

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

POTENCIAL DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro*
DE EXTRATOS VEGETAIS DO CERRADO FRENTE
ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus*.

Talita Thomaz Nader

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

POTENCIAL DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro*
DE EXTRATOS VEGETAIS DO CERRADO FRENTE
ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus*.

Talita Thomaz Nader

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TALITA THOMAZ NADER - Nascida aos 19 de junho de 1979, em Ribeirão Preto - SP, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia - MG, em julho de 2003. Durante a graduação realizou estágios em diversas áreas. Em 2005 iniciou o curso de Especialização em Homeopatia Veterinária, no Instituto Homeopático François Lamasson (IHFL), Ribeirão Preto - SP, concluído em 2008. Durante o ano de 2007 fez estágio no Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto - SP. Em março de 2008 ingressou no programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal - SP, onde desenvolveu o projeto de pesquisa como bolsista do CNPq, com auxílio financeiro de pesquisa da FAPESP. Em janeiro de 2009 ingressou como membro do corpo docente do IHFL, onde permanece atualmente em atividade. Em outubro de 2009 foi selecionada para o Curso de Doutorado na mesma área e instituição que realiza o Mestrado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e principalmente a Deus, por permitir todas as vivências neste planeta, com todo o amparo necessário para que caminhemos com dignidade e proteção;

Aos meus especiais orientadores Prof. Dr. Luis Augusto do Amaral e Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira, pela paciência, dedicação, persistência e amizade. Pessoas ímpares, que através do exemplo, me ensinaram a ser um ser humano melhor;

À Juliana Coppede pelo auxílio, parceria e amizade em todos os momentos, e pelas palavras lúcidas que compartilhou comigo;

À disposição da equipe do Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto, que viabilizou e contribuiu para a realização deste trabalho;

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal pelo apoio e pelos ensinamentos ministrados;

Ao CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida durante o Mestrado;

A FAPESP, Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho;

E, por fim:

A minha pequena grande luz, Isabel, que diariamente é capaz de despertar em mim o que há de melhor e mais bonito no ser humano: o amor incondicional;

Ao meu amado esposo, Bruno, por tudo que vem me oferecendo nestes anos de convivência, pela compreensão e respeito pelas minhas escolhas;

Aos meus pais por contribuírem muito em todos os momentos, e por serem grandes responsáveis pelo que sou hoje;

Aos meus irmãos e cúmplices;

E aos meus queridos sobrinhos por tornarem a vida mais colorida.

“Sei que o meu trabalho é uma gota no oceano,
mas, sem ele, o oceano seria menor“.

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
I. INTRODUÇÃO	01
II. OBJETIVOS.....	03
2.1. Geral	03
2.2. Específicos	03
III. REVISÃO DE LITERATURA	04
3.1. Plantas Medicinais	04
3.2. Cerrado.....	05
3.2.1. <i>Baccharis dracunculifolia</i>	06
3.2.2. <i>Cochlospermum regium</i>	07
3.2.3. <i>Croton antisyphiliticus</i>	07
3.2.4. <i>Eugenia dysenterica</i>	08
3.2.5. <i>Lippia sidoides</i>	08
3.3. Mastite Bovina	10
3.3.1. Etiologia: <i>Staphylococcus aureus</i>	11
3.3.2. Diagnóstico.....	13
3.3.3. Tratamento e Controle.....	13
3.4. Saúde Pública	14
IV. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Colheita de espécies vegetais	17
4.2. Obtenção dos extratos brutos	18
4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana	24
4.4. Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
4.5. Método de difusão em disco	26
4.6. Concentração Inibitória Mínima	27
4.7. Concentração Bactericida Mínima	27

4.8. Análise Estatística	28
V. RESULTADOS	29
5.1. Difusão em Disco	29
5.2. Microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima	30
VI. DISCUSSÃO	35
VII. CONCLUSÕES.....	39
VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
IX. REFERÊNCIAS	41

LISTA DE TABELAS**Página**

Tabela 1. Lista de material herborizado depositado no Herbário de Plantas Medicinais da UNAERP.....	18
Tabela 2. Descrição das etapas do experimento e suas condições: data de realização, quantidade e concentração dos extratos, estirpes selecionadas de <i>Staphylococcus aureus</i> e métodos utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana.....	24
Tabela 3. Procedência das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> , segundo ZAFALON (2007) e FERREIRA (2008).....	26
Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos metanólico, clorofórmico e hexânico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> , frente seis estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos metanólico, clorofórmico e hexânico de <i>Croton antisiphiliticus</i> , frente seis estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos metanólico e hexânico de <i>Lippia sidoides</i> , frente seis estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	32

Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hexânico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> e do extrato clorofórmico de <i>Croton antisiphiliticus</i> , na concentração de 200 mg/mL, frente a 20 estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
	33
Tabela 8. Padrão de sensibilidade das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> frente à gentamicina, por meio dos métodos de difusão em disco e microdiluição em placa	32
	33

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1. Folhas secas de <i>Eugenia dysenterica</i>	19
Figura 2. Moagem do material vegetal seco, em moinho de faca	19
Figura 3. Material vegetal em pó, resultante da moagem	20
Figura 4. Processo de maceração estática	21
Figura 5. Filtração	21
Figura 6. Rotaevaporação	22
Figura 7. Extrato clorofórmico de <i>Croton antisyphiliticus</i>	23
Figura 8. Extrato solubilizado de <i>Croton antisyphiliticus</i>	23
Figura 9. Método de difusão em disco, sem formação de halo de inibição em torno dos discos contendo extrato vegetal. Os dois discos superiores receberam os controles negativos (veículo e solvente), os quatro discos posicionados mais inferiormente receberam o extrato vegetal na concentração de 10 mg/mL e o disco central com gentamicina (controle positivo), único que inibiu multiplicação bacteriana.....	29
Figura 10. Método de microdiluição em caldo, utilizando o revelador tetrafeniltetrazólico, que indica viabilidade celular na coloração avermelhada.....	30

POTENCIAL DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DE EXTRATOS VEGETAIS DO CERRADO FRENTE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus*.

RESUMO - O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de algumas plantas endêmicas do Cerrado, tais como *Baccharis dracunculifolia*, *Cochlospermum regium*, *Croton antisyphiliticus*, *Eugenia dysenterica* e *Lippia sidoides*, frente a estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite e de fontes de contaminação envolvidas na epidemiologia da mastite bovina. Os extratos foram preparados a partir das partes aéreas e sistema radicular das plantas, utilizando os solventes metanol, hexano e clorofórmio, por processo de maceração estática. Para avaliação da atividade antimicrobiana foram aplicadas as técnicas de difusão em disco, microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (MBC). Dentre os extratos que apresentaram atividade bacteriostática, o extrato hexânico de *Baccharis dracunculifolia* destacou-se com CIM de 10 mg/mL sobre 45% das estirpes. Enquanto o extrato clorofórmico de *Croton antisyphiliticus*, com atividade bactericida, inibiu a multiplicação de 100% das estirpes de *Staphylococcus aureus*, com CIM variando entre 1,03mg/mL e 4,15 mg/mL. O estudo demonstra ainda, que tais extratos vegetais apresentaram resultados superiores aos obtidos com a gentamicina, princípio ativo muito utilizado no combate à mastite bovina, reforçando a importância das plantas medicinais como recurso terapêutico.

Palavras Chaves: Atividade antibacteriana, Fitoterapia, Mastite Bovina, *Baccharis* e *Croton*.

POTENTIAL OF *in vitro* ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE PLANT EXTRACTS IN THE CERRADO AGAINST STRAINS OF *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT - The purpose of this study was to assess the potential of *in vitro* antimicrobial activity of the extracts of certain endemic plants in the Brazilian Cerrado, such as *Baccharis dracunculifolia*, *Cochlospermum regium*, *Croton antisiphiliticus*, *Eugenia dysenterica* and *Lippia sidoides*, against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from the milk of cows with mastitis and sources of contamination involved in the epidemiology of bovine mastitis. The extracts were prepared by using aerial parts and radicular systems of the plants, using methanol, hexane and chloroform as solvents, extracted with static maceration. Techniques of disc diffusion, broth microdilution for the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) were used for the assessment of antimicrobial activity. Among the extracts with bacteriostatic activity, the hexanic extract of *Baccharis dracunculifolia* had a 10 mg/mL MIC against 45% of the strains, whereas the chloroformic extract of *Croton antisiphiliticus*, with bactericidal activity, inhibited the multiplication of 100% of the *Staphylococcus aureus* strains, whose MIC varied between 1.03mg/mL and 4.15 mg/mL. The study also demonstrated that the results of these plant extracts are superior to the results obtained with gentamicin, an active principle commonly used against bovine mastitis, reinforcing the importance of medicinal plants as a therapeutic resource.

Keywords: Antibacterial activity, Phytotherapy, Bovine Mastitis, *Baccharis* and *Croton*.

I. INTRODUÇÃO

O uso de extratos vegetais com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. A Organização Mundial da Saúde estima que 80% da população do planeta utiliza, de algum modo, plantas medicinais como medicamentos (GARCIA, 1995).

Extratos vegetais de plantas ou substâncias ativas vêm sendo utilizados na Medicina Veterinária para tratamentos de parasitoses e enfermidades infecciosas, inclusive em tratamentos de mastite bovina (COSTA, 1998).

A mastite, processo inflamatório da glândula mamária, é classificada de acordo com a forma de apresentação, podendo ser clínica ou subclínica (PYANTA, 1997). O *Staphylococcus aureus* destaca-se como o principal agente etiológico da mastite contagiosa e importante microrganismo na epidemiologia de doenças veiculadas por alimentos, devido a sua alta prevalência e produção de toxinas termorresistentes causadoras de gastroenterites alimentares no ser humano (SCHOCKEN et al., 1996; ZECCONI & HAHN, 2000).

O tratamento da mastite bovina é convencionalmente realizado por antibioticoterapia, entretanto o uso ostensivo e inadequado proporciona resistência bacteriana a diversos princípios ativos. O agente patogênico em estudo, *Staphylococcus aureus*, apresenta alta resistência aos antimicrobianos disponíveis no mercado (TORTORA, 2000).

Além da dificuldade de controlar uma enfermidade de grande impacto econômico e epidemiológico, os tratamentos atualmente disponíveis acarretam sérios prejuízos ao consumidor, à indústria e ao rebanho, devido ao risco da presença de resíduos de antibióticos no produto final (SOUZA & BENEDET, 2000).

Para reduzir ou eliminar os problemas oriundos da antibioticoterapia na mastite bovina, a busca por meios alternativos, como o uso de compostos naturais, vem sendo estimulada.

Considerando a riqueza da vegetação das plantas nativas do Cerrado, a existência de estudos prévios que relatam atividade antimicrobiana de alguns compostos destas plantas e o uso já adotado pela população, é essencial o desenvolvimento de projetos nessa área com o intuito de gerar benefícios terapêuticos e econômicos.

II. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o potencial de atividade antimicrobiana *in vitro* de algumas plantas nativas do Cerrado frente ao *Staphylococcus aureus*, isolado de leite de vacas com mastite bem como de fontes de contaminação envolvidas na cadeia produtiva do leite, consideradas fatores de risco para a ocorrência da doença.

2.2. Específicos

- Padronizar metodologia de solubilização dos extratos vegetais.
- Avaliar o perfil de sensibilidade e resistência das estirpes de *Staphylococcus aureus* frente ao antibiótico gentamicina.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima dos extratos com atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus*.
- Comparar os resultados de atividade antimicrobiana dos extratos obtidos por meio das técnicas de difusão em disco e microdiluição em caldo.

III. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Plantas Medicinais

O uso de extratos vegetais com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Segundo GARCIA (1995), a Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população do planeta utiliza, de algum modo, plantas medicinais como medicamentos, envolvendo a utilização de cerca de 25.000 espécies.

Nos anos 80, o desenvolvimento da pesquisa científica resultou na identificação de 121 compostos de origem vegetal, sendo que no período de 1983 a 1994, 6% dos medicamentos aprovados originaram-se diretamente de espécies vegetais; 24% foram oriundos de produtos derivados e 9% foram desenvolvidos pela modelagem molecular, onde as estruturas moleculares dos compostos serviram como precursores de processos de sínteses químicas. Metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em metabólitos secundários de origem vegetal (ALVES, 2001). Em contrapartida, pesquisas no Brasil ainda são incipientes, tanto para avaliação do uso seguro de plantas medicinais, como também no controle da comercialização (VEIGA et al., 2005). Segundo AMORIM et al. (2003), apenas 8% das espécies vegetais brasileiras foram estudadas em busca de moléculas bioativas.

O potencial de fornecimento de novas substâncias pelas plantas deve-se à incrível capacidade desses organismos em biossintetizar os mais variados tipos de estruturas moleculares. Fatores como a fertilidade e tipo do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura e poluição atmosférica podem influenciar e alterar a composição química dos vegetais, bem como as interações e as adaptações co-evolutivas do ecossistema envolvido (ALVES, 2001). Dentre os diversos constituintes químicos, as propriedades terapêuticas estão especialmente relacionadas com os chamados metabólitos secundários, que são compostos micromoleculares evolutivamente selecionados para conferir vantagens adaptativas às plantas. Essas substâncias são formadas por vários caminhos biossintéticos e produzem moléculas

dotadas de grande diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais. Participam dos mecanismos de defesa desenvolvidos para a sobrevivência do vegetal, atuando diretamente sobre agentes patogênicos, predadores e também polinizadores (SALISBURY & ROSS, 1992).

A identificação de novos compostos presentes nas plantas busca ampliar os recursos tecnológicos nacionais em diversos setores: através da redução de possíveis efeitos indesejados que algumas substâncias químicas sintéticas possam provocar, por meio da diminuição da resistência bacteriana, e minimizando os custos no desenvolvimento de medicamentos (AVANCINI et al., 2000).

A utilização de plantas medicinais ou de substâncias ativas na Medicina Veterinária vem ganhando espaço. Profissionais adeptos à fitoterapia revelam alta frequência de sucessos em tratamento de parasitoses e enfermidades infecciosas, inclusive em tratamentos de mastite bovina (COSTA, 1998). Além da utilização como alternativa na eliminação dos resíduos de medicamentos alopáticos sintéticos em produtos de origem animal, fato que tem levado o mercado a rejeitar tais produtos (BENEZ et al., 2002).

3.2. Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, considerado um complexo vegetacional de grande heterogeneidade em plantas nativas, ocupa 23% do território nacional que corresponde a dois milhões de km² (RIBEIRO & WALTER, 1998). Segundo estudos, restam intactos apenas 20% do bioma original (ALHO, 2005). O Cerrado está classificado como área *hotspots*, que são regiões com pelo menos 1.500 espécies endêmicas de plantas (restritas a uma determinada região) e que tenham perdido mais de 3/4 de sua vegetação original (MYERS et al, 2000). Lembrando que os recursos naturais uma vez extintos, não estarão disponíveis às futuras gerações, nota-se grande carência de ações voltadas para a identificação e preservação de plantas úteis do Cerrado.

Dentre a vasta diversidade vegetal existente neste bioma, no presente estudo, algumas plantas comumente encontradas foram selecionadas para investigação quanto ao potencial de atividade antimicrobiana *in vitro*, sobre estirpes de *Staphylococcus aureus* envolvidas na etiologia da mastite bovina, tais como: *Baccharis dracunculifolia*, *Cochlospermum regium*, *Croton antisiphiliticus*, *Eugenia dysenterica* e *Lippia sidoides*.

3.2.1. *Baccharis dracunculifolia*

A família Asteraceae é a mais numerosa dentro do grupo das Angiospermas.

As espécies do gênero *Baccharis* apresentam-se geralmente na forma de subarbustos ou arbustos ramificados, com 0,5 a 4 metros de altura, com caule e ramos cilíndricos, folhas alternas e muito variáveis na forma e no tamanho, e com capítulos que podem ser de uni a multiflores (BARROSO, 1976; BOLDT, 1989; JOLY, 1993). São plantas dióicas com inflorescências masculinas e femininas em plantas separadas (BOLDT, 1989; FERRACINI et al., 1995).

É amplamente encontrado na região sudeste do país e utilizado na medicina popular para controle e tratamento de diversas doenças.

Fitoquimicamente o grupo se destaca pela ocorrência de flavonóides e terpenóides, responsáveis por efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos e antiinflamatórios (VERDI et al., 2005).

A vassourinha, cujo nome científico é *Baccharis dracunculifolia* é a principal fonte vegetal das própolis produzidas por abelhas *Apis mellifera* africanizadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais (ALENCAR et al., 2005). Em municípios do estado de Minas Gerais a *Baccharis dracunculifolia* é muito utilizada medicinalmente pelas populações locais (RODRIGUES et al., 2002 & BOTREL et al., 2006). Em levantamento etnobotânico verificou sua utilização no combate a infecções fúngicas (FENNER et al., 2006).

3.2.2. *Cochlospermum regium*

Cochlospermum regium Mart. é uma espécie típica do Cerrado, pertencente à família Cochlospermaceae, cujo nome popular é algodãozinho do campo. Subarbusto com até 2m de altura, seus ramos variam de 0,8 a 1,8 m de comprimento, com sistema subterrâneo robusto e lenhoso, caule nodoso e folhas alternadas. As flores amarelas, em forma de conchas, são dispostas nas extremidades dos brotos grossos. Os frutos são secos, capsulares, com sementes pilosas (PIOCORRÊA, 1975; KIRISAWA, 1981; JOLY, 2002).

Levantamentos etnofarmacológicos mostram sua utilização como anti-séptico em infecções ginecológicas e para tratar feridas internas e externas (NUNES et al., 2003; SOUZA & FELFILI, 2006; TRESVENZOL et al., 2006).

Dentre os diversos compostos isolados, os taninos podem estar envolvidos na ação antimicrobiana da planta. De acordo com OLIVEIRA (1996) o extrato etanólico e suas frações a partir do rizoma da planta apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* semelhante ao antibiótico vancomicina, enquanto os compostos isolados e a decocção não exerceram atividade sobre a bactéria. BRUM et al (1997) afirmaram que o óleo essencial tem atividade contra *S. aureus* apresentando Concentração Inibitória Mínima de 5 mg/mL. O extrato liofilizado do rizoma de *Cochlospermum regium* apresentou atividade mutagênica e citotóxica em eritrócitos da medula óssea de camundongos em determinadas concentrações (CASTRO et al., 2004), e induziu apoptose de células ovarianas de hamsters *in vitro* (CESCHINI & CAMPOS, 2006).

3.2.3. *Croton antispyhiliticus*

Croton é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae, com cerca de 1.200 espécies encontradas principalmente das regiões tropicais (GOVAERTS et al. 2000). Apresentam-se na forma de subarbustos, arbustos ou árvores, folhas sempre inteiras,

flores com pétalas vilosas ao longo das margens, com tricomas longos, sementes globosas, subglobosas a elipsóides (CARUZO & CORDEIRO, 2007).

As folhas frescas de *Croton antisiphiliticus* Mart., conhecido popularmente como pé-de-perdiz, são utilizadas no tratamento de lesões de pele de etiologia fúngica (RODRIGUES et al., 2002). No estado de Minas Gerais é utilizado pela população como cicatrizante (FENNER et al., 2006).

3.2.4. *Eugenia dysenterica*

Eugenia dysenterica, pertencente à família Myrtaceae, é uma árvore frutífera típica do Cerrado que pode atingir até 10 metros de altura, de tronco e ramos tortuosos, casca grossa e fissurada. Os frutos têm formato globoso, bagáceo, cor amarelo clara e sabor levemente ácido (NAVES et al., 1995).

Conhecida vulgarmente por cagaita, suas folhas são utilizadas regionalmente como anti-diarreico (PALHARES, 2003), e seu óleo essencial apresenta considerável atividade antifúngica (SOUZA et al., 2002). De acordo com COSTA et al (2000) *Eugenia dysenterica* tem destacada ação antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*.

3.2.5. *Lippia sidoides*

A planta *Lippia sidoides* Cham. pertence a família Verbenaceae, conhecida popularmente como alecrim-pimenta. É um arbusto caducifólio, ereto, muito ramificado e quebradiço. Apresenta folhas aromáticas e picantes, opostas, simples e pecioladas; flores pequenas, esbranquiçadas, e frutos extremamente pequenos que produzem sementes muito pequenas que raramente germinam (MATOS, 2002; LORENZI & MATOS, 2002).

Seu principal constituinte é o timol, um potente anti-séptico do grupo fenol, com forte atividade contra bactérias e fungos e responsável pelo cheiro característico da planta (MATOS, 1998).

O óleo essencial das folhas, que contém timol e carvacrol como principais constituintes, demonstrou atividades bactericida e fungicida (LEMOS et al., 1990 e LACOSTE et al., 1996). BERTINI et al. (2005), através dos métodos de difusão em disco e Concentração Inibitória Mínima, constataram que o óleo essencial de *L. sidoides* (dentre outras plantas que participaram do estudo), apresentou destacável atividade bactericida sobre estirpes de *Staphylococcus aureus*.

Um estudo realizado com estirpes de *S. aureus* com diferentes perfis de resistência antibiótica, isoladas de material clínico, revelou efetividade do óleo essencial de *Lippia sidoides* na inibição da multiplicação destas, com Concentração Inibitória Mínima de 0,4 µl/mL (OLIVEIRA et al., 2006).

Pesquisas apontam outros espectros de ação da *Lippia sidoides*. A ação antiinflamatória tópica foi observada na redução de até 45% do edema agudo induzido em ratos, bem como a ação de proteção gástrica, minimizando os efeitos deletérios do etanol administrado via oral em ratos (MONTEIRO et al., 2007). Segundo CARVALHO et al. (2003), a planta em estudo demonstrou forte atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* causando 100% de mortalidade quase instantaneamente. Um creme dental preparado com óleo essencial de *Lippia sidoides* testado em cães que apresentavam doenças gengivais, demonstrou uma redução significativa nos parâmetros avaliados, como placa bacteriana, cálculo dental, gengivite e infiltrado inflamatório em relação ao grupo controle (GIRÃO et al., 2003). BOTELHO et al (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana da planta contra microrganismos patogênicos da cavidade oral de humanos e obtiveram resultados muito satisfatórios.

As características fitoquímicas conferem às plantas potencial de atividade antimicrobiana, inclusive sobre agentes etiológicos causadores de enfermidades de grande impacto epidemiológico e econômico na Medicina Veterinária.

3.3. Mastite Bovina

A mastite, processo inflamatório da glândula mamária, é classificada de acordo com a forma de apresentação, podendo ser clínica ou subclínica.

Na mastite clínica evidenciam-se alterações físicas do úbere como edema, dor e hiperemia, e o animal acometido pode apresentar febre e anorexia. Também ocorrem alterações no leite, caracterizadas por aspecto aquoso, presença de grumos e pus (PIANTA, 1997).

Na mastite subclínica não há sinais clínicos, as alterações ocorrem na composição do leite, sendo possível o isolamento do microrganismo patogênico a partir deste (BRAMLEY & DODD, 1994). Esta evolui para a forma clínica da enfermidade, ou tem remissão espontânea, ou ainda pode persistir subclínicamente, o que ocorre na maioria dos tetos acometidos. Deste modo, a mastite subclínica, apresenta grande impacto na produtividade dos animais produtores de leite, já que sua prevalência é maior quando comparada à manifestação na forma clínica (PHILPOT, 1998). Segundo BRANT & FIGUEIREDO (1994), em quatro rebanhos do estado de Minas Gerais, a prevalência da mastite subclínica foi de 42,82% e o percentual de perda de produção foi crescente com o avanço da positividade do California Mastitis Test (CMT).

A saúde da glândula mamária depende de fatores relacionados ao animal, meio ambiente e manejo dos rebanhos, e interfere diretamente na qualidade do leite produzido (SOUZA et al., 2005).

A qualidade do leite *in natura* é influenciada por muitas variáveis, entre as quais se destacam fatores zootécnicos associados ao manejo, alimentação, potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados à obtenção e armazenagem do produto. A obtenção higiênica do leite é estratégia fundamental para promover melhor qualidade do produto (FONSECA & SANTOS, 2000).

A contaminação microbiana do leite pode ocorrer por duas vias principais: através da incorporação de microrganismos que estão presentes no úbere, diretamente para o leite; ou pelo contato do leite com utensílios e equipamentos contaminados durante as operações de ordenha ou da coleta e armazenamento (FEHLHABER &

JANESTSCHKE, 1995). Neste último caso, deve-se ressaltar a importância do ser humano como reservatório e veiculador do *S. aureus* (JAY, 1994).

Segundo AMARAL (1999) o ser humano é capaz de interferir na tríade causal da mastite. Sua atuação sobre o agente etiológico ocorre através do uso indiscriminado e inadequado de antibióticos, favorecendo o surgimento de estirpes resistentes. O ambiente sofre sua intervenção direta, facilitando a contaminação e disseminação do microrganismo. E o melhoramento genético animal, realizado pelo ser humano, pode diminuir a resistência desses hospedeiros.

3.3.1. Etiologia: *Staphylococcus aureus*

A mastite é um processo de caráter principalmente infeccioso, na qual está envolvida uma série de microrganismos, comumente bactérias, com predominância dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (LANGONI, 2007; SCHOCKEN et al., 1996).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, são bactérias Gram positivas, imóveis, agrupadas em massas irregulares ou cachos de uva, aeróbias ou anaeróbias facultativas e catalase positiva. Os *Staphylococcus aureus* são coagulase positivos, β -hemolíticos e fermentadores de manitol. Apesar de classificados como microrganismos mesófilos, demonstram crescimento em temperaturas entre 7,0 e 47,8°C (JAY, 1994).

As células de *Staphylococcus aureus* apresentam alguns componentes de superfícies e produzem várias substâncias extracelulares que contribuem para a sua virulência. Dentre elas destacam-se os ácidos teicóicos, proteína A, adesinas, hemolisinas e outras enzimas que contribuem para a sua aderência, efeitos antifagocitários, lesão plaquetária e reações histamínicas. Tais fatores de virulência estão relacionados à sua patogenicidade, e são mediados por genes plasmidiais. Assim, utiliza-se de diversas estratégias para sobrepujar as defesas microambientais do hospedeiro infectado (PEREIRA, 1995).

A capacidade deste gênero em formar biofilmes em tecidos infectados é mais um fator de virulência, pois protege os microrganismos da ação fagocitária do sistema

imunológico e provavelmente confere uma resistência inata à maioria dos antimicrobianos disponíveis no mercado (MELCHIOR et al., 2006). De acordo com COSTERTON et al. (1999), os biofilmes são constituídos de bactérias aderidas a qualquer superfície, envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos. MELO (2008) revelou que 85% a 98,9% das estirpes de *S. aureus* isoladas de mastite bovina subclínica, foram produtoras de biofilme.

Assim, afeta diretamente a condição de resposta do sistema imunológico do hospedeiro e pode permanecer na glândula mamária em forma de abscessos tornando a mastite subclínica persistente (ZECCONI & HAHN, 2000). Ao assumir um caráter de cronicidade, danifica o epitélio secretor da glândula mamária, prejudica a produção leiteira e dificulta o processo de cura (SABOUR et al., 2004).

Staphylococcus aureus também pode provocar intoxicações na ausência do processo infeccioso, através da ingestão de toxinas previamente formadas no alimento contaminado. As enterotoxinas estafilocócicas são produzidas entre 10 e 46°C, e apresentam elevada resistência térmica, podendo persistir no alimento cozido e no leite pasteurizado (SMITH et al., 1983).

Embora existam variações nas taxas de isolamento (conforme autor e região), *Staphylococcus aureus* está dentre os microrganismos mais prevalentes mundialmente nos rebanhos leiteiros (TOLLERSRUD et al, 2000). Nas principais bacias leiteiras do estado de São Paulo, houve isolamento de 5.216 estirpes de microrganismos em amostras de leite, dos quais 65,5% eram *Staphylococcus* coagulase positivo (COSTA et al., 2000). NADER et al (1985), na região de Ribeirão Preto (SP), obteve uma prevalência de 52,1% do agente. No estado do Paraná, VOLTOLINI et al. (2001), isolaram *Staphylococcus* coagulase positivo em 49% das amostras analisadas.

Concluindo, a bactéria *Staphylococcus aureus* destaca-se como o microrganismo causador de mastite contagiosa de maior importância, de maior ocorrência nos rebanhos mundiais, e de tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antibióticos, bem como o microrganismo patogênico mais frequentemente isolado no leite cru (ZECCONI & HAHN, 2000). Em levantamentos epidemiológicos nacionais e

internacionais, o *S. aureus* está presente em grande parte das infecções da glândula mamária dos bovinos leiteiros (BRABES et al., 1999; FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

3.3.2. Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico da mastite incluem exames microbiológicos, Contagem de Células Somáticas (CCS), California Mastitis Test (CMT), dentre outros.

O exame microbiológico é considerado o método padrão para determinação da saúde do úbere e para o diagnóstico da mastite bovina, sendo que o seu principal objetivo é oferecer resultados rápidos e seguros para identificar os problemas do rebanho (BRITO et al., 1995; RADOSTITS et al. 2007).

A CCS identifica o número de leucócitos no leite. Estas células fazem parte dos mecanismos naturais de defesa do animal, migram da corrente circulatória para a glândula mamária e são denominadas células somáticas do leite. Considerando que a invasão da glândula mamária por microrganismos promove aumento do número de leucócitos no leite, logo o estado infeccioso é o principal fator que provoca o aumento na contagem celular (FONSECA & SANTOS, 2000).

O CMT é executado no momento da ordenha e usado mundialmente para o diagnóstico da mastite subclínica. A interpretação do CMT é baseada na observação visual do leite após ser misturado ao reagente. A reação se processa entre o reagente e o material genético das células somáticas presentes no leite, formando um gel, cuja concentração é proporcional ao número de células somáticas (SCHALM & NOORLANDER, 1957).

3.3.3. Tratamento e Controle

O conhecimento sobre os microrganismos e suas interações com a glândula mamária em um determinado ambiente e sistema produtivo são os requerimentos mais importantes no estabelecimento de um sistema de controle efetivo da mastite bovina (MOTA, 2008).

Usualmente, o tratamento da mastite infecciosa é realizado mediante a administração de antimicrobianos, entretanto o alto custo e a resistência bacteriana dificultam este processo.

De acordo com REIS et al (2003), a eficiência da antibioticoterapia como estratégia para o controle de mastite subclínica em animais em lactação não foi efetiva, mesmo em animais que apresentaram alta contagem de células somáticas. ZAFALON et al. (2007) consideraram economicamente inviável o tratamento da mastite subclínica bovina causada por *S. aureus*, durante a lactação.

Estudos de atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais sobre agentes bacterianos da mastite bovina vêm sendo realizados, pois há a necessidade de descobrir novos compostos que sejam eficazes para o controle e tratamento da doença. As soluções aquosa e alcoólica de *Rosmarinus officinalis* e o extrato de *Mimosa tenuiflora*, respectivamente, inibiram a multiplicação *in vitro* de *S. aureus* (SOUZA & CONCEIÇÃO, 2007; PEREIRA et al., 2009). Do mesmo modo, LOGUERCIO et al. (2006) constataram que 94,4% dos *Staphylococcus* sp. e 85,2% dos *Streptococcus* sp., isolados de leite de animais com mastite, foram susceptíveis à própolis.

3.4. Saúde Pública

As intoxicações causadas por *Staphylococcus aureus* e as consequências para a saúde humana da veiculação de suas toxinas através do alimento apresentam implicações importantes em saúde pública. Discute-se ainda a possibilidade de veiculação das toxinas não apenas através do leite cru contaminado, mas também por produtos lácteos termicamente tratados (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004; CUNHA & CUNHA, 2007).

ROSEC et al. (1997), analisando queijos elaborados com leite cru, observaram a presença de toxina do tipo C em 73,7% das 61 amostras analisadas. Na Inglaterra, BONE et al. (1989) relataram que queijos fabricados com leite de ovelhas que continham enterotoxina foram responsáveis por casos de intoxicação alimentar, e concluíram que a contaminação por *S. aureus* não ocorreu no processo de elaboração

dos queijos, mas sim devido a algum tipo de infecção sofrida pelos animais na propriedade.

A simples presença de estirpes toxigênicas de *S. aureus* no leite não implica, necessariamente, na ocorrência de intoxicações em seres humanos, porém o risco existe e é maior para crianças, principalmente em tenra idade. A percepção de risco é aumentada, principalmente ao se considerar que esse microrganismo é o mais envolvido nas infecções intramamárias de rebanhos leiteiros, com prevalência de estirpes com elevado potencial toxigênico (CARDOSO et al., 2000; FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

Estudo realizado por BRABES et al (1999) identificaram 16 estirpes produtoras de enterotoxinas em 127 amostras oriundas de animais do estado de Minas Gerais e São Paulo, evidenciando risco à saúde humana e tendo como fator agravante o fato da maioria destes animais apresentarem mastite subclínica. SÁ et al (2004), verificaram uma ocorrência de 4,39% de *S. aureus* produtor de enterotoxina, em leite proveniente de vacas com mastite subclínica. Uma pesquisa realizada no estado de Pernambuco revelou a predominância de *S. aureus* como estirpe produtora de enterotoxina em leite *in natura*, e atribuiu tal resultado à manipulação inadequada do leite e/ou à recontaminação durante o seu armazenamento e distribuição (STAMFORD et al., 2006).

Outra questão a ser abordada de forma também relevante, no que se refere à saúde pública, é o emprego de diversos antibióticos administrados por diferentes vias e com períodos de tratamento, dosagens e formas de eliminações variáveis, usados para o tratamento de mastite. Tal fato propicia o desenvolvimento de microrganismos patogênicos resistentes, bem como a ocorrência de resíduos de antibióticos no leite (SOUZA & BENEDET, 2000).

A resistência a drogas antimicrobianas tem sido reconhecida desde a introdução de antibióticos na terapêutica clínica. A introdução de novos antibióticos também foi acompanhada pelo surgimento de linhagens resistentes. Os mecanismos pelos quais os genes de resistência se movimentam entre os organismos são complexos e o desenvolvimento de diferentes mecanismos bioquímicos que conferem multirresistencia

requer uma grande versatilidade genética (PEREIRA et al., 1997). No caso do *S. aureus*, a resistência múltipla resulta da presença de plasmídeos, mutações cromossômicas e de elementos transponíveis (HIRAMATSU et al., 2001). Segundo TORTORA (2000), o aparecimento e a dispersão de novas variedades de microrganismos resistentes é o principal problema gerado pelo uso de drogas antimicrobianas nas condições anteriormente descritas.

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite, conseqüente dos tratamentos aplicados no animal em lactação, gera sérios prejuízos não apenas para o consumidor, mas também para a indústria, uma vez que diminui ou inibi a atividade das bactérias lactofermentadoras, minimizando o aproveitamento da matéria-prima (VILELA, 1984).

No que diz respeito ao aspecto de segurança alimentar, que tem sido tema científico, político e econômico, os países têm demonstrado uma preocupação com a busca de alternativas mais eficientes para controle e garantia da inocuidade dos alimentos.

Assim, diante dos fatos apresentados, o emprego de novas terapêuticas pode atuar de forma mais eficiente gerando um produto final de melhor qualidade, para beneficiar consumidores, produtores, indústria e meio ambiente.

Para suprir tais necessidades, a utilização de espécies vegetais com atividade antimicrobiana e a prospecção de moléculas ativas, tornam-se uma possibilidade terapêutica muito promissora. O Brasil, rico em biodiversidade, apresenta espécies vegetais alvo, que poderão compor um medicamento antimicrobiano.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Colheita das espécies vegetais

As espécies alvo foram: *Lippia sidoides* (folha), *Cochlospermum regium* (casca, entre casca e cerne da raiz), *Baccharis dracunculifolia* (folha), *Croton antisyphiliticum* (raíz) e *Eugenia dysenterica* (folha).

As plantas foram coletadas no município de Araxá - MG, na reserva ecológica Ecocerrado Brasil, localizada a margem da BR 262, no Km 715 (Lat. 19° 36' 47,1''S; Long. 47° 08' 20,9''W e 939m). As identificações taxonômicas foram realizadas por especialistas e as exsiccatas (amostra de planta seca, fixada em uma cartolina, acompanhada de uma etiqueta contendo informações sobre o vegetal e o local de coleta) foram depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

As plantas que demonstraram melhor potencial de atividade antimicrobiana foram coletadas novamente e submetidas a novos ensaios. As datas de coleta, identificações botânicas (vouchers) e instituição que realizou as identificações taxonômicas, estão contidas na Tabela 1.

Esse trabalho obteve autorização especial de acesso e de remessa de amostra de componentes do patrimônio genético emitido pelo IBAMA (Processo 02001.000466/2009-77).

Tabela 1. Lista de material herborizado depositado no Herbário de Plantas Medicinais da UNAERP.

Espécie vegetal	Datas de coleta	Voucher	Especialista Instituição
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Janeiro/2007 Janeiro/2009	1388	Inês Cordeiro Instituto de Botânica-SP.
<i>Cochlospermum regium</i>	Janeiro/2007	1389	Inês Cordeiro Instituto de Botânica-SP.
<i>Croton antisyphiliticus</i>	Janeiro/2007 Janeiro/2009	1390	Inês Cordeiro Instituto de Botânica-SP.
<i>Eugenia dysenterica</i>	Janeiro/2007	1391	Inês Cordeiro Instituto de Botânica-SP.
<i>Lippia sidoides</i>	Janeiro/2007	1392	Maria de Fátima Salimena Universidade Federal de Juiz de Fora-MG

4.2. Obtenção dos extratos brutos

O material vegetal (partes aéreas e sistema radicular) foi seco em estufa com circulação forçada de ar a 50°C (Figura 1), em seguida pulverizado em moinho de faca (Marconi ®) e peneirado até a obtenção de material com partículas de 40 mesh (Figuras 2 e 3). Para a preparação dos extratos, o material vegetal em pó foi pesado e dividido em três partes iguais, colocados em frascos separados e acrescentados os diferentes solventes: metanol (solvente polar), clorofórmio (média polaridade) e hexano (solvente apolar), obtendo soluções com concentração final de 10%.



Figura 1. Folhas secas de *Eugenia dysenterica*.



Figura 2. Moagem do material vegetal seco em moinho de faca.



Figura 3. Material vegetal em pó, resultante da moagem.

O processo de maceração foi estático, em temperatura ambiente, com homogeneizações diárias por sete dias (Figura 4). Posteriormente, as soluções foram filtradas em papel filtro Whatman n°1 e rotaevaporadas, para evaporação dos solventes e concentração das amostras (Figuras 5 e 6).

O processo de obtenção dos extratos foi executado no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da UNAERP.



Figura 4. Processo de maceração estática.



Figura 5. Filtração.



Figura 6. Rotaevaporação.

Para a viabilização dos ensaios com os isolados das bactérias, foi necessária a solubilização dos extratos brutos.

Foram avaliadas diversas substâncias, quanto à capacidade de solubilizar o material vegetal e quanto à atividade inibitória que poderia exercer na multiplicação das bactérias. Concluída a análise, definiu-se a utilização do dimetilsulfóxido (DMSO), solvente polar utilizado em escala industrial, acrescido de Tween 80 (preparado em uma solução a 10%), substância caracterizada como surfactante com grupos hidrofílicos e lipofílicos em suas moléculas. Assim, o DMSO apresentou-se em uma concentração final de 20% no extrato solubilizado (Figuras 7 e 8).

A partir de cada parte vegetal selecionada foram produzidos 03 extratos, utilizando os 03 solventes diferentes (metanol, clorofórmio e hexano). Findo o processo foram obtidos 21 extratos, dos quais 15 foram passíveis de solubilização de acordo com o padrão anteriormente descrito, com concentração final de 10 mg/mL.

Na segunda coleta, os extratos hexânico de *Baccharis dracunculifolia* e clorofórmico de *Croton antispyhiliticus* sofreram o mesmo processo de obtenção e solubilização, porém foram preparados na concentração de 200 mg/mL.



Figura 7. Extrato clorofórmico de *Croton antisiphiliticus*.

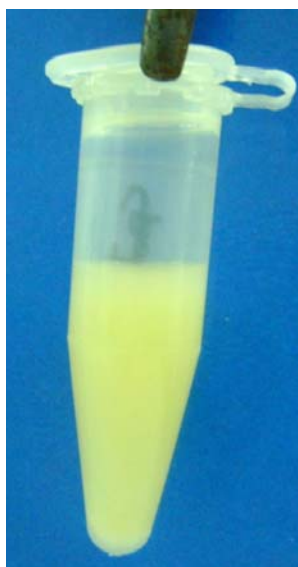


Figura 8. Extrato solubilizado de *Croton antisiphiliticus* com 20% de DMSO.

4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

O experimento foi dividido em duas etapas (Tabela 2).

Na primeira, os extratos com concentração final de 10 mg/mL, foram analisados frente a cinco estirpes de *Staphylococcus aureus*, oriundas de leite e de fontes de contaminação da mastite bovina, e uma estirpe padrão ATCC 25923. Para avaliação da atividade antimicrobiana, foram utilizados os métodos de Difusão em Disco e Microdiluição em Placa.

Na segunda etapa do experimento, após a escolha dos extratos mais ativos, foram realizadas novas coletas de material vegetal, preparados novos extratos, na concentração de 200 mg/mL, e testados frente 20 estirpes de *Staphylococcus aureus*. Nesta fase, aplicou-se apenas a técnica de Microdiluição em Placa.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

O experimento foi executado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da UNAERP, estado de São Paulo.

Tabela 2. Descrição das etapas do experimento e suas condições: data de realização, quantidade e concentração dos extratos, estirpes selecionadas de *Staphylococcus aureus* e métodos utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana.

Etapas do experimento	Data de realização	Quantidade de extratos	Concentração dos extratos	Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Avaliação da atividade antimicrobiana
1	Janeiro 2007	15	10 mg/mL	5 oriundas de isolamento 1 ATCC	Difusão em Disco Microdiluição em Placa
2	Janeiro 2009	2	200 mg/mL	19 oriundas de isolamento 1 ATCC	Microdiluição em Placa

4.4. Estirpes de *Staphylococcus aureus*

Dentre as 20 estirpes de *Staphylococcus aureus* utilizadas neste experimento, 19 foram obtidas por ZAFALON (2007) e FERREIRA (2008) de propriedades rurais de exploração leiteira localizadas na região nordeste do estado de São Paulo e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Antonio Nader Filho docente do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da UNESP - Jaboticabal, cujos isolamentos foram realizados a partir do desenvolvimento de projeto Auxílio Pesquisa, apoiado pela FAPESP (05/53856-3). E uma estirpe padrão ATCC 25923. As procedências destas estirpes estão reportadas na Tabela 3.

As culturas bacterianas foram desenvolvidas no meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) por 24 horas e diluídas de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland (corresponde a cerca de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL), padrão de turvação frequentemente utilizado para estimar a população bacteriana em meios líquidos de cultivo.

A gentamicina foi utilizada como controle devido à considerável atividade exercida sobre os *Staphylococcus aureus* isolados tanto em casos de mastite tratados no período de lactação, quanto em microrganismos isolados do leite de animais enfermos (ZAFALON et al., 2007; NADER FILHO et al., 2007). No início de cada etapa determinou-se a sensibilidade das estirpes frente a tal antibiótico, através do método de difusão em disco e microdiluição em caldo (Concentração Inibitória Mínima).

Tabela 3. Procedência das estirpes de *Staphylococcus aureus*, segundo ZAFALON (2007) e FERREIRA (2008).

N° de identificação das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Origem do isolamento
14	Leite
21	Leite
66	Leite
70	Leite
75	Leite
94	Mão do ordenhador
98	Ósteo papilar
100	Ósteo papilar
112	Insuflador da ordenhadeira
114	Fossas nasais do ordenhador
118	Garganta do ordenhador
130	Fossas nasais do ordenhador
148	Insuflador da ordenhadeira
152	Insuflador da ordenhadeira
165	Ósteo papilar
173	Leite
182	Insuflador da ordenhadeira
189	Insuflador da ordenhadeira
199	Leite
ATCC	25923

4.5. Método de Difusão em Disco

Para avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos extratos das plantas foi inicialmente aplicada a técnica de difusão em disco, de acordo com BAUER et al (1966).

As culturas bacterianas diluídas (escala 0,5 de Mc Farland) foram semeadas na superfície de ágar Mueller-Hinton em placas de Petri estéreis e discos de papel de filtro autoclavados, impregnados com extratos vegetais na concentração de 10 mg/mL, foram adicionados sobre a superfície do ágar inoculado. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 48 horas, a 37°C. Os halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos em milímetros com auxílio de uma régua milimetrada.

Foi realizado o controle negativo dos solventes (metanol, clorofórmio e hexano) e do veículo utilizado na solubilização dos extratos (DMSO 20%).

4.6. Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida pela menor concentração da substância antimicrobiana capaz de inibir a multiplicação de um isolado bacteriano. Foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com a descrição em CLSI (2003), com as mesmas culturas bacterianas utilizadas no método de difusão em disco.

Foram utilizadas microplacas estéreis com fundo em “U” contendo 96 orifícios. A primeira coluna recebeu 100µL do extrato na concentração inicial e 100µL do meio de cultura líquido BHI, e as demais colunas receberam apenas 100µL do meio de cultura. Para diluição sucessiva, foram pipetados 100µL da solução contida na primeira coluna (extrato e meio de cultura) e despejados na segunda coluna (que continha apenas meio de cultura). Após homogeneização, 100µL da solução contida nos poços da segunda coluna, foram pipetados e despejados na coluna seguinte, e assim sucessivamente. Ao fim do processo de diluição do extrato, 100µL da cultura bacteriana foram acrescentados em cada poço. As concentrações finais dos extratos variaram entre 100 - 0,84 mg/mL.

Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas, a 37°C. Para leitura, que foi realizada visualmente, foram adicionados 50µL de tetrafeniltetrazóico (TTC) em cada orifício, indicador de multiplicação bacteriana, que apresenta coloração avermelhada na presença de células viáveis.

4.7. Concentração Bactericida Mínima

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração do antimicrobiano necessária para inviabilizar a célula microbiana. Quando os valores da CBM são comparados com a CIM, pode-se avaliar se o composto é bactericida ou bacteriostático (BARON & FINEGOLD, 1990).

Para determinação da CBM, segundo SMITH-PALMER (1998) com modificações, retirou-se uma alíquota do material contido nos orifícios que demonstraram inibição no desenvolvimento bacteriano no método de CIM, e semeou-se

em placa de Petri estéril contendo meio de cultura Agar BHI. Após incubação em estufa bacteriológica por 24 horas, a 37°C, as culturas foram inspecionadas visualmente e os resultados foram interpretados da seguinte maneira: multiplicação bacteriana significou ação bacteriostática e ausência de desenvolvimento do microrganismo significou ação bactericida.

4.8. Análise Estatística

Foi calculado o coeficiente Kappa para avaliar o grau de concordância entre os métodos de difusão em disco e microdiluição em caldo, aplicados para determinação do perfil de sensibilidade das estirpes de *Staphylococcus aureus* frente ao antibiótico gentamicina. Esta medida de concordância tem como valor máximo o 1, que representa total concordância e os valores próximos e até abaixo de 0, indicam nenhuma concordância, ou a concordância foi exatamente a esperada pelo acaso (PEREIRA, 2000).

V. RESULTADOS

5.1. Difusão em disco

Na técnica de difusão em disco, os resultados obtidos com os extratos em estudo, a partir de diferentes solventes (metanol, hexano e clorofórmio), na concentração de 10 mg/mL, não produziram halos de inibição para o microrganismo testado, sugerindo ausência de atividade antimicrobiana sobre estirpes de *Staphylococcus aureus*. Os discos utilizados como controle negativo (veículo e solvente), também não demonstraram qualquer atividade inibitória sobre *S. aureus* (Figura 9).

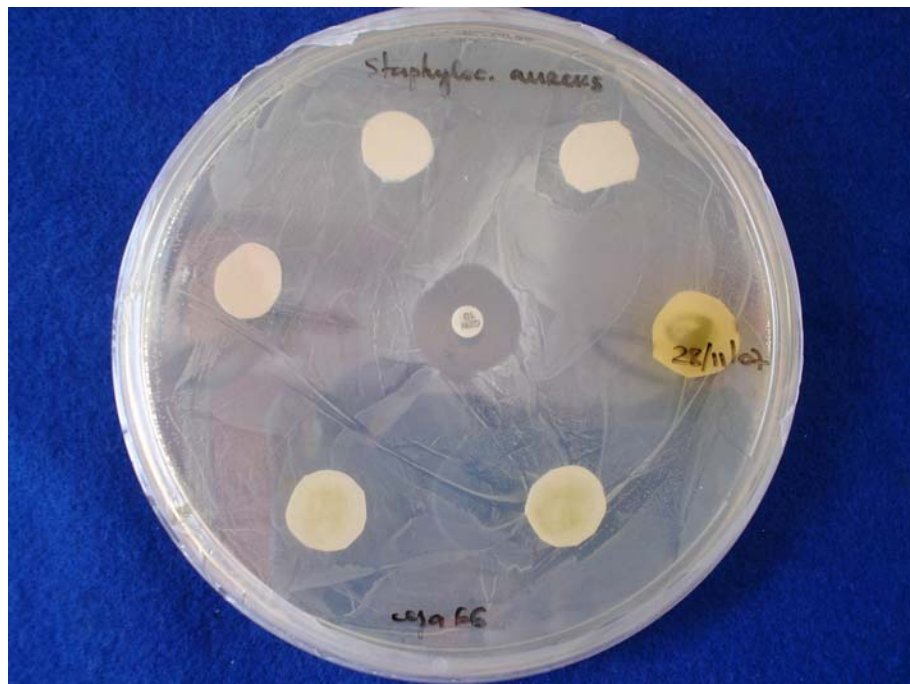


Figura 9. Método de difusão em disco, sem formação de halo de inibição em torno dos discos contendo extrato vegetal. Os dois discos superiores receberam os controles negativos (veículo e solvente), os quatro discos posicionados mais inferiormente receberam o extrato vegetal na concentração de 10 mg/mL e o disco central com gentamicina (controle positivo), único que inibiu multiplicação bacteriana.

5.2. Microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

No método de microdiluição em caldo, alguns extratos apresentaram atividade antimicrobiana. Os valores de CIM foram obtidos por diluições sucessivas e determinados por leitura visual (Figura 10).

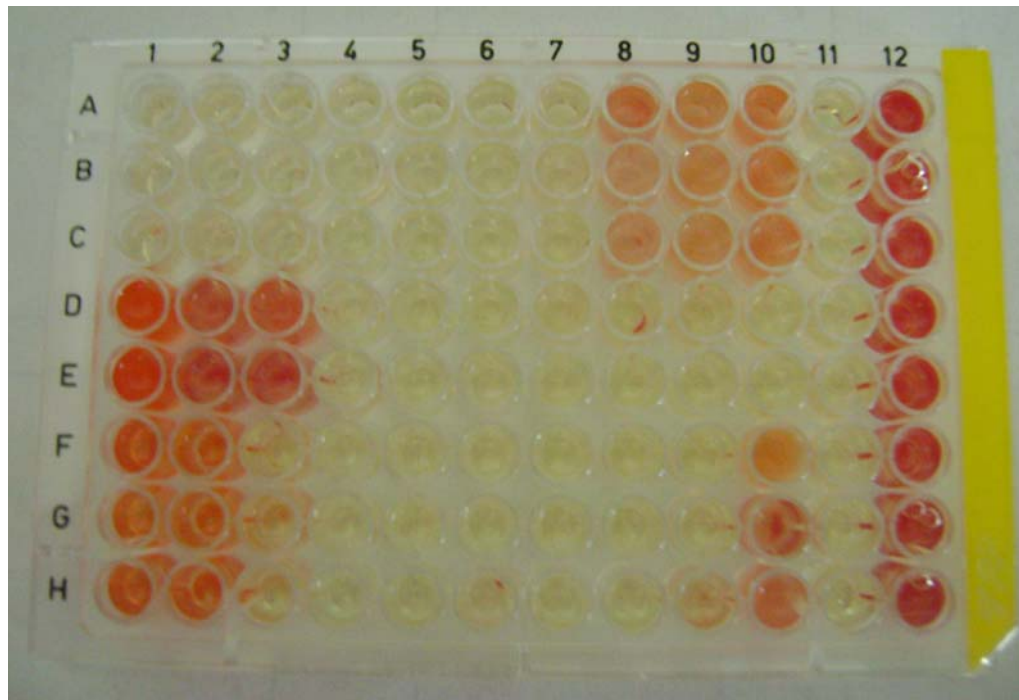


Figura 10. Método de microdiluição em caldo, utilizando o revelador tetrafeniltetrazóico, que indica viabilidade celular na coloração avermelhada.

A Tabela 4 demonstra as concentrações inibitórias mínimas dos extratos metanólico, clorofórmico e hexânico, preparados a partir das folhas de *Baccharis dracunculifolia*, na concentração de 10 mg/mL. Dentre as seis estirpes testadas, os extratos metanólico e clorofórmico inibiram a multiplicação de uma estirpe de *Staphylococcus aureus*, sendo esta ATCC 25923, com CIM de 0,50 mg/mL; enquanto o extrato hexânico apresentou CIM de 0,50 mg/mL sobre duas estirpes oriundas de

isolamento. Através do método de Concentração Bactericida Mínima determinou-se a atividade bacteriostática dos extratos de *Baccharis dracunculifolia*.

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos metanólico, clorofórmico e hexânico de *Baccharis dracunculifolia*, frente seis estirpes de *Staphylococcus aureus*.

Extratos <i>Baccharis dracunculifolia</i> (10 mg/mL)	Quantidade de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	CIM (mg/mL)	CBM
Metanólico	01/06 (ATCC)	0,50	BT
Clorofórmico	01/06 (ATCC)	0,50	BT
Hexânico	02/06	0,50	BT

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; BT: Atividade Bacteriostática

Os extratos de *Cochlospermum regium* obtidos a partir de diferentes partes da raiz da planta (casca, entre casca e cerne), utilizando os solventes metanol, clorofórmio e hexano, não demonstraram inibição na multiplicação do agente *Staphylococcus aureus*, nas concentrações testadas.

Resultados semelhantes foram observados com a planta *Eugenia dysenterica*, cujos extratos preparados a partir da folha, na concentração de 10 mg/mL, não demonstraram atividade antimicrobiana.

Para os extratos que não apresentaram atividade antimicrobiana, não foram realizados os testes de Concentração Bactericida Mínima.

No estudo realizado com *Croton antisiphiliticus*, o extrato metanólico, preparado a partir da raiz da planta, não inibiu a multiplicação da bactéria *S. aureus*, nas concentrações testadas. Porém, os extratos clorofórmico e hexânico, que apresentaram atividade bactericida, demonstraram expressiva atividade antimicrobiana, atuando sobre cinco, das seis estirpes em teste (incluindo a ATCC 25923), com CIM variando entre 0,12 mg/mL e 0,50 mg/mL (Tabela 5). Não foi observada inibição apenas sobre a multiplicação da estirpe identificada com o número 112, oriunda do insuflador da ordenhadeira.

Conforme demonstrado na Tabela 6, o extrato metanólico de *Lippia sidoides*, nas concentrações testadas, não atuou sobre as bactérias. Já o extrato hexânico, atingiu CIM de 0,50 mg/mL, sobre duas estirpes de campo de *S. aureus* e apresentou atividade bactericida.

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos metanólico, clorofórmico e hexânico de *Croton antisiphiliticus*, frente seis estirpes de *Staphylococcus aureus*.

Extratos <i>Croton antisiphiliticus</i> (10 mg/mL)	Quantidade de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	CIM (mg/mL)	CBM
Metanólico	*	*	-
Clorofórmico	04/06 (ATCC)	0,12	BC
	01/06	0,50	
Hexânico	03/06 (ATCC)	0,12	BC
	01/06	0,25	
	01/06	0,50	

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; *Não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas; - Não realizado; BC: Bactericida

Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos metanólico e hexânico de *Lippia sidoides*, frente seis estirpes de *Staphylococcus aureus*.

Extratos <i>Lippia sidoides</i> (10 mg/mL)	Quantidade de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	CIM (mg/mL)	CBM
Metanólico	*	*	-
Hexânico	02/06	0,50	BC

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; *Não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas; - Não realizado; BC: Bactericida

Desta forma, diante dos resultados observados nesta primeira etapa do trabalho, conclui-se que dentre os extratos com atividade bacteriostática, o extrato hexânico de *Baccharis dracunculifolia* destacou-se atuando sobre 2/6 das estirpes de *S. aureus*. Enquanto, dentre os extratos com atividade bactericida, o extrato clorofórmico de *Croton antisiphiliticus* evidenciou atividade inibitória em 5/6 das estirpes.

Assim, determinou-se a segunda fase do experimento na qual a metodologia aplicada estendeu-se a avaliação dos dois extratos acima mencionados.

Após nova coleta de material vegetal, os extratos foram preparados na concentração de 200 mg/mL e ensaiados sobre as 20 estirpes de *Staphylococcus aureus* selecionadas.

O extrato hexânico de *Baccharis dracunculifolia*, apresentou CIM de 10mg/mL, sobre 9/20 das estirpes oriundas de isolamento, enquanto o extrato clorofórmico de *Croton antysiphiliticus* atuou expressivamente sobre 20/20 das estirpes, das quais sobre 17, apresentou CIM de 1,03 mg/mL, e sobre as estirpes restantes (incluindo ATCC 25923) obteve CIM de 4,15mg/mL (Tabela 7).

Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hexânico de *Baccharis dracunculifolia* e do extrato clorofórmico de *Croton antysiphiliticus*, na concentração de 200 mg/mL, frente 20 estirpes de *Staphylococcus aureus*.

Extratos (200 mg/mL)	Quantidade de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	CIM (mg/mL)
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	09/20	10
<i>Croton antysiphiliticus</i>	17/20 03/20 (ATCC)	1,03 4,15

Ao analisar o padrão de sensibilidade das estirpes de *Staphylococcus aureus* frente à gentamicina nos diferentes métodos aplicados (Tabela 8), notou-se que no método de difusão em disco 14/20 das estirpes mostraram-se resistentes ao antibiótico; enquanto no método de microdiluição em placa, 15/20 das estirpes foram resistentes à gentamicina. No método de microdiluição em placa, foram consideradas resistentes, estirpes que se multiplicaram na concentração de gentamicina igual ou maior a 10µg (mesma concentração do disco utilizado no método de difusão em disco).

Tabela 8. Padrão de sensibilidade das estirpes de *Staphylococcus aureus* frente à gentamicina, por meio dos métodos de difusão em disco e microdiluição em placa.

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Método Difusão em Disco (10µg)	Método Microdiluição em Placa (MIC)
Resistentes	14/20	15/20
Sensíveis	06/20	05/20

Para a comparação entre os resultados das duas provas foi calculado o coeficiente Kappa, que interpretado de acordo com os critérios adotados por PEREIRA (2000), revelou um bom grau de concordância ($Kappa = 0,63$).

Em resumo, o extrato hexânico de *Baccharis dracunculifolia*, com atividade bacteriostática, inibiu a multiplicação de 45% das estirpes analisadas. O extrato clorofórmico de *Croton antisyphiliticus*, com atividade bactericida, apresentou atividade antibacteriana sobre 100% das estirpes de *S. aureus*. Ressaltando que apenas 25% das estirpes foram sensíveis a gentamicina.

Desta forma, ao confrontar os resultados apresentados pelos extratos em estudo com os resultados apresentados pela gentamicina, antibiótico, muitas vezes, de escolha para o tratamento da mastite bovina e amplamente utilizado, é evidente a superioridade dos extratos na inibição da multiplicação do *Staphylococcus aureus*, com destaque para o extrato clorofórmico de *Croton antisyphiliticus*, que foi capaz de inibir 100% das estirpes (Gráfico 1).

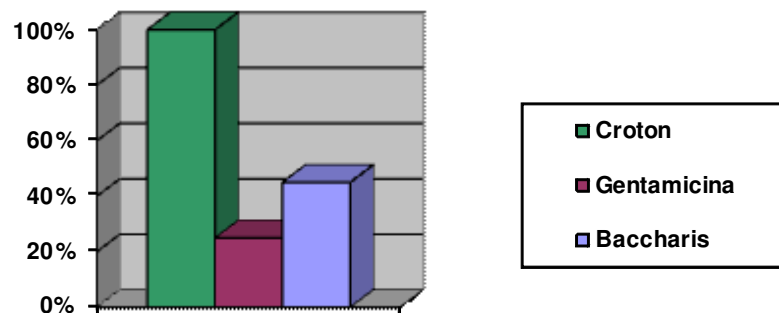


Gráfico 1. Comparativo entre a atividade inibitória do extrato hexânico de *Baccharis dracunculifolia*, do extrato clorofórmico de *Croton antisyphiliticus* e do antibiótico gentamicina, sobre estirpes de *Staphylococcus aureus*.

VI. DISCUSSÃO

Em se tratando de avaliação de produtos naturais, SILVEIRA et al. (2009) relatam dificuldades na padronização e comparação de técnicas de difusão em disco, devido à interferência das características do extrato na capacidade de difusão. RIBEIRO & SOARES (2000) afirmam que as características de solubilidade do material em teste interferem na difusão do mesmo no meio de cultura. ALVES et al. (2008) compararam técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras, e concluíram que o método de microdiluição em caldo é a melhor opção, quando comparado com técnicas de difusão em disco. Segundo ELOFF (1998), a sensibilidade da técnica de microdiluição em placa para determinação da CIM de extratos de plantas é 32 vezes maior que a técnica de difusão em disco.

Portanto, as divergências entre os resultados obtidos pelo método de difusão em disco, que sugeriram ausência de atividade antimicrobiana dos extratos em estudo sobre o agente *Staphylococcus aureus*, e por meio do método de microdiluição em caldo, no qual, alguns extratos apresentaram considerável atividade antimicrobiana, podem ser imputadas às características dos extratos e à sensibilidade dos testes aplicados.

De acordo com DA SILVA FILHO et al. (2008), a atividade antimicrobiana do extrato bruto da folha de *Baccharis dracunculifolia* em diclometano, sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 4330, foi atribuída aos triterpenos ácido ursólico e 2 α -hidroxi ácido ursólico isolados do extrato. Enquanto PARK et al. (2004) afirmaram que outro composto extraído de *B. dracunculifolia*, denominado de Artepillin C, também é responsável por tal atividade. Segundo FERRONATO et al. (2007), substâncias voláteis presentes no óleo essencial de *B. dracunculifolia* inibiram a multiplicação do agente *Staphylococcus aureus*.

Neste sentido, há relatos que determinam a ação antimicrobiana de outras espécies de *Baccharis* sobre a mesma bactéria, como *B. trimera* (AVANCINI et al.,

2000) e *B. nitida* (RANGEL et al., 2001). SCHUCH et al. (2008) através da produção de solução desinfetante a partir de folhas e talos de *Baccharis trimera*, avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro* frente a microrganismos relacionados à mastite bovina, e concluíram que houve inativação total dos três agentes infecciosos testados (*S. agalactiae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*) e redução da concentração de *S. aureus* quando testado na presença de matéria orgânica.

No presente estudo, os resultados obtidos com os extratos de *Baccharis dracunculifolia* frente ao agente *S. aureus*, corroboram com os dados relatados pelos autores acima descritos. Com destaque para o extrato hexânico, que embora não tenha inibido a multiplicação da ATCC 25923, atuou sobre 45% das estirpes de campo analisadas, com CIM de 10 mg/mL.

Os extratos preparados a partir de partes distintas da raiz de *Cochlospermum regium* não apresentaram atividade antibacteriana, divergindo dos dados descritos por OLIVEIRA et al. (1996), que demonstraram atividade do extrato hexânico frente *S. aureus* e *E. coli*, com efetividade semelhante ao antibiótico vancomicina e cefoxitina. BRUM et al (1997) também evidenciaram atividade do óleo essencial de *C. regium* contra *S. aureus*.

Segundo COSTA et al. (2000), o óleo essencial extraído das folhas de *Eugenia dysenterica* demonstrou considerável atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gatti*. Na presente análise, os extratos metanólico, clorofórmico e hexânico, obtidos a partir das folhas de *E. dysenterica*, não inibiram a multiplicação da bactéria *Staphylococcus aureus*.

O estudo realizado com *Croton antisiphiliticus*, uma planta também endêmica do Cerrado, que até o presente momento não foi investigada quanto à atividade biológica e características químicas, mostrou expressiva atividade bactericida. O extrato clorofórmico (na concentração de 200 mg/mL) destacou-se, atuando sobre 100% das estirpes testadas. A utilização dessa espécie é preconizada por populações para tratar úlceras externas e eczemas. Logo, o presente trabalho vem contribuir para a comprovação da atividade antimicrobiana sugerida em levantamentos etnobotânicos (RODRIGUES & CARVALHO, 2001; RODRIGUES et al., 2002; FENNER et al., 2006).

Diversos estudos têm mostrado a atividade antimicrobiana do óleo de *Lippia sidoides*, a qual tem sido atribuída principalmente ao timol e carvacrol, ambas as substâncias anti-sépticas consagradas (MATOS, 1998; DUARTE et al., 2005). Trabalhos realizados por BERTINI et al. (2005) e OLIVEIRA et al. (2006) mostraram que o óleo essencial de *L. sidoides* inibiu a multiplicação de estirpes de *Staphylococcus aureus*. Neste estudo, o extrato hexânico de *Lippia sidoides* apresentou razoável atividade antimicrobiana, com CIM de 0,50mg/mL.

As discordâncias entre os valores das CIM entre a primeira etapa do experimento (extratos na concentração de 10 mg/mL), e a segunda etapa (extratos na concentração de 200 mg/mL), podem ser atribuídas às possíveis variações químicas dos extratos, uma vez que foram realizadas duas coletas de material vegetal em momentos diferentes.

De acordo com GOBBO – NETO & LOPES (2007) há uma série de fatores que podem influenciar no conteúdo dos metabólitos secundários de plantas medicinais, tais como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, altitude, disponibilidade de nutrientes, exposição à patógenos, entre outros. RIOS e RECIO (2005) revelaram que o maior problema relacionado com pesquisas sobre atividade antimicrobiana de plantas é a falta de uniformidade nos critérios, frequentemente acarretando em relevantes contradições entre os resultados obtidos por diferentes grupos e até para o mesmo autor estudando a mesma amostra com diferentes métodos. Ilustrando tal situação, BORELLA & FONTOURA (2002) encontraram grande variação no teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* comercializadas na região de Ribeirão Preto, e consideraram a influencia não apenas das questões ambientais e de cultivo, como também da preparação e manipulação do material vegetal.

No que diz respeito à procedência e sensibilidade das estirpes, nota-se que a estirpe padrão ATCC 25923, não foi sensível a todos os extratos ensaiados. Os extratos hexânicos de *Baccharis dracunculifolia* e *Lippia sidoides*, embora tenham apresentado razoável atividade antimicrobiana sobre 02/06 das estirpes de *S. aureus*, não inibiram a multiplicação da estirpe padrão. Enquanto a estirpe 112, isolada do insuflador da

ordenhadeira, foi inibida apenas pelo extrato clorofórmico de *Croton antisiphiliticus*. Tais fatos sugerem que características adaptativas das estirpes isoladas das diversas fontes de contaminação envolvidas na mastite bovina, de alguma forma, contribuem ou prejudicam a atuação dos extratos na inibição da multiplicação, como a produção de biofilmes pela bactéria *S. aureus* que dificulta a atuação do antimicrobiano sobre o microrganismo (COSTERTON et al., 1999).

Quanto à padronização da sensibilidade das estirpes de *Staphylococcus aureus* frente à gentamicina, a utilização de ambos os métodos foi preconizada ao longo do experimento, devido a incoerências apresentadas em alguns resultados do método de difusão em disco. Embora o grau de concordância entre os métodos tenha sido bom, segundo análise estatística aplicada, optou-se pelo método da microdiluição em placa para determinação da Concentração Inibitória Mínima como padrão ouro, por ser mais sensível.

VII. CONCLUSÕES

- A metodologia de solubilização padronizada permitiu a avaliação do potencial de atividade antimicrobiana de 15 extratos vegetais sobre estirpes de *Staphylococcus aureus*.

- O perfil de sensibilidade das estirpes frente à gentamicina, antibiótico utilizado como controle positivo, demonstrou grande resistência.

- Em se tratando de avaliação de potencial de atividade antimicrobiana de extratos vegetais, o método de microdiluição em caldo, que determina a Concentração Inibitória Mínima, mostrou-se mais sensível e mais adequado quando comparado ao método de difusão em disco.

- Os extratos vegetais que apresentaram melhor desempenho na inibição da multiplicação bacteriana foram o extrato hexânico de *Baccharis dracunculifolia* e o extrato clorofórmico de *Croton antysiphiliticus*.

- O extrato clorofórmico de *Croton antysiphiliticus* destacou-se por inibir *in vitro* todas as estirpes de *Staphylococcus aureus*, isoladas das diversas fontes de contaminação na cadeia epidemiológica da mastite bovina, e com resultados superiores aos obtidos com a gentamicina.

- O elevado potencial antimicrobiano demonstrado pelo extrato bruto de *Croton antysiphiliticus* evidencia a necessidade de novas investigações, com a finalidade de avaliar a capacidade terapêutica desta planta do Cerrado no tratamento e controle da mastite bovina.

VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Algumas discrepâncias entre as Concentrações Inibitórias Mínimas de um mesmo extrato e com dados de outros autores sugerem que serão necessárias novas pesquisas para assegurar o uso de algumas espécies como antimicrobiano, considerando que variações genéticas e ambientais podem interferir nos resultados.

BARA et al. (2006) enfatiza a necessidade da realização de análises para determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais e análises de identidade e pureza de plantas, pois a utilização de extratos padronizados centrados em grupos específicos de princípios ativos com homogeneidade química do produto, pode contribuir para melhoria da qualidade das matérias-primas vegetais e conseqüentemente dos medicamentos futuramente elaborados (BAUER, 1998; CALIXTO, 2000; CAPASSO et al., 2000).

Desta maneira, o cultivo de plantas medicinais deve substituir a coleta extrativista, não apenas para conservar a ocorrência natural, mas também para minimizar as variações ambientais, do mesmo modo que, no futuro, a clonagem eliminará as variações genéticas, buscando assim, padronização, eficácia e segurança no uso de fitoterápicos.

IX. REFERÊNCIAS

ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; GUZMAN, J.P.; et al. Composição química da *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.909-915, 2005.

ALVES, H.M. Plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n.3, p.10-14, 2001.

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.; CASEMIRO, L.A.; et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v.31, n.5, 2008.

ALHO, C.J.R. Desafios para a conservação do Cerrado, em face das atuais tendências de uso e ocupação. In: SCARIOT, A. SOUSA-SILVA, J.C. FELFILI, J.M. (org) **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005.

AMORIM, E.L.C.; LIMA, C.S.A.; HIGINO, J.S.; et al. Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarma**, v.15, n.1-3, p.66-69, 2003.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; MUNDSTOCK, E. Bacteriostatic and bactericidal activity of the *Baccharis trimera* (Less.) D.C. - Compositae decocto, as disinfectant or antiseptic. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.230-234, 2000.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins (review). **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.1-10, 2000.

BARA, M.T.F.; RIBEIRO, P.A.M.; ARANTES, M.C.B.; et al. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, 2006.

BARON, E.J.; FINEGOLD, S.M. **Bailey & Scott's - Diagnostic Microbiology**, 8 ed. The C.V. Mosby Co: St. Louis, 1990.

BARROSO, G.M.. Compositae - Subtribo Baccharidinae Hoffmann: **Estudo das espécies ocorrentes no Brasil**, p. 28-31, 1976.

BAUER, A.W., KIRB, W.M.M., SHERRIS, J.C. et al. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Pathology**, v.19, p.493-496, 1966.

BAUER, R. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug standards be achieved? **Drug Information Journal**, v.32, p.101-110, 1998.

BENEZ, S. M.; BOERICKE, W.; CAIRO, N. **Manual de Homeopatia Veterinária: Indicações Clínicas e Patológicas - Teoria e Prática**. São Paulo: Ed. Robe. p. 13 - 15, 2002.

BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L.L. de; et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n.3-4, p.80-83, 2005.

BOLDT, P.E. ***Baccharis (Asteraceae)*, a review of its taxonomy, phytochemistry, ecology, economic status, natural enemies and the potential for its biological control in the United States**. Texas: College Station. 1989.

BONE, F.J.; BOGIE, D.; MORGAN-JONES, S.C. Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese. **Epidemiology and Infection**, v.103, p.449-458, 1989.

BORELLA, J.C.; FONTOURA, A. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.2, p.63-67, 2002.

BOTELHO, M.A.; NOGUEIRA, N.A.P; BASTOD, G.M; et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, n.3, p.349-356, 2007.

BOTREL, R.T.; RODRIGUES, L.A.; GOMES, L.J.; et al. Uso da vegetação nativa pela população local no município de Ingaí, MG, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.20, n.1, 2006.

BRABES, K.; CARVALHO, E.P.; DIONÍSIO, F.L.; et al. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas de gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Napgama**, v.3, p.4-11, 1999.

BRAMLEY, A.J.; DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: Mastitis control progress and prospects. **Journal of Dairy Research**, v.51, p.481-512, 1994.

BRANT, M.C; FIGUEIREDO, J.B. Prevalência da mastite subclínica e perdas de produção em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.46, n.6, p.595-606, 1994.

BRITO, M.A.V.P.; CHARLES, T.P. Os males do leite com resíduos. In: BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. **Sanidade do Gado Leiteiro**. Coronel Pacheco: EMBRAPA – CNPGL/São Paulo: Tortuga, p. 63-70, 1995.

BRUM, R.L.; HONDA, N.K.; HESS, S.C.; et al. Antibacterial activity of *Cochlospermum regium* essential oil. **Fitoterapia**, v.68, n.1, p.79, 1997.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.179-189, 2000.

CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; et al. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p.58-65, 2000.

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.7-10, 2000.

CARUZO, M.B.R.; CORDEIRO, I. Sinopse da tribo *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s.) no Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, v.34, n.4, p.571-585, 2007.

CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M.; CRAVEIRO, A.A.; et al. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.4, p.569-571, 2003.

CASTRO, D.B.; SANTOS, D.B.; FERREIRA, H.D.; et al. Citotoxic and mutagenic activity of *Cochlospermum regium* Mart. in mice. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.6, n.3, p.15-19, 2004.

CESCHINI, L.; CAMPOS, E.G. Citotoxic effects of *Cochlospermum regium* Pilger aqueous root extract on mammalian cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, n.2, p.302-305, 2006.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. v. 23, n. 2. 6 ed. Approved standard M7-A6. 2003.

COSTA, B. Homeopatia na cura e prevenção de doenças. **Revista Balde Branco**, p.28-33, 1998.

COSTA, E.O.; GARINO JUNIOR, F.; MELVILLE, P.A.; et al. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. **Revista Napgama**, v. 3, n. 4, p. 6-13, 2000.

COSTA, T.R.; FERNANDES, O.F.; SANTOS, S.C.; et al. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, n.1-2, p.111-117, 2000.

COSTERTON, J. W.; STEWART, PHILIP S.; et al. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v.284, p.1318-1322, 1999.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; et al. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. **Journal Essential Oil Research**, v.7, p. 355-367, 1995.

CUNHA, A.S.; CUNHA, M.R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus*, através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência as drogas. **Saúde e Ambiente em Revista**, v.2, n.1, p.105-114, 2007.

DA SILVA FILHO, A.A.; SOUSA, J.P.B.; SOARES, S.; et al. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Journal of Biosciences**, v.63 p.40-46, 2008.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.305-311, 2005.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, n.8, p. 711-713, 1998.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, p.1315-1320, 2004.

FEHLHABER, K; JANETSCHKE, P. **Higiene Veterinaria de los Alimentos**. Zaragoza : Acribia, 669 p, 1995.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.3, 2006.

FERREIRA, L. M. **Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* envolvidas em casos de mastite bovina**. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal-SP, 2008.

FERRONATO, R.; MARCHESAN, E.D.; PEZENTI, E.; et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, 2007.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle da Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 175p, 2000.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v.11, n.3, p.495-500, 1995.

GIRÃO, V.C.; NUNES-PINHEIRO, D.C.; MORAIS, S.M.; et al. A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease. **Preventive Veterinary Medicine**, v.59, n.1-2, p. 95-102, 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, P.N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, 2007.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G.; RADCLIFFE-SMITH, A. **World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**, v.2, Royal Botanical Gardens, 2000.

HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M.; et al. The emergence and evolution of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiology**, v.9, p.486-493, 2001.

JAY, J.M. **Microbiología Moderna de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 804p, 1994.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 11 ed. São Paulo: Ed Nacional, 1993.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13 ed. São Paulo: Ed. Nacional, 2002.

KIRIZAWA, M. **Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (Mart. & Sch.) Pilger - Cochlospermaceae**. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 1981.

LACOSTE, E.; CHAUMONT, J.P.; MANDIN, D.; et al. Antiseptic proprieties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v.54, n.5, p.228-230, 1996.

LANGONI, H. Mastite bovina conceitos e fundamentos. **Anais do IV Encontro de Pesquisadores em Mastites**, Botucatu: FMVZ - UNESP, 2007.

LEMOS, T. L. G.; MATOS, F.J. A.; ALENCAR, J. W.; et al. Antimicrobial activity of essential oil of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v. 4, p.82-84, 1990.

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

LORENZI, H., MATOS, F.J.A., **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**, Computação gráfica Gomes, O. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MATOS, F.J.A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. - farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, p. 84-87, 1998.

MATOS, F.J.A. **Farmácias Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 4 ed. rev. Ampliada, Fortaleza, Ceará, Brasil. Ed UFC, 267p., 2002.

MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **The Veterinary Journal**, v.171, p.398-407, 2006.

MELO, P.C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção da biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal-SP, 2008.

MYERS, N.R.A.; MITTERMEIER, C.G.; ITTERMEIER, G.B.; et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, n.403, p.853-858, 2000.

MONTEIRO, M.V.; MELO LEITE, A.K. de; BERTINI, L.M.; MORAIS, S.M. de; NUNES-PINHEIRO, D.C. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal Ethnopharmacology**, v.111, n.2, p.378-82, 2007.

MOTA R.A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.2, n.3, p. 57-61, 2008.

NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ROSSI JUNIOR, O.D. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.5, p.53-56, 1985.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A. do; et al. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n.1, p.1-4, 2007.

NAVES, R.V.; BORGES, J.D.; ROCHA, M.R.; et al. Emergência de plântulas de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) em viveiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, n.2, p.37-40, 1992.

NUNES, G.P.; SILVA, M.F.; RESENDE, U.M.; et al. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.2, p. 83-92, 2003.

OLIVEIRA, C.C. de; SIQUEIRA, J.M. de; REZENDE, U.M. Antibacterial Activity of Rhizomas from *Cochlospermum regium*: Preliminary results. **Fitoterapia**, v. 67, n.2, 1996.

OLIVEIRA, F.P. de; LIMA, E.O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.P.; et al. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.510-516, 2006.

PALHARES, D. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae Jussieu). **Lecta-USF**, v.21, n.1-2, p.29-36, 2003.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; et al. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.5, p.1100-1103, 2004.

PEREIRA, A.V.; RODRIGUES, O.G.; LIMA, E.Q.; et al. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extrato de Jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) e antibióticos sintéticos utilizados no tratamento de mastite m bubalinos. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.03, n.01, 2009.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: Teoria e Prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 596p., 2000.

PEREIRA, M.S.V.; SIQUEIRA JUNIOR, J.P. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v.20, p.391-395, 1995.

PEREIRA, M.S.V.; BARRETO, V.P.; SIQUEIRA JUNIOR, J.P. Phage-mediated transfer of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. **Microbios**, v.92, p.147-155, 1997.

PHILPOT, W.N. Programas de qualidade do leite no mundo. **I Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite**, Curitiba - PR, p.01-06, 1998.

PIANTA, C. **Mastite Bovina: Informações ao Produtor**. Porto Alegre: FEPAGRO. Circular Técnica, 15. 1997. 12p.

PIO CORREA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. v.13, p. 513-14, 1975.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W; et al. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2156 p, 2007.

RANGEL, D.; GARCIA, I.; VELASCO, J.; et al. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida*. **Revista de la Facultad de Farmacia**, v.42, p. 35-46, 2001.

REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibiotic therapy for subclinical mastitis control of lactating cows. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.6, 2003.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Eds.). **Cerrado: Ambiente e Flora**. Planaltina: Embrapa Cerrados. p.87-166, 1998.

RIBEIRO, M.C. & SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática: roteiro e manual**. São Paulo: Atheneu, 2000.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p.80-84, 2005.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do Cerrado na região do Alto Rio Grande - MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.1, p.102-123, 2001.

RODRIGUES, L.A.; CARVALHO, D.A. de; GOMES, L.J.; et al. Espécies vegetais nativas usadas pela população local em Luminárias - MG. **Boletim Agropecuário**. Lavras - MG. n.52, p.1-34, 2002.

ROSEC, J.P.; GUIRAUD, J.P.; DALET, C.; et al. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **Journal Food Microbiology**, v.35, p.213-221, 1997.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.S.R.S.; ELIAS, A.O.; et al. 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 Veterinary Research Animal Science**, v.41, n.5, p.321-326, 2004.

SABOUR, P.M.; GILL, J.J.; LEPP, D. et al. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Journal Clinical Microbiology**, v.42, p.3449-3455, 2004.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 4 ed., 1992.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.130, p.199-204, 1957.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.A.; NADER FILHO, A.; AVILA G.P.C.; et al. Sensibilidade dos *Staphylococcus* coagulase positiva, isolados em casos de mastite subclínica bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v.12, n.1, p. 57-63, 1996.

SCHUCH, L.F.D.; WIEST, J.M.; COIMBRA, H.S.; et al. Cinética da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos naturais frente a microorganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.1, p.161-169, 2008.

SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, J.S.; et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de Agar difusão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.90, n.2, p.124-128, 2009.

SMITH, J.L.; BUCHANAN, R.L.; PALUMBO, S.A. Effect of environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. **Journal Food Protection**, v.46, p.545-555, 1983.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against very important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.118-122, 1998.

SOUZA, C.D.; FELFILI J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil, **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.1, p.135-142, 2006.

SOUZA, G.N., BENEDET, H.D. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite de consumo no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínio Candido Tostes**, v.55, n.315, p.156-161, 2000.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; et al. Fatores de 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, L.K.H.; OLIVEIRA, C.M.A. de; FERRI, P.H.; et al. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.3, p.247-249, 2002.

SOUZA, T.M.P.; CONCEIÇÃO, D.M. Atividade antibacteriana do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). 2007. Acesso em 05 de janeiro de 2010 <http://ww4.unianhanguera.edu.br/programasinst/Revistas/revistas2007/veterinaria/Atividade_antibacteriana_do_alecrim.pdf>

STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A.; et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.41-45, 2006.

TOLLERSRUD, T.; KENNY, K.; REITZ JR.; et al. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus spp.* from Europe and the United States. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, n.8, p.2998-3003, 2000.

TORTORA, J. G.; BERDELL, R.; FUNKE; et al. **Microbiologia: An Introduction**. São Paulo: Artmed, 135p, 2000.

TRESVENZOL, L.M; PAULA, J.R.; RICARDO, A.F.; et al. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.1, p.23-28, 2006.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VERDI, L.G., BRIGHENTE, I.M.C., PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspéctos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v.28, p.85-94, 2005.

VILELA, S.C. Identificação rápida de resíduos de antibióticos no leite. **Informe Agropecuário**, v.10, n.115, p.55-56, 1984.

VOLTOLINI, T.V.; SANTOS, G.T.; ZAMBOM, M.A.; et al. Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 961-966, 2001.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; et al. 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.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, v. 345, p. 15-18, 2000.