, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 11229, e 26 isoladas em leite de vacas com mastite, assim identificadas por gênero e espécie: 14 *Staphylococcus aureus* (Stapa), 5 *Streptococcus dysgalactiae* (Stred), 1 *Streptococcus uberis* (Streu), 3 *Corynebacterium* sp. (Cory), 1 *Escherichia coli* (Esch), 1 *Klebsiella* sp. (Klebs) e 1 *Pseudomonas aeruginosa* (Pseua). Os isolados foram mantidos liofilizados, e para o experimento foram reativados com água destilada estéril e submetidos a três passagens consecutivas em caldo Mueller-Hinton (Mueller-Hinton Broth, Micromed[®]) em estufa bacteriológica durante 24 horas a 37°C.

A determinação da dose infectante inicial de cada uma das bactérias foi feita por diluições logarítmicas seriais. As diluições foram semeadas em profundidade

(FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988) pela técnica de *pour plate* em agar Mueller-Hinton (Mueller-Hinton agar, Merck®), procedendo-se a contagem nas placas que apresentaram até 300 UFC/mL.

A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de diluição, técnica *pour plate* (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988), colocando em placa de Petry volumes de 1 mL do decocto, 1 mL do inóculo em crescimento por 24 horas, e após os tempos de contato pré-estabelecidos, \pm 30 mL do meio de cultura sólido Mueller Hinton era acrescido. Foram considerados os seguintes fatores: proporção planta : volume; tempos de contato decocto *vs.* bactéria de 1 hora e 24 horas; tratamento 1 - meio de cultura Mueller Hinton; tratamento 2 – meio de cultura Mueller Hinton com neutralizante [3% de Polissorbato (Tween 80) mais 0,3% Lecitina de soja]. Todos os experimentos foram realizados em duplicata., Usou-se o grupo químico digluconato de clorhexidina, na concentração de 1%, como referência de atividade antimicrobiana .

Para parâmetro de crescimento bacteriano foram usadas placas contendo unicamente alíquota bacteriana, água destilada estéril e meio de cultura, obtendo como referência a dose infectante no período de 1 hora de contato e dose infectante no período de 24 hs. de contato.

Na leitura das placas do tratamento 1 teve-se expressa a capacidade de inibição do decocto sobre as bactérias, e no tratamento 2 a capacidade de inativação do decocto sobre as bactérias.

A análise estatística, não tendo sido confirmada a homogeneidade de variância (Teste de Levene) nem a normalidade de resíduos (Teste Kolormov-Smirnov), a consultoria estatística (NAE – Núcleo de Apoio Estatístico/Instituto de Matemática/UFRGS) optou por utilizar a análise de variância não paramétrica (Teste de Ktruskall- Wallis).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detectou-se, uma vez encontrada substância com o mesmo fator de retenção (Rf) e coloração semelhante, a quercitina pela aspensão do revelador ácido oxalo-bórico, seguida de tratamento térmico (120 °C por 15 minutos). A visualização da CCD foi realizada sob luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 254 nm.

Trabalhos sobre a composição química da *A. satureioides* têm indicado a presença da quercitina entre os principais flavonóides constituintes (POLYDORO et al,

2004), sendo à esse grupo químico atribuído a responsabilidade pelas atividades biológicas relatadas sobre a planta (KADARIAN et al, 2004).

Na Tabela 01 pode ser observado o resultado da confrontação do decocto, em diferentes proporções planta : volume, sobre as amostras bacterianas padrões. Percebe-se que nas três proporções do decocto frente ao *S. aureus*, não houve diferença na intensidade de ação, promovendo inibição nos dois tempos de contato e a inativação na leitura das 24 horas de contato.

FERNANDEZ (2003), TRESOLDI (2006) e AVANCINI (2008), usando delineamento de pesquisa com concentração fixa do decocto (5 g : 100 mL) sobre diferentes doses infectantes desafios de inóculos (10^7 a 10^1 UFC/mL), também encontraram atividade de inativação do decocto de *A. saturoioides* sobre a mesma amostra de *S. aureus* padronizada.

A ação do decocto sobre a *E. coli* ocorreu na maior proporção da planta, verificando-se inibição e inativação nas 24 horas de contato. Se bem que usando técnica de avaliação diferente, MOTTA (2007) não observou atividade sobre esse inóculo.

Tendo-se utilizado esses resultados como um dos critérios de escolha da massa da planta para o restante do experimento, outro fator determinante para a escolha da proporção planta : volume foi o fato de que não se conseguiu ultrapassar satisfatoriamente a proporção de 7,5 g : 100 mL, porque o volume da planta dificultava a sua imersão no volume de água, prejudicando a decocção.

Para aumentar a chance de obter resultados confiáveis sobre o tipo de ação antibacteriana, no meio de cultura do tratamento 2 foram acrescentados neutralizantes. Esse procedimento teve a finalidade de evitar observações falsos negativas, expressas pela possível ação somente bacteriostática, confundindo com ação bactericida, do decocto. Os neutralizantes têm a função de inativar resíduos da substância antimicrobiana, após a exposição do inóculo. São frequentemente usados em testes de verificação de eficácia de desinfetantes, e os elementos químicos neutralizantes são usados conforme o grupo químico antimicrobiano. Como não é conhecido o neutralizante específico para os compostos químicos ativos presentes no decocto de *A. saturoioides*, adotou-se o *pool* neutralizante REYBROUCK (1979), que pode ser considerado genérico ou de largo espectro químico.

Na Tabela 02 pode ser observado o resultado da atividade do decocto sobre todas as bactérias confrontadas. Ao lado dos resultados dos tratamentos 1 e 2, está

anotada a informação sobre a significância estatística de redução logarítmica em relação a dose infectante inicial.

O decocto de *A. satureioides* apresentou atividade antibacteriana sobre 89,29 % dos inóculos confrontados. Observou-se que em 1 hora de contato 60,71 % foram inibidas, e 10,71 % inativadas; com 24 horas de contato 89,29 % das bactérias foram inibidas, estando 82,14 % delas inativadas.

O digluconato de clorexidina, que na prática sanitária é usada em concentrações variadas que iniciam com 0,12 % como anti-séptica, e vão até 1 %, usada como desinfetante, inativou 100 % dos inóculos no tempo de contato de 1 hora.

Quanto a ação do decocto sobre as bactérias Gram positivas, 70,83 % foram inibidas e 12,5 % foram inativadas em 1 hora de contato. Em 24 horas de contato 87,5 % foram inibidas e 79,17 % inativadas. Sobre as Gram negativas, não promoveu inibição e inativações tempo de 1 hora de contato, mas em 24 horas a leitura das placas evidenciou que 100 % das bactérias estavam inibidas/inativadas.

Observando o resultado da atividade do decocto sobre as bactérias do gênero *Staphylococcus aureus*, na leitura das placas do tratamento 1, com 1 hora de contato, pode-se observar que 100 % delas estavam inibidas. Na observação das placas do tratamento 2, na mesma 1 hora de contato, obteve-se a evidência que 20% delas já estavam inativadas. Quando o tempo de contato prolongou-se por 24 horas, o decocto inativou 86,67% dos inóculos.

Comparada a atividade provocada pelo decocto sobre a amostra padrão de *S. aureus* com a atividade provocada sobre os 14 isolados “de campo”, percebe-se que sobre 9 deles tanto os tempos de contato para inibição quanto para inativação foram os mesmos. Apenas sobre dois dos isolados, Stapa 06 e 08, o decocto não promoveu ação antibacteriana de inativação considerada estatisticamente significativa.

Sobre o gênero *Streptococcus*, os resultados lidos em 1 hora de contato mostraram que 33,3% das bactérias estavam inibidas, e em 24 horas 100 % delas estavam inativadas. Sobre três dos isolados de *Streptococcus dysgalactiae*, e no isolado de *Streptococcus uberis*, foi observada ação do decocto somente na leitura da placa 24 horas de contato. Dois isolados de *Streptococcus dysgalactiae*, Stred 02 e 03, foram inibidas na primeira hora de contato, tendo o Stred 03 sofrido pequena, mas estatisticamente significativa, redução logarítmica.

Na Tabela 02 também pode ser observada a atividade do decocto sobre bactérias Gram negativas padrão e isolados. Em 100 % das vezes, o decocto de *A. satureioides* inibiu/inativou as bactérias do grupo Gram negativas no tempo de contato 24 horas.

Foram realizados testes de atividade antibacteriana do decocto de *A. satureioides* frente a três isolados de bactérias do gênero *Corynebacterium*. Os resultados obtidos foram: no contato de 1 hora, não foi observada atividade de inibição ou inativação estatisticamente significativa do decocto; no tempo de contato de 24 horas, os três isolados apresentaram ausência de crescimento na placa dose infectante controle e nas dos dois tratamentos, impossibilitando a avaliação da atividade do decocto, pois não houve como determinar se o resultado de redução total da bactéria ocorreu pela ausência de nutrientes ou pela ação do decocto. Possivelmente o não crescimento bacteriano ocorreu pelo déficit de nutrientes no meio de cultura, pois o *Corynebacterium* é um microrganismo exigente para cultivo, crescendo melhor quando adicionado sangue ou soro (HIRSH & ZEE, 2003).

Treze isolados de campo (9 Stapa, 1 Stred, 1 Streu, 1 Esch e 1 Pseua) haviam sido submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA): AMP, AMT, CEF, CIP, DAN, CEFQ, NBT, GENT, OXA, ENR, EST, NEO, NOR, TET e SUL. Os 9 Stapa S ou R aos antibióticos, já com 1 hora de contato foram mantidos inibidos pelo decocto. Dos 5 isolados (Stapa 03, 07, 08, 11 e 14) que apresentaram R à algum antibiótico (EST, AMP, AMO, NEO), apenas um (Stapa 08) não foi inativado pelo decocto. Por outro lado, um isolado (Stapa 06) que foi sensível a todos os antibióticos não foi inativado pelo decocto. Do gênero *Streptococcus*, o isolado Stred 03, R aos antimicrobianos OXA e TET, foi inibido em 1 h e inativado em 24 h. O Streu 01, R à GEN, EST e NEO, foram inativados após 1 hora de contato com o decocto. O Esch 01, submetido ao TSA, R aos antibióticos AMP, AMT, CEF, EST e NEO, estava inativado pelo decocto na leitura da placa 24 h. O Pseua 01, R à AMP, AMO, CEF, GEN, EST e NEO também já estava inativado na leitura das 24 horas.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos *in vitro*, conclui-se que o flavonóide quercetina está presente na forma decocto, e que esta solução apresenta atividade antimicrobiana tanto sobre amostras bacterianas padronizadas quanto sobre isolados “de campo”.

BIBLIOGRAFIA

AVANCINI, C. A. M. et al. 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 ...SOVERGS, 2006**. CDRoom. Trabalho - Resumo Expandido n. 97.

AVANCINI, C. A. M., WIEST, J. M. Etnomedicina veterinária, etnonosotaxia e etnoterapêutica de doenças de pele como referência para seleção e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.21 - 28, 2008. Disponível em: <http://www.ibb.unesp.br/servicos/publicacoes/rbpm/pdf_v10_n1_2008/artigo4.pdf>. Acesso em 01 set. 09.

BARBOSA, S. B. P. et al. 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. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v36n1/a12v36n1.pdf>>. Acesso em 02 jun. 08. doi: 10.1590/S1516-35982007000100012.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª ed. São Paulo: Atheneu Editora Ltda., 1988.

FERNANDEZ, V. N. V. et al. 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 satureioides* D.C. ASTERACEAE (macela). In: XV Salão e XII Feira de Iniciação Científica/UFRGS, 2003, Porto Alegre. XV Salão de Iniciação Científica e XII Feira de Iniciação Científica 2003/UFRGS. **Resumos**. Porto Alegre : Sonopress Rimo Indústria e Comércio Fonográfica LTDA, 2003. p. 222-222.

FREITAS, A. G. et al. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 12, supl., p. 64-65, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v12s1/a31v12s1.pdf>>. Acesso em 01 set. 09. doi: 10.1590/S0102-695X2002000300031.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 2003, p. 446.

HNATYSZYN, O. et al. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig *corpus cavernosum*. **Phytomedicine** v. 11, p. 366–369, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B7GVW-4DS3517-9R-1&_cdi=20441&_user=687304&_pii=S0944711304703426&_orig=browse&_coverDate=12%2F31%2F2004&_sk=999889995&view=c&wchp=dGLbVzW-zSkWb&md5=bcfe660914749fff9dd4b9caa97c9aa8&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em 27 mai. 08. doi:10.1078/0944711041495182.

KADARIAN, C. et al. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (LAM) D. C. **Pharmacological Research**, v. 45, No. 1, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6WP9-4575RTF-C-1&_cdi=6985&_user=687304&_pii=S1043661801909041&_orig=search&_coverDate=01%2F31%2F2002&_sk=999549998&view=c&wchp=dGLzVtbzSkWb&md5=048894bd73677f839e6bd2d8ecba47f6&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em 27 mai. 08. doi:10.1006/phrs.2001.0904.

MOREIRA, M. A. S. et al. Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.6, p.1307-1314, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v60n6/03.pdf>>. Acesso em 16 out. 09. doi:10.1590/S0102-09352008000600003.

MOTTA, F. M. **Inibição e inativação in vitro por diferentes extratos de *Achyrocline satureioides* (Lamm) D.C. – “macela” – Compositae sobre bactérias zoonóticas transmitidas por alimentos**. 2007, 87 f. (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PEREIRA, A. R. et al. Contagem de células somáticas e características produtivas de vacas da raça holandesa em lactação. **Scientia Agricola**, v.58, n.4, p.649-654, out./dez. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sa/v58n4/6279.pdf>>. Acesso em 02 jun. 08. doi: 10.1590/S0103-90162001000400001.

PEREIRA, L. P. et al. Número de cromossomos em populações de *Achyrocline satureioides* Lam. (marcela) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.678-681, mar-abr, 2006. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/cr/v36n2/a52v36n2.pdf>>. Acesso em 02 jun. 08. doi: 10.1590/S0103-84782006000200052.

POLYDORO, M. et al. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sciences**, v. 74, p. 2815–2826, 2004. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T99-4BWMYC1-2-7&_cdi=5109&_user=687304&_pii=S0024320504001225&_orig=browse&_coverDate=04%2F23%2F2004&_sk=999259976&view=c&wchp=dGLzVzb-zSkWb&md5=b6f1d865ba3f9e02e76b28b9039ff0b6&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em 10 mai. 08. doi:10.1016/j.lfs.2003.09.073.

RANGEL, P.; MARIN, J. M. Analysis of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitic milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.5, p. 363-368, maio 2009. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v29n5/01.pdf>>. Acesso em 16 out. 09. doi: 10.1590/S0100-736X2009000500001.

REYBROUCK, GERALD. Efficacy of Inactivators Against 14 Disinfectant Substances. **Zentralblatt fur Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene**. I. Abr. Orig. B 168, p. 480-492 1979.

TRESOLDI, G. et al. Atividade antibacteriana desinfetante "in vitro" de extração vegetal frente a microrganismos padronizados de interesse em Medicina Veterinária: V - resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureioides* D.C. - Asteraceae. In: XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS,. XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, XV Feira de Iniciação Científica e I Salão UFRGS jovem, Porto Alegre, 2006. **Resumos**. v. CDRoom. Trabalho 243, p. 205-206.

Tabela 01. Atividade antibacteriana do decocto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – ASTERACEA – (“macela”), em três diferentes proporções, usando técnica *pour plate*, sobre bactérias padrões *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Amostras	Tempos	Proporções	Dose Infectante Inicial/Controle	Tratamento 1	Tratamento 2
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1 h	5g:100mL	$8,6 \times 10^6$	0	$2,6 \times 10^6$
	24 h	5g:100mL	$9,4 \times 10^6$	0	0
	1 h	6,5g:100mL	$9,4 \times 10^6$	0	1×10^5
	24 h	6,5g:100mL	1×10^7	0	0
	1 h	7,5g:100mL	$9,4 \times 10^6$	0	4×10^6
	24 h	7,5g:100mL	$3,4 \times 10^6$	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 11229	1 h	5g:100mL	$2,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	2×10^7
	24 h	5g:100mL	Incontável	Incontável	Incontável
	1 h	6,5g:100mL	2×10^7	3×10^7	$1,6 \times 10^7$
	24 h	6,5g:100mL	Incontável	Incontável	Incontável
	1 h	7,5g:100mL	$2,4 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	1×10^7
	24 h	7,5g:100mL	Incontável	0	0

Tabela 02. Atividade antibacteriana do decocto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. – ASTERACEA – (“macela”), na proporção de 7,5 g : 100 mL, usando técnica *pour plate*, sobre bactérias do gênero *Staphylococcus aureus* (Stapa), *Streptococcus dysgalactiae* (Stred) *Streptococcus uberis* (Streu), *Escherichia coli* (Esch) e *Pseudomonas aeruginosa* (Pseua), isolados em leite de vacas com mastite.

Amostras	Tempos	Dose Infectante Inicial/Controle	Tratamento 1 (UFC/mL)		Tratamento 2 (UFC/mL)	
Stapa ATCC25923	1 h	$9,4 \times 10^6$	0	S.	$4,0 \times 10^6$	N. S.
	24 h	$3,4 \times 10^6$	0	S.	0	S.
Stapa 01	1 h	$4,2 \times 10^7$	0	S.	$6,0 \times 10^6$	N. S.
	24 h	$1,4 \times 10^7$	0	S.	0	S.
Stapa 02	1 h	$1,46 \times 10^7$	0	S.	$1,6 \times 10^6$	S.
	24 h	$3,4 \times 10^7$	0	S.	0	S.
Stapa 03	1 h	$1,62 \times 10^7$	0	S.	$4,0 \times 10^6$	N. S.
	24 h	$3,2 \times 10^7$	0	S.	0	S.
Stapa 04	1 h	$3,2 \times 10^7$	0	S.	0	S.
	24 h	$4,6 \times 10^7$	0	S.	0	S.
Stapa 05	1 h	$3,8 \times 10^7$	0	S.	$2,4 \times 10^7$	N. S.
	24 h	1×10^7	0	S.	0	S.
Stapa 06	1 h	$1,5 \times 10^7$	0	S.	$1,0 \times 10^7$	N. S.
	24 h	$5,2 \times 10^6$	0	S.	$4,0 \times 10^5$	N. S.
Stapa 07	1 h	3×10^7	0	S.	$1,4 \times 10^7$	N. S.
	24 h	$2,3 \times 10^7$	0	S.	$4,0 \times 10^6$	S.
Stapa 08	1 h	$3,8 \times 10^7$	0	S.	$1,0 \times 10^7$	N. S.
	24 h	$1,6 \times 10^7$	0	S.	$8,0 \times 10^6$	N. S.
Stapa 09	1 h	$2,02 \times 10^7$	0	S.	$9,0 \times 10^6$	N. S.
	24 h	$9,4 \times 10^6$	0	S.	0	S.
Stapa 10	1 h	$4,2 \times 10^7$	0	S.	$1,65 \times 10^7$	N. S.
	24 h	$2,8 \times 10^7$	0	S.	0	S.
Stapa 11	1 h	6×10^7	0	S.	$2,0 \times 10^7$	N. S.
	24 h	$3,2 \times 10^7$	0	S.	0	S.
Stapa 12	1 h	$4,8 \times 10^7$	0	S.	$2,0 \times 10^7$	N. S.
	24 h	$4,0 \times 10^7$	0	S.	0	S.
Stapa 13	1 h	$5,6 \times 10^7$	0	S.	$6,0 \times 10^6$	N. S.
	24 h	$4,4 \times 10^7$	0	S.	0	S.
Stapa 14	1 h	$1,84 \times 10^7$	0	S.	$8,0 \times 10^5$	S.
	24 h	$6,2 \times 10^6$	0	S.	0	S.
Stred 01	1 h	$1,22 \times 10^7$	$3,2 \times 10^6$	N. S.	4×10^6	N. S.
	24 h	$1,6 \times 10^7$	0	S.	0	S.
Stred 02	1 h	$1,6 \times 10^6$	0	S.	$3,2 \times 10^6$	N. S.
	24 h	$1,4 \times 10^6$	0	S.	0	S.
Stred 03	1 h	$1,48 \times 10^6$	2×10^5	S.	$1,8 \times 10^6$	N. S.
	24 h	$1,24 \times 10^6$	0	S.	0	S.
Stred 04	1 h	$1,8 \times 10^7$	$7,2 \times 10^5$	N. S.	$8,0 \times 10^5$	N. S.
	24 h	$6,2 \times 10^6$	0	S.	0	S.
Stred 05	1 h	$8,4 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6$	N. S.	$1,26 \times 10^7$	N. S.
	24 h	$4,4 \times 10^6$	0	S.	0	S.
Streu 01	1 h	$3,08 \times 10^7$	$3,4 \times 10^6$	N. S.	3×10^6	N. S.
	24 h	$1,28 \times 10^7$	0	S.	0	S.
Esch ATCC11229	1 h	$2,4 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	N. S.	$1,0 \times 10^7$	N. S.
	24 h	Incontável	0	S.	0	S.
Esch 01	1 h	$3,56 \times 10^8$	$3,8 \times 10^7$	N. S.	$6,0 \times 10^7$	N. S.
	24 h	Incontável	0	S.	0	S.
Klebs 01	1 h	$5,0 \times 10^7$	$5,2 \times 10^7$	N. S.	$4,6 \times 10^7$	N. S.
	24 h	Incontável	0	S.	0	S.
Pseua 01	1 h	$2,48 \times 10^8$	$4,0 \times 10^7$	N. S.	$7,2 \times 10^7$	N. S.
	24 h	Incontável	0	S.	0	S.

S.: redução significativa da dose infectante inicial; N. S.: redução não significativa da dose infectante inicial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M.; JENSEN, N. E. Genotypic and phenotypic diversity of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 53, 315-323, 1996.
- AKERELE, O. Medicinal plants and Primary Health Care: an agenda for action. **Fitoterapia**, v. LIX, n. 5, p. 355-63, 1988.
- ALMEIDA, R. A.; LUTHER, D. A.; NAIR, R.; OLIVER, S. Binding of host glycosaminoglycans and milk proteins: possible role in the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis. **Veterinary Microbiology**, 94, 131–141, 2003.
- AMARAL, L. A.; ISA, H.; DIAS, L. T.; ROSSI JR, O. D.; NADER FILHO, A. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesq. Vet. Bras.** 24(4):173-177, out./dez. 2004.
- ARREDONDO, M. F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MORQUIO, A.; FERREIRA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; LAFON, L.; DAJAS, F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology** 91, 13–20, 2004.
- AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M., MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52 n.3 Belo Horizonte jun. 2000.
- 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 satureioides* D.C. – Asteraceae (“macela”). In: XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária do Rio Grande do Sul, 2006, Gramado. **XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária do Rio Grande do Sul, II Congresso Estadual da ANCLIVEPA/RS**, 2006. Anais, v. CDRoom. p. Trab. Resumo Expandido n. 97.
- AVANCINI, C. A. M., WIEST, J. M. Etnomedicina veterinária, etnonosotaxia e etnoterapêutica de doenças de pele como referência para seleção e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, p.21 - 28, 2008a.
- AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Schlecht. – Guttiferae (“escadinha/sinapismo”), frente diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina) **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.10, n.1, p.64-69, 2008b.
- BALDAUF, C.; KUBO, R. R.; SILVA, F.; IRGANG, B. E. Ferveu, queimou o ser da erva”: conhecimentos de especialistas locais sobre plantas medicinais na região Sul do Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.11, n.3, p.282-291, 2009.

BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; HARE, W. R.; HOPE, J. C. Characterization of the Bovine Innate Immune Response to Intramammary Infection with *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Dairy Science**, Vol. 87, No. 8, 2004.

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.

BOROWSKY, L. M.; BESSA, M. C.; CARDOSO, M. I.; AVANCINI, C. A. M. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes quaternário de amônio e iodoform. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1474-1479, set-out, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde, **Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmacologia** Portaria nº 22, de 30 de outubro de 1967. Estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas, Brasil, DF, outubro, 1967. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: 12 nov. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasil, DF, março, 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: 12 nov. 2009.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M.; VARGAS, O. L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.** 18(1):39-44, jan./mar. 1998.

CALVINHO, L. F.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 61, 93-110, 1998.

CHAPMANN, J.S. Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 41, p. 241-245, 1998.

COLDEBELLA, A.; MACHADO, P. F.; DEMÉTRIO, C. G. B.; RIBEIRO JÚNIOR, P. J.; CORASSIN, C. H.; MEYER, P. M.; CASSOLI, L. D. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas de alta produção. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1451-1457, dez. 2003.

CORRÊA, W. N.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos**. Editora Médica e Científica Ltda. 2ª edição, p. 117-131. 1992.

COSTA, E. O. Importância da Mastite na Produção Leiteira do País. **Revista Educação Continuada do CRMV – SP**. São Paulo, fascículo 1, volume 1. p. 003 – 009. 1998.

CUNHA, R. P. L.; MOLINA, L. R.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J.; FERREIRA, P. M.; GENTILINI, M. B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.19-24, 2008.

FACHINETTO, J. M.; BAGATINI, M. D.; DURIGON, J.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 17(1): 49-54, Jan./Mar. 2007.

FERNANDES, M. C.; RIBEIRO, M. G.; SIQUEIRA, A. K.; SALERNO, T.; LARA, G. H. B.; LISTONI, F. J. P. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.3, p.745-748, 2009.

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 satureioides* D.C. ASTERACEAE (macela). In: XV Salão e XII Feira de Iniciação Científica/UFRGS, 2003, Porto Alegre. XV Salão de Iniciação Científica e XII Feira de Iniciação Científica 2003/UFRGS. Porto Alegre : Sonopress Rimo Indústria e Comércio Fonográfica LTDA, 2003. p. 222-222.

FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L. F.; SOUZA, V.; Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, v.36, n.4, jul-ago, 2006.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Editorial Lemos, 2000(a).

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Conceitos e definições sobre mastite bovina. In: **2º Curso on-line de atualização sobre controle da mastite**, 2000 (b). Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cursos.mastite.asp>> acesso em: 28 jun. 2000.

FREITAS, A. G.; COSTA, V.; FARIAS, E. T.; LIMA, M. C. A.; SOUSA, I. A.; XIMENES, E. A. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, supl., p. 64-65, 2002.

GUERREIRO, M. G.; OLIVEIRA, S. J.; SARAIVA, D.; WIEST, J. M.; LIEBERKNECHT, F.; POESTER, F.; DIAS, J. C. A.; FERNANDES, J. C. T.; LANGELOH, A.; BAPTISTA, P. J. H. P. **Bacteriologia especial, com interesse em saúde animal e saúde pública**. Porto Alegre. Ed. Sulina, 495p., 1984.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Ed. Guanabara-Koogan, p. 446, 2003.

HNATYSZYN, O.; MOSCATELLI, V.; RONDINA, R.; COSTA, M.; ARRANZ, C.; BALASZCZUK, A.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig *corpus cavernosum*. **Phytomedicine** 11: 366–369, 2004.

JACOBSSON, K. A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. **Veterinary Microbiology**, 96, 103–113, 2003.

KADARIAN, C.; BROUSSALIS, A. M.; MIÑO, J.; LOPEZ, P.; GORZALCZANY, S.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (LAM) D. C. **Pharmacological Research**, Vol. 45, No. 1, 2004.

KAIPAINEN, T.; POHJANVIRTA, T.; SHPIGEL, N. Y.; SHWIMMER, A.; PYÖRÄLÄ, S.; PELKONEN, S. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, 85, 37-46, 2002.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. **Canada Veterinary Journal**. Volume 38, July 1997.

KIKUCHI, N.; KAGOTA, C.; NOMURA, T.; HIRAMUNE, T.; TAKAHASHI, T.; YANAGAWA, R. Plasmid profiles of *Klebsiella pneumoniae* from bovine mastitis isolated. **Veterinary Microbiology**, 47, 9-15, 1995.

LANGFORD, F. M.; WEARY, D. M.; FISHER, L. Antibiotic Resistance in Gut Bacteria from Dairy Calves: A Dose Response to the Level of Antibiotics Fed in Milk. **Journal of Dairy Science** Vol. 86, No.12, 2003.

LEIGH, J. A.; HODGKINSON, S. M.; LINCOLN, R. A. The interaction of *Streptococcus dysgalactiae* with plasmin and plasminogen. **Veterinary Microbiology**, 61, 121-135, 1998.

LE MOS, G. C. S.; OLIVEIRA, L. O.; EBERLI, B. B.; MOTTA, O. V.; FOLLY, M. M. Bactericidal activity of macela (*Achyrocline satureioides* (Lam) DC) and jaborandi-falso (*Piper aduncun* L.) against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu: v. 3, nº 1, p. 67-72, 2000.

LOPEZ-BENAVIDES, M. G.; WILLIAMSON, J. H.; LACY-HULBERT, S. J.; CURSONS, R. T. Heifer teats sprayed in the dry period with an iodine teat sanitizer have reduced *Streptococcus uberis* teat-end contamination and less *Streptococcus uberis* intra-mammary infections at calving. **Veterinary Microbiology**, 134, 186–191, 2009.

MAGALHÃES, H. R.; EL FARO, L.; CARDOSO, V. L.; PAZ, C. C. P.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células Somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.2, p.415-421, 2006.

MARINHO, M. L.; ALVES, M. S.; RODRIGUES, M. L. C.; ROTONDANO, T. E. F.; VIDAL, I. F.; SILVA, W. W.; ATHAYDE, A. C. R. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.9, n.3, p.64-69, 2007.

McCORKLE, C. Veterinary anthropology. **Human Organization**, v. 48, n.2, p. 156-161, 1989.

MOREIRA, M. A. S.; FERREIRA, A. B.; TRINDADE, T. F. S. L.; REIS, A. L. O.; MORAES, C. A. Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.6, p.1307-1314, 2008.

MOTA, F. M. Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyroclines satureioides* (Lam.) D. C. – Asteraceae – (“macela”, “marcela”), como fator de proteção em zoonoses. 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, 2008.

MUNOZ, M. A.; WELCOME, F. L.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Molecular Epidemiology of Two *Klebsiella pneumoniae* Mastitis Outbreaks on a Dairy Farm in New York State. **Journal of Clinical Microbiology**, Vol. 45, No. 12, p. 3964–3971, Dec. 2007.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A., ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P.; Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1316-1318, 2007.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (O.I.E.). **OIE international standards on antimicrobial resistance**. Paris : OIE, 2003.

OLIVEIRA, A. L.; PADILHA, C. D.; ORTEGA, G.G; PETROVICK, P. R. *Achyrocline satureioides* (lam.) DC. (Marcela), Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. **Caderno de Farmácia**, v. 17, n. 1, p. 33 - 38, 2001.

PATEL, D.; ALMEIDA, R. A.; DUNLAP, J.; OLIVER, S.. Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, 137, 297–301, 2009.

PEREIRA, A. R.; MACHADO, P. F.; SARRIÈS, G. A. Contagem de células somáticas e características produtivas de vacas da raça holandesa em lactação. **Scientia Agricola**, v.58, n.4, p.649-654, out./dez. 2001.

PEREIRA, L. P.; LUZ, L. P.; TEDESCO, S. B.; SILVA, A. C. F. Número de cromossomos em populações de *Achyrocline satureioides* Lam. (marcela) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.2, p.678-681, mar-abr, 2006.

POLYDORO, M.; SOUZA, K. C. B.; ANDRADESA, M. E.; SILVA, E. G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOL, F.; SCHAPOVAL, E. E. S., BASSANI, V. L.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sciences** 74, 2815–2826, 2004.

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.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**, Mosby-Year, 648p. 1994.

RANGEL, P.; MARIN, J. M. Analysis of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitic milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 29 (5): 363-368, maio 2009.

- REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M. V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.6, p.651-658, 2003.
- RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.9, n.2, p.67-70, 2007.
- RIBEIRO, M. G.; COSTA, E. O.; LEITE, D. S.; FERREIRA, A. J. P.; SILVA, A. S.; DELLA COLLETA, H. H. M. Fator necrosante citotóxico em *Escherichia coli* isolada de mastite clínica bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54 n.6 Belo Horizonte dez. 2002.
- RIBEIRO, M. G.; COSTA, E. O.; LEITE, D. S.; LANGONI, H.; GARINO JÚNIOR, F.; VICTÓRIA, C.; LISTONI, F. J. P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.724-731, 2006.
- RIVERA, F.; GERVAZ, E.; SERE, C.; DAJAS, F. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela) **Journal of Ethnopharmacology** 95, 359–362, 2004.
- SÁ, M. E. P.; CUNHA, M. L. R. S.; ELIAS, A. O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H.; Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 41:320-326, 2004.
- SANDRINI, C. N. M.; PEREIRA, M. A.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, n.1, jan-fev, 2007.
- SONAGLIO, D.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Padronização de extratos vegetais: extrato hidroalcoólico de *Achyrocline satureioides* (lam.) DC., Compositae (Marcela): comparação entre cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em papel/ultravioleta. **Caderno de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 55-74, 1986.
- SOUZA, C. A. S.; AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. - *Compositae* (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37 n.6 São Paulo dez. 2000.
- SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; BASTOS, R. R. Fatores de risco 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, supl. 2, p.251-260, 2005.
- SOUZA, A. A.; WIEST, J. M. Atividade anti-bacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul - Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.9, n.3, p.23-29, 2007.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* isolados de leite *in natura*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(1): 41-45, jan.-mar. 2006.

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, 2006, Porto Alegre. XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, XV Feira de Iniciação Científica e I Salão UFRGS jovem, 2006. v. CDRoom. Trabalho 243, p. 205-206.

VASCONCELLOS, A. G.; BRANQUINHO, F. B.; SÁNCHEZ, C.; LAGE, C. L. S. Fitofármaco, fitoterápico, plantas medicinais: o reducionismo e a complexidade na produção do conhecimento científico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, supl., p. 103-105, 2002.

VASCONCELOS, L. Biodiversidade: Nossos bosques têm mais vida. **Revista Desafios do Conhecimento**. Edição 18, Abril/2005. Disponível em: <<http://www.ipea.gov.br/desafios/edicoes/18/artigo13767-1.php>>. Acesso em: 01 out. 2009.

WADT, N. S. Y.; OHARA, M. T.; SAKUDA-KANEKO, T. M.; BACCHI, E. M. Atividade antimicrobiana de *Leonurus sibiricus* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.5, n. 2, p. 167-174, 1998.

WATTS, J. L.; LOWERY, D. E.; TEEL, J. F.; ROSSBACH, S. Identification of *Corynebacterium bovis* and other Coryneforms Isolated from Bovine Mammary Glands. **Journal of Dairy Science**. Vol. 83, No. 10, 2000.

WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H.; AVANCINI, C. A. M.; GONÇALVES, A. R. Atividade anti-estafilócica em extratos de plantas com indicativo medicinal ou condimentar. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.11, n.2, p.209-215, 2009.

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 **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.577-585, 2007.

ZARZOSA, A. O.; ÁNGELES, H. L.; CISNEROS, E. S.; GÓMEZ, E. V.; ZÁRATE, L. L.; MEZA, J. E. L. Antibacterial activity of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed by bovine endothelial cells against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 127, 425–430, 2008.