

UNIVERSIDADE FEDERAL JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Carolina Capobiango Romano Quintão

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOTOXICIDADE DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS FRENTE A
MICROORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA**

Juiz de Fora – MG – Brasil
2009

CAROLINA CAPOBIANGO ROMANO QUINTÃO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOTOXICIDADE DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS FRENTE A
MICROORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA**

Dissertação de Mestrado do Curso
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção do Título
de Mestre em Ciências Biológicas na
área de Genética e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Nádia Rezende Barbosa Raposo

Juiz de Fora – MG – Brasil
2009

QUINTÃO, C.C.R. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e citotoxicidade de substâncias naturais frente a microrganismos causadores de mastite bovina. Juiz de Fora (MG), 2009. 101f. Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

Folha de Aprovação

Carolina Capobiango Romano Quintão

Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e citotoxicidade de substâncias naturais frente a microrganismos causadores de mastite bovina

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Juiz de Fora para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Genética e Biotecnologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profª Drª Nádia Rezende Barbosa Raposo
Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora
Assinatura: _____

Drª Carla Christine Lange
Instituição: Embrapa Gado de Leite
Assinatura: _____

Prof Dr Lyderson Facio Viccini
Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora
Assinatura: _____

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.”

Jonh Ruskein

“A recompensa se encontra no esforço e não no resultado. Um esforço total é uma vitória completa.”

Mahatma Ghandi

“Não há ciência pronta, acabada, dona da verdade. Ela é uma tarefa perene em busca das quase verdades que pode alcançar. Por isso é modesta e é humilde. Não canta vitória antes do tempo e sabe que suas “verdades” podem ser mudadas. Ela é histórica (está se fazendo) e dialética (está sempre questionando suas próprias “verdades”). Duvida de tudo, mas duvida principalmente de si mesma.”

Newton Freire-Maia (1918-2003)

Dedico este trabalho à minha mãe por seu apoio incondicional e incentivo nas horas de desânimo e ao meu pai por seu amor e presença ETERNA em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela proteção e saúde, por iluminar meus caminhos em busca do conhecimento e realização pessoal.

Aos meus pais Lêda e Marco, que sempre acreditaram em mim e muito contribuíram para me tornar à pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos, Nathália e Marcos, pelas palavras de incentivo e coragem.

Ao meu amor Daniel, por sua presença sempre constante em mais essa etapa da minha vida e por seu apoio e compreensão nos momentos difíceis.

À professora e orientadora Dr^a Nádia Rezende Barbosa Raposo, pelos ensinamentos transmitidos, paciência, confiança em mim depositada e pelo exemplo de dedicação à ciência.

Ao prof. Dr Lyderson Facio Viccini, por suas considerações neste trabalho e pela contribuição do laboratório de Genética na preparação dos extratos de *Lippia*.

À Dr^a Carla Christine Lange, por possibilitar o acesso aos microrganismos e por sua boa vontade em auxiliar e contribuir para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À amiga Junya Lacorte por sua amizade, disponibilidade e ajuda em várias etapas desse trabalho. Sua contribuição foi muito importante para os resultados aqui obtidos.

À amiga Aline Siqueira, por seu auxílio e dedicação desde o início dos experimentos e por ter me ajudado a conciliar o trabalho, o mestrado e o casamento em 2007. Sem sua ajuda, teria sido bem mais difícil.

Ao colega de mestrado Rafael Dutra, por seu estudo e ajuda com as sementes de *sucupira*.

Aos colegas da Drogaria onde trabalhei, em especial à Elisama, por entender que este seria um passo importante em minha vida e permitir com que eu conciliasse o trabalho e o mestrado.

Ao Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, pela oportunidade de realizar os experimentos de citotoxicidade no Laboratório de Reprodução Animal, e por suas sugestões para o trabalho.

À amiga Dr^a Raquel Varella Serapião, por sua ajuda nos ensaios com as células e por seus conselhos, amizade e apoio nos momentos difíceis.

A todos os colegas do Laboratório de Reprodução animal da Embrapa Gado de Leite pela ajuda e compreensão.

Aos amigos, Meriane, Rodrigo, Camila e Chico, pelos momentos de alegria e descontração proporcionados ao longo deste percurso.

Aos colegas de mestrado, em especial Sabine, Débora e Ríbrio, pela amizade e ajuda com as disciplinas, trabalhos, relatórios.

Aos funcionários e estagiários do NIQUA, obrigada pela colaboração.

Aos meus familiares pela compreensão e incentivo.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biotecnologia pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

À todos que, eventualmente eu possa ter esquecido de agradecer, mas que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

QUINTÃO, C.C.R. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e citotoxicidade de substâncias naturais frente a microrganismos causadores de mastite bovina.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

O uso de plantas medicinais para o tratamento de muitas doenças está associado à medicina popular de diferentes partes do mundo. A cada dia, os microrganismos que causam prejuízos à saúde humana e animal têm se mostrado mais resistentes à maioria dos antibióticos conhecidos, fato este que estimula a procura por novas substâncias com potencial antimicrobiano, principalmente de ocorrência natural. O uso na medicina popular das espécies do gênero *Pterodon* e *Lippia*, devido aos seus efeitos anti-reumáticos, analgésicos e antiinflamatórios, é amplamente difundido. Para a avaliação da atividade antimicrobiana e análise de citotoxicidade em fibroblastos bovinos foram selecionadas as espécies *Pterodon emarginatus* Vog., *Lippia lacunosa*, *Lippia rotundifolia* e *Lippia salvifolia*. Os microrganismos-alvo deste estudo (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis* e *Klebsiella pneumoniae*) foram obtidos de animais com mastite, oriundos de propriedades rurais no interior de Minas Gerais. De *P. emarginatus*, foram testadas as frações hexânica (FH), acetato de etila (FAE), butanólica (FB), metanólica (FM) e etanólica (FE), sendo que a atividade antimicrobiana foi evidenciada para as FH e FE. A menor CIM encontrada foi a da FH contra *S. dysgalactiae* na concentração de 0,625 mg/mL. Para a obtenção dos peptídeos de *Lippia*, foram preparados os extratos aquosos (EA) a partir de suas folhas e flores. Os EA de *L. lacunosa* e *L. salvifolia* foram bacteriostáticos (CIM = 80 µg/mL) para *S. aureus* e *S. agalactiae*, respectivamente. *L. rotundifolia* foi bacteriostática contra *S. uberis* (CIM=10 µg/mL). O teste de viabilidade celular demonstrou que os extratos obtidos de *Lippia lacunosa* e *Lippia rotundifolia* não foram tóxicos quando comparados ao controle, no entanto, foram observadas alterações morfológicas em concentrações ≥ 80 µg/mL. Com esses resultados, pode-se verificar que tais plantas apresentam potencial antimicrobiano e sua utilização pode estar prevista tanto para o tratamento da mastite como em formulações antissépticas utilizadas em laboratórios, como aqueles de cultivo celular.

Palavras-chave: plantas medicinais, atividade antimicrobiana, viabilidade celular.

ABSTRACT

QUINTÃO, C.C.R. **Evaluation *in vitro* of the antimicrobial activity and cytotoxicity of natural substances against microorganisms that cause bovine mastitis.** 2009. Master Dissertation - Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

The use of medicinal plants in the treatment of many diseases is associated with the popular medicine from different parts of the world. Each day, the microorganisms that cause damages to the human and animal health have shown more resistance to most of the known antibiotics, stimulating the search for new antimicrobials substances, mainly from natural occurrence. The use of the specie *Pterodon emarginatus* and genus *Lippia* as anti-inflammatory, anti-rheumatic and analgesic drugs in the popular medicine is widely spread. For the evaluation of the antimicrobial activity the species *Pterodon emarginatus* Vog., *Lippia lacunosa*, *Lippia rotundifolia* and *Lippia salvifolia* were selected the microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis* and *Klebsiella pneumoniae*) which were retrieved from animals with mastitis raised on farms in the country side of Minas Gerais. From *P. emarginatus* were tested the hexanic (HF), ethyl acetate (AEF), buthanol (BF), methanol (MF) and ethanol (EF) fractions. The antimicrobial activity was evidenced by the HF and EF. The smallest MIC found was of the HF against *S. dysgalactiae* in the concentration of 0.625 mg/mL. For the attainment of peptides of *Lippia*, the aqueous extracts (AE) from its leaves and flowers had been prepared. The AE of *L. salvifolia* and *L. lacunosa* were bacteriostatic (MIC=80 µ g/mL) for *S. aureus* and *S. agalactiae*, respectively. *L. rotundifolia* was bacteriostatic against *S. uberis* (MIC=10 µ g/mL). The test of cellular viability for the extracts of *Lippia* sp showed that they were not toxic when compared to the control. The morphologic analysis showed that alterations in the format of the cells occurred in a concentration ≥ 80 µ g/mL. These results of this study provide additional evidence that these plants have antimicrobial potential against microorganisms that cause bovine mastitis and suggest its use as a natural antiseptic.

Key Words: medicinal plants, antimicrobial activity, cellular viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Prejuízos de um caso clínico de mastite.	19
Figura 2 A estrutura suspensa do úbere	20
Figura 3 Principais vias do metabolismo secundário e suas interações.	37
Figura 4 Sementes de <i>Pterodon ermagnatus</i> Vogel.	46
Figura 5 Espécies do gênero <i>Lippia</i>	47
Figura 6 Explante obtido de orelha bovina.	50
Figura 7 Atividade antimicrobiana pelo método turbidimétrico.	56
Figura 8 Viabilidade celular de fibroblastos bovinos expostos aos extratos de <i>Lippia salvifolia</i> , <i>Lippia lacunosa</i> e <i>Lippia rotundifolia</i> .	57
Figura 9 Alteração na morfologia celular de fibroblastos bovinos após 24h de incubação com extratos vegetais.	59
Figura 10 Alterações morfológicas de fibroblastos bovinos após a incubação com os extratos de <i>Lippia salvifolia</i> , <i>Lippia lacunosa</i> e <i>Lippia rotundifolia</i> .	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Atividade antimicrobiana dos extratos vegetais frente às bactérias causadoras de mastite bovina. **55**

Tabela 2 Citotoxicidade dos extratos de *Lippia* em fibroblasto bovino. **56**

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BME - *Eagle's Basal Medium*
BSA – *Bovine serum albumine*
CC₅₀ - Concentração que causa citotoxicidade a 50% das células
CCS – Contagem de células somáticas
CCSO – Contagem de células somáticas ópticas
CECP – Campo Experimental de Coronel Pacheco
CIM – Concentração inibitória mínima
CMT – *California Mastitis Test*
Côa – Coenzima A
CO₂ – Dióxido de carbono
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - ácido desoxirribonucléico
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
EUA – Estados Unidos da América
FAE – Fração acetato de etila
FB – Fração butanólica
FE – Fração etanólica
FH – Fração hexânica
FM – Fração metanólica
g - grama
G+ - Gram - positivo
G- - Gram – negativo
HCl – Ácido clorídrico
nm – nanômetros
Kd - Kilodalton

µg - micrograma

M – molar

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MTT - brometo de difeniltetrazolium 3-[4,5- dimetiltrazol-2yl]-2,5

NaCl – Cloreto de sódio

NCA – Núcleo de Ciências Agrárias

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONG – Organização não governamental

p.a. – Para análise

PBS – Solução salina de fosfato tamponada

PMN – Polimorfonucleares

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RPM – Rotações por minuto

SFB – Soro fetal bovino

TSA - *Tryptic Soy Agar*

UFC - Unidades formadoras de colônia

USP – *United States Pharmacopeia*

UVB – Ultravioleta B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Agricultura orgânica e saúde pública.....	16
1.2 Mastite bovina.....	18
1.2.1 Agentes etiológicos.....	22
1.2.2 Métodos de diagnóstico.....	25
1.2.2.1 Contagem de células somáticas (CCS).....	25
1.3 Métodos de tratamento.....	26
1.3.1 Antimicrobianos.....	27
1.3.2 Fitoterápicos.....	28
1.4 Fitoterapia no setor veterinário.....	30
1.5 Metabolismo vegetal.....	36
1.6 Peptídeos obtidos de vegetais.....	38
1.7 Espécies vegetais de interesse.....	40
1.7.1 <i>Pterodon ermagenatus</i> Vogel.....	40
1.7.2 <i>Lippia lacunosa</i> , <i>Lippia salvifolia</i> e <i>Lippia rotundifolia</i>	42
1.8 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	42
2 OBJETIVOS.....	44
2.1 Geral.....	44
2.2 Específicos.....	44
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 Coleta do material vegetal.....	45
3.2 Preparo das frações.....	45
3.2.1 <i>Pterodon ermagenatus</i>	45
3.2.2 Gênero <i>Lippia</i>	46
3.2.2.1 Extração dos peptídeos.....	46
3.2.2.2 Quantificação dos peptídeos.....	47
3.3 Atividade antimicrobiana.....	47
3.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima.....	48
3.4 Cultivo celular.....	49
3.4.1 Meios de cultura e reagentes.....	49
3.4.2 Obtenção da linhagem celular.....	50
3.4.3 Manutenção das linhagens celulares.....	51
3.5 Avaliação da citotoxicidade.....	52
3.5.1 Morfologia Celular.....	52
3.5.2 Viabilidade celular.....	53
3.6 Determinação da CC ₅₀	53
3.7 Análise estatística.....	54
4 RESULTADOS.....	55
4.1 Atividade antimicrobiana.....	55

4.2 Citotoxicidade celular.....	56
4.2.1 Viabilidade celular.....	56
4.2.2 Morfologia celular.....	58
5 DISCUSSÃO.....	60
5.1 Atividade antimicrobiana.....	61
5.1.2 <i>Pterodon ermaginus</i> Vogel.....	62
5.1.3 Gênero <i>Lippia</i>	64
5.2 Citotoxicidade.....	67
5.2.1 <i>Pterodon ermaginus</i> Vogel.....	68
5.2.2 O gênero <i>Lippia</i>	69
6 CONCLUSÃO.....	73
7 REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS	
ANEXO A	95
ANEXO B.....	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 AGRICULTURA ORGÂNICA E SAÚDE PÚBLICA

Ao longo do século XX, disseminou-se pelo mundo o uso de produtos químicos na agricultura e na pecuária. Através da alimentação, resíduos desses produtos chegaram ao organismo humano, com repercussões negativas sobre a saúde (MOREIRA, 1995). Essa situação despertou em muitos profissionais e, na sociedade como um todo, a urgência de se criar animais e de cultivar a terra de maneira mais sadia para o homem, para os animais e para o ambiente. Neste contexto, há uma enorme massa crítica que promove um interesse crescente, em nível mundial, em integrar uma lógica ecológica à produção agropecuária, promovendo ajustes nos sistemas produtivos de modo a torná-los ambiental, social e economicamente viáveis e compatíveis. Em consequência disto, a agropecuária ecológica ganhou força, considerando as inúmeras vantagens sanitárias e econômicas decorrentes desse modo de produção de alimentos (MOREIRA e PAIXÃO, 2005).

Segundo Darolt (2003), a agricultura orgânica vem se fortalecendo em todo mundo devido a alguns fatores como a crescente preocupação com as questões ambientais (erosão do solo, contaminação das águas superficiais e subterrâneas), questões sociais (êxodo rural, inchaço das cidades, aumentos da violência) e a procura por alimentos livres da contaminação por agentes químicos sintéticos. A agricultura orgânica visa o equilíbrio da propriedade como um todo, sem excluir as pessoas envolvidas no processo, sejam elas os proprietários ou os trabalhadores. Este equilíbrio permite uma maior sustentabilidade do sistema, pois o organismo agrícola (propriedade) passa a ter um maior poder de recuperação contra possíveis adversidades, evitando assim sua degradação e possibilitando uma oferta de alimentos comprovadamente mais saudáveis. O Brasil possui, segundo dados do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (ORMOND et al., 2002), 270 mil hectares sob manejo orgânico ou em conversão com uma área de 353 milhões de hectares destinados à agricultura, correspondendo assim a 0,08% de área orgânica em relação à área total agricultável, demonstrando um imenso potencial nesse setor.

Dentro desse cenário, onde o Brasil demonstra um imenso potencial, é importante que o governo juntamente com as organizações não governamentais (ONGs) do setor, as universidades, as entidades certificadoras e a comunidade em geral, faça a sua parte para que a agricultura orgânica deixe de ser simplesmente uma promessa e se transforme em uma realidade, contribuindo assim para um desenvolvimento sustentável, respeitando, sobretudo, as relações do homem com a natureza (DAROLT, 2003).

De acordo com a Instrução Normativa do MAPA Nº 007 (1999), posteriormente ratificada pela Lei 10.831 (2003), que dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências, estão descritas as normas para a produção animal, com as práticas permitidas e as proibidas. Neste contexto, a fitoterapia é uma das terapêuticas desejadas e recomendadas no controle sanitário do rebanho, enquanto que a utilização de antibióticos e esteróides, que são os medicamentos empregados no tratamento convencional de mastites, estão classificadas como técnicas proibidas (BRASIL, 1999; ALMEIDA, 2001; BRASIL, 2003). No que diz respeito à sanidade do rebanho está proibido o uso de aditivos, promotores de crescimento e estimulante de apetite. Almeida (2000) ressalta que os produtores devem ainda estar atentos para os produtos usados na lavagem e desinfecção dos utensílios usados na produção.

A qualidade do leite tem destacada importância sob o ponto de vista de saúde pública, visto que são freqüentes os casos de doenças associadas ao seu consumo e demais derivados lácteos contaminados com microrganismos patogênicos (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). No caso das contaminações microbianas dos alimentos por microrganismos patogênicos, o risco à saúde pública está na característica de alguns deles produzirem toxinas extracelulares e fatores de virulência que causam transtornos importantes aos consumidores, desde leves toxinfecções alimentares até choque letal (CARDOSO, CARMO e SILVA, 2000).

Outra preocupação por parte das indústrias e dos consumidores diz respeito à persistência de resíduos de antibióticos no leite, decorrentes dos tratamentos com antibióticos intramamários ou sistêmicos para combate e/ou prevenção de mastites (COSTA, 1999; RAIÁ et al., 1999).

1.2 MASTITE BOVINA

Dentre as doenças de maior importância nos sistemas de exploração pecuária está a mastite, que afeta acentuadamente a produção leiteira mundial pela redução na capacidade produtora dos rebanhos infectados e queda na qualidade do produto final (SILVA, 1999). Tais fatores contribuem para a redução do rendimento industrial na fabricação de derivados devido às alterações na composição do leite mamático (LANGONI, DOMINGUES e SILVA, 1999).

Além disso, a mastite clínica aumenta o risco de resíduos antimicrobianos no leite, portanto, além do prejuízo diretamente relacionado ao processo inflamatório, acrescenta-se o custo com medicamentos, aumento da mão-de-obra e tempo de descarte do leite após tratamento até a total eliminação dos resíduos de antibióticos utilizados (Costa, 1999) (Figura 1). Contudo, a maioria das mastites apresenta-se sem sinais físicos de processo inflamatório agudo, sendo crônicas ou incipientes e, apesar do aspecto inofensivo, causam sérios prejuízos econômicos e servem de fonte de infecção (COSTA, 1998).

O conhecimento da anatomia e fisiologia do úbere (Figura 2) é necessário para o melhor entendimento de como a mastite se instala e de como operam as defesas do hospedeiro para reduzir a infecção (COSTA, 1998).

Cada quarto mamário é composto de cisterna do teto, cisterna da glândula, ductos galactóforos e tecido glandular secretor. Este tecido contém milhões de estruturas em forma de pequenos sacos denominados alvéolos. Cada alvéolo é revestido por células epiteliais produtoras de leite e são circundados por células musculares lisas (células miopiteliais) que, ao contraírem, expulsam o leite do alvéolo, durante a ordenha. Vasos sanguíneos trazem nutrientes para cada alvéolo, que os convertem em leite. Entre as ordenhas, o leite é armazenado dentro dos espaços alveolares, ductos e cisternas. Na ordenha, é removido através do canal do teto (COSTA, 1998).

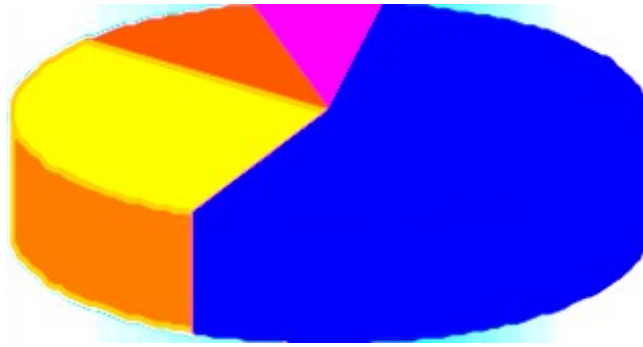


Figura 1 - Prejuízos de um caso clínico de mastite. Azul: redução na produção de leite; amarelo: descarte de leite impróprio; laranja: medicamentos; lilás: serviços extras.

O processo inflamatório da glândula mamária deve ser diagnosticado pelo exame clínico desta através de inspeção visual, laboratorial e/ou apalpação. No exame laboratorial, são avaliadas principalmente suas características macroscópicas, sua celularidade direta e indireta e seu perfil microbiológico, através do cultivo de leite oriundo das glândulas mamárias acometidas (GRUNERT, 1993).

A mastite clínica apresenta sinais evidentes como edema, aumento de temperatura, endurecimento, dor e secreção purulenta na glândula mamária (FONSECA e SANTOS, 2000). Na forma subclínica, na qual não há sinais visíveis de inflamação do úbere, não se observam alterações macroscópicas e sim na composição do leite (teor de proteínas, gordura e lactose) (CULLOR, TYLER e SMITH, 1994), no entanto, a principal alteração está no aumento de células somáticas (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1996).

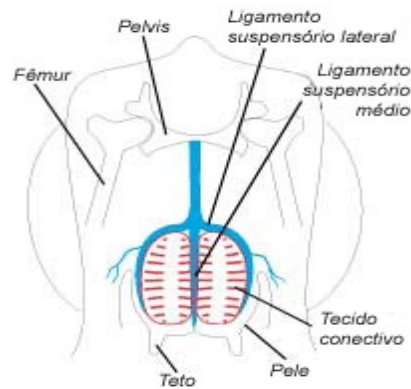


Figura 2 - A estrutura suspensa do úbere.

Fonte: http://uff.br/.../Conteúdos/glândula_mamaria.htm

Uma glândula mamária sadia é protegida por uma variedade de mecanismos de defesa naturais. Esses mecanismos podem ser não imunológicos (inespecíficos) ou imunológicos (GIRAUDO, 1996). O primeiro deles está constituído por uma barreira física, que inclui canal e esfíncter do teto, os quais possuem propriedades defensivas como um mecanismo de oclusão relativamente eficiente e proteínas bactericidas (NICKERSON, 1985; HILLERTON, 1996).

Um mecanismo adicional de defesa do teto citado por Nickerson (1985) e Hillerton (1996) é o seu revestimento por uma camada de queratina (composta por células epiteliais descamadas, ácidos graxos e proteínas catiônicas). Os autores comentam que há evidências de que a queratina tenha função de adsorver as bactérias e em seguida, removê-las juntamente com a camada de queratina durante a ordenha. Fatores (ambientais e/ou equipamentos de ordenha) que afetam a integridade da camada de queratina podem afetar a susceptibilidade às infecções intramamárias.

A segunda linha de defesa glandular, segundo Giraudo (1996), Suriyasathaporn et al. (2000) e Hurley e Morin (2001), é constituída pelo sistema imunológico, o qual envolve imunidade celular e humoral. A primeira é conferida pelos leucócitos que são células efetoras do sistema imune. A resposta imune humoral envolve um antígeno, material estranho que estimula uma resposta imune específica, e um anticorpo, uma proteína especial sintetizada pelos linfócitos B e

células plasmáticas, capaz de se combinar ao antígeno específico (HURLEY e MORIN, 2001).

No Brasil, segundo Brant e Figueiredo (1994), a mastite subclínica caracteriza-se por uma elevada incidência (44,88% a 97,0%) e uma redução de 25,4% a 43% na produção de leite.

A grande preocupação com a alta incidência de casos de mastite está na qualidade do leite, que é considerado o mais nobre dos alimentos. Por sua composição rica em proteína, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas, ele proporciona nutrientes e proteção imunológica para o neonato. Além de suas propriedades nutricionais, o leite oferece elementos anti-carcinogênicos presentes na gordura como o ácido linoléico conjugado, esfingomiéline, ácido butírico, β -caroteno e vitaminas A e D (MILLER, 2002). A mastite afeta a qualidade do leite por provocar alterações nos seus três principais componentes: gordura, proteína e lactose, contudo, enzimas e minerais também são afetados (SCHAELLIBAUM, 2000).

Do ponto de vista tecnológico, a qualidade da matéria-prima é um das maiores entraves ao desenvolvimento e consolidação da indústria de laticínios no Brasil (MULLER, 2002). A extensão do aumento da contagem das células somáticas e as mudanças na composição do leite estão diretamente relacionadas com a superfície do tecido mamário atingido pela reação inflamatória (SCHAELLIBAUM, 2000). Vale ressaltar que há uma relação direta entre a contagem das células somáticas (CCS) e a concentração dos principais componentes do leite.

Assim, a CCS representa um indicativo de qualidade da produção dos rebanhos, pois com seu aumento pode ocorrer: alteração na composição e redução nas características do leite (o que leva a um menor tempo de prateleira), além da demonstração de condições sanitárias insatisfatórias. Esses fatores contribuem para imposição de barreiras ao comércio internacional.

Em relação às proteínas, ocorre uma redução naquelas sintetizadas na glândula mamária (α e β caseína, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) e um aumento nas proteínas de origem sangüínea (albumina sérica e imunoglobulinas), em virtude do aumento de permeabilidade vascular secundário ao processo inflamatório (KITCHEN, 1981). A proteína total do leite tem pouca variação, mas a concentração de cada tipo de proteína varia acentuadamente.

A mastite também está associada à diminuição da concentração de lactose e potássio no leite e a uma elevação nos níveis de sódio e cloro que passam do sangue para o leite (KITCHEN, 1981; SCHAEFFELBAUM, 2000).

O controle da mastite bovina é a principal causa para o tratamento de vacas com antimicrobianos (COELHO, 2003; COSTA, MANGERONA e BENITES, 1996). O tratamento tem como principais objetivos: prevenção da mortalidade dos animais nos casos agudos; retorno à composição e à produção normal de leite; eliminação de fontes de infecção e prevenção de novas infecções no período seco (CULLOR, TYLER, SMITH, 1994).

Um grande inconveniente do uso indiscriminado desses fármacos é a presença de seus resíduos no leite e derivados destinados ao consumidor. Coelho (2003) e Costa (1999) evidenciaram a presença de antibióticos, apesar de ter sido respeitado o período de retirada estabelecido e recomendado pelos fabricantes, não só nos quartos tratados via intramamária, mas também nos quartos não tratados adjacentes aos mesmos.

Além da presença de resíduos, o aumento da resistência microbiana é outro fator preocupante na administração desses antibióticos. Apesar da disponibilidade de uma ampla variedade de antimicrobianos para o tratamento da mastite bovina, o problema de resistência dos microrganismos acentuou-se no Brasil (COSTA, MANGERONA e BENITES, 1996). No entanto, são as alterações anatomopatológicas induzidas por certas infecções, que impedem o acesso do medicamento no foco, as principais responsáveis (BARRAGY, 1994).

1.2.1 AGENTES ETIOLÓGICOS

A mastite pode ocorrer como consequência de alterações fisiológicas e/ou metabólicas, traumas, alergias ou, como ocorre mais frequentemente, devido à ação de microrganismos (infecciosa), sendo esta última a mais importante sob os pontos de vista econômica e de saúde pública (COSTA, 1991).

O potencial de invasão microbiana é aumentando pela colonização por bactérias tanto no período seco como durante a lactação. A desinfecção pós-ordenha com germicida reduz acentuadamente essa colonização do canal do teto. A patologia manifesta-se quando os microrganismos passam pelo canal do teto,

sobrepujam as defesas do hospedeiro e multiplicam-se livremente (COSTA, 1998).

Os principais agentes etiológicos de mastite foram, convencionalmente, classificados quanto à sua origem e modo de transmissão em dois grupos: contagiosos, transmissíveis ou vaca-dependentes, os quais são transmitidos principalmente durante a ordenha e estão presentes no corpo do animal com ou sem mastite; ambientais ou ubiqüitários, presentes no ar, água, cama e fezes. No primeiro grupo encontram-se o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium bovis*; no segundo grupo, estão incluídos *Klebsiela pneumoniae* e outros estreptococos, enterobactérias, *Actinomyces pyogenes*, *Pseudomonas* sp., além de fungos, principalmente leveduras, e algas clorofiladas do gênero *Prototheca* sp. (COSTA, 1998).

O *Staphylococcus aureus* tem importância epidemiológica para o homem devido à capacidade que certas linhagens têm de produzir toxinas nos alimentos (ZECCONI e HAHN, 2001). Quando alimentos com essas toxinas são ingeridos por humanos podem provocar febre, vômitos, náusea e diarreia como os sintomas mais comuns. De fato, as clássicas toxinas termo-resistentes foram, inicialmente, definidas por suas atividades pirogênicas e eméticas e, somente, mais tarde, caracterizadas como superantígenos (FUEYO et al., 2005). Estas toxinas possuem elevada resistência térmica, sendo difícil sua inativação pelos métodos térmicos tradicionais de tratamento do leite, como a pasteurização (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). *S. aureus* destaca-se como microrganismo de grande importância na incidência de mastite infecciosa nos rebanhos leiteiros mundiais e, em função de sua elevada resistência aos antibióticos, seu tratamento torna-se difícil (ZECCONI; HAHN, 2000).

O *Staphylococcus aureus* ainda produz uma grande variedade de proteínas que contribuem tanto para a colonização como para o desenvolvimento de processos patológicos. Aproximadamente todas as espécies isoladas secretam citotoxinas e enzimas como hemolisinas, nucleases, lipases, hialuronidase e colagenase, cujas principais funções são converter o tecido do hospedeiro em nutrientes para seu crescimento e promover a difusão do patógeno pelo corpo do hospedeiro (FUEYO et al., 2005).

Segundo Barlow (2001), o *S. aureus* juntamente com o *S. uberis* foram identificados como os principais agentes causadores de mastites em 40

propriedades leiteiras orgânicas na região de Vermont/EUA. De acordo com Brabes et al. (1999), a prevalência do *S. aureus* em cinco propriedades leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais foi de 40,15%. No estudo realizado por Costa et al. (2000), o gênero *Corynebacterium* foi o de maior prevalência na etiologia da mastite bovina seguido do gênero *Staphylococcus*, sendo que *Staphylococcus* coagulase positivos predominaram com uma porcentagem de 65,5%.

Benites, Melville e Costa (2001) estudaram a ocorrência de mastites espontâneas em 140 glândulas mamárias de 35 vacas e também encontraram um predomínio no isolamento de microrganismos do gênero *Staphylococcus* (60,71%), sendo que 54,29% corresponderam a *Staphylococcus* coagulase negativos e 6,43% *Staphylococcus* coagulase positivos.

A aderência dos microrganismos aos tecidos no interior da glândula favorece a instalação da infecção, dificultando sua remoção mecânica pelo fluxo do leite durante a ordenha. *S. agalactiae* e *S. aureus* aderem aos tecidos que revestem os espaços de armazenamento de leite. A bactéria *Escherichia coli* não adere à glândula mamária, mas multiplica-se rapidamente em quartos com baixo conteúdo celular (leucócitos). A principal função dos leucócitos é a defesa através da fagocitose e a destruição dos microrganismos. Se estes forem eliminados pelos leucócitos, a infecção é debelada; se não, estabelece-se uma infecção crônica. Os microrganismos, inicialmente, instalam-se nos ductos e cisternas e depois progridem para os alvéolos das porções mais baixas do úbere onde se multiplicam e produzem toxinas e produtos irritantes que provocam edema e destruição das células secretoras (BIESENKAMP-UHE et al., 2007).

Giannechini, Concha e Franklin (2000) analisaram um total de 522 linhagens entre *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*, isolados de casos clínicos e sub-clínicos de mastite bovina da região litoral ocidental do Uruguai, os quais foram analisados segundo sua susceptibilidade a vários agentes antimicrobianos. Das 336 linhagens de *S. aureus*, 160 (47,6%) foram resistentes à penicilina. Das 41 linhagens coagulase negativas, 10 (27%) apresentaram resistência ao mesmo antibiótico. Todas as linhagens estreptocócicas foram susceptíveis à penicilina, enquanto três (7%) das 43 linhagens enterocócicas foram resistentes.

Duarte et al. (2005), observaram características de resistência antimicrobiana de 189 linhagens de *Streptococcus agalactiae* isolados de bovinos e humanos. Todas as linhagens foram resistentes à tetraciclina e 8,5% foram também resistentes

à eritromicina, correspondendo a um total de 23,7% de espécies isoladas de bovinos resistentes à tetraciclina.

Classicamente, infecções por bactérias como *S. agalactiae* e *S. aureus* têm sido a principal causa de mastite bovina. No entanto, atualmente, também já há relatos de incidência de mastite causada por agentes atípicos como *S. dysgalactiae* e *Mycoplasma bovis*. Apesar de décadas de pesquisa intensa e extensivas medidas profiláticas e terapêuticas, esta patologia significa ainda o maior problema da indústria leiteira (BIESENKAMP-UHE et al., 2007).

1.2.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico é realizado pelo exame da glândula mamária através de inspeção e palpação, complementado pelo exame do leite no qual se avaliam, principalmente: características macroscópicas (teste de Tamis ou prova do caneco-de-fundo-escuro), celularidade direta (contagem de células somáticas - CCS), indireta (*California Mastitis Test* - CMT) e perfil microbiológico (GRUNERT, 1993).

1.2.2.1 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS)

A quantificação de células somáticas tem como objetivo a detecção de anormalidades no leite como consequência de mastites ou outras causas, e é um dos parâmetros avaliados a fim de se obter a padronização de sua qualidade. Podem ser utilizados métodos diretos de contagem através de microscopia óptica e contadores eletrônicos, utilizando o aparelho citômetro de fluxo, ou métodos indiretos como o CMT (SCHALM; CARROLL e JAIN, 1971).

A reação inflamatória determina um aumento da quantidade de leucócitos na glândula mamária acometida. Estas células de defesa migram do sangue para o úbere quando este sofre alguma agressão, como no caso de uma infecção. Logo, a CCS serve para detectar o aumento de leucócitos no leite (COSTA, 1999; RIBAS, 1996).

A CCS direta no leite tem sido aceita como uma das ferramentas mais importantes na determinação da presença e intensidade do processo inflamatório da

glândula mamária. A quantidade e os tipos celulares presentes variam conforme as condições fisiológicas e patológicas (SCHALM; CARROLL e JAIN, 1971).

Numa glândula infectada, as células de defesa correspondem de 98 a 99% das células encontradas no leite, de acordo com Philpot e Nickerson (2002). Segundo Ribas (1996), esse número está entre 75 e 98% do total da CCS.

Paape et al. (1979) relata que na glândula mamária infectada predominam os neutrófilos ou PMNs que, segundo Schalm, Carroll e Jain (1971) ficam entre 80 e 90% nos quadros de mastite. Os linfócitos perfazem de 20 a 40% do total de células e o restante corresponde a macrófagos e células secretoras descamadas (DANIEL et al., 1991).

As contagens elevadas de PMNs indicam a presença de inflamação aguda, por outro lado contagens baixas como, por exemplo 40%, podem indicar uma lesão crônica (BENITES; MELVILLE e COSTA, 2000).

Atualmente, não existe regulamentação única para a comércio internacional. Entretanto, muitos países têm adotado limites máximos de células somáticas como parte de seus padrões nacionais de regulamentação, visando preservar a qualidade higiênica do leite. Países como a Nova Zelândia, Austrália e União Européia adotam o limite de 400 mil células/mL. No Canadá, o limite é de 500 mil células/mL e nos Estados Unidos da América é de 750 mil/mL (MÜLLER, 2002). No Brasil, através da Instrução Normativa nº 51, estabeleceu-se o limite de 1 milhão de células/mL em 2002, reduzindo para 750 mil em 2005 e para 400 mil em 2011.

É importante ressaltar que a contagem de células somáticas é influenciada por vários fatores como: número de parições, estágio de lactação (início e final), alta produção e escape de leite no momento da ordenha (PEELER et al., 2000), condições associadas ao manejo, como tamanho e tipo da ordenha (manual ou mecânica), mas especialmente pela presença de infecções intramamárias, tornando-se um indicador bastante confiável de sanidade da glândula mamária (MÜLLER, 2002).

1.3 MÉTODOS DE TRATAMENTO

Um programa efetivo de controle da mastite deve basear-se, principalmente,

em medidas de prevenção, mas é importante sua associação com a terapia medicamentosa para auxiliar as defesas (específicas e inespecíficas) do animal na eliminação do microrganismo invasor (COSTA, 2002).

1.3.1 ANTIMICROBIANOS

Uma vez detectada a mastite, a escolha do antibiótico intramamário deve ser baseada em certos fatores de relevância como: resultado dos testes de sensibilidade; espectro de ação; facilidade de adaptação ao manejo (que não altere a rotina da propriedade); período de retirada; histórico de sucesso anterior ao rebanho; natureza da infecção (bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e algas) e custo benefício favorável.

Geralmente, os casos de mastite clínica tratados com antibióticos apresentam índice de cura satisfatório (>90%). No entanto, a eliminação de infecções de origem estafilocócica é mais rara (BRAMLEY, 1982).

As vias de administração dos antimicrobianos empregados no gado leiteiro para o tratamento das mastites podem ser por via intramamária ou sistêmica.

O emprego errado ou o uso intensivo de antibióticos pode levar ao desenvolvimento de resistência entre as diferentes linhagens bacterianas e à contaminação de gêneros alimentícios, com implicações na saúde humana e animal.

Segundo Oliveira e Claro (2008), a resistência aos antimicrobianos pode ser de dois tipos: 1) natural: devido à ausência de uma estrutura específica ou via metabólica alvo ou 2) adquirida: através de mutações espontâneas e seleção ou por recombinação após transferência de genes.

Dentre os principais mecanismos de resistência pode-se citar: 1) impermeabilidade à droga: muitas bactérias gram-negativas são resistentes à penicilina G por serem impermeáveis à droga, ou por apresentarem alterações em proteínas de ligação à penicilina; 2) inativação: muitas drogas são inativadas por enzimas codificadas pelos microrganismos. Outras drogas podem ser inativadas em decorrência de modificações introduzidas pelo microrganismo, tais como a adição de grupamentos químicos capazes de promover, por exemplo, a fosforilação ou acetilação de antibióticos e 3) modificação da enzima ou estrutura alvo.

A cada dia, os microrganismos que causam prejuízos à saúde humana e

animal estão se mostrando mais resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos, contribuindo assim como estímulo para a procura por antibióticos de origem natural. Em geral, os princípios ativos das plantas medicinais são resultantes do metabolismo secundário destas, acumulados em um ou vários dos seus tecidos. As plantas são capazes de produzir mais de 100.000 destes produtos naturais de baixo peso molecular. Os metabólitos secundários se diferenciam dos primários por não serem essenciais à vida da planta. Dentre os grupos químicos mais comumente relacionados à atividade antimicrobiana estão os derivados fenólicos: óleos essenciais, flavonóides, quinonas, taninos, alcalóides e alguns compostos enxofrados (DIXON, 2001; DOMINGO e LÓPEZ, 2003).

A desinfecção como ação de saúde pode ser entendida como o controle ou eliminação dirigida de microrganismos considerados indesejáveis em situações – problema específicas, pela atuação em seu metabolismo, independente do estado funcional, visando prejudicar a transmissão destes e/ou reduzir a sua dose infectante (WIEST e FENSTERSEIFER, 1985).

Os produtos químicos-sintéticos mais utilizados no Brasil para desinfecção de tetos e teteiras são os compostos halogenados (cloro e iodo), clorhexidina, aldeídos e compostos de amônia quaternária (LADEIRA, 1998). No entanto, Pedrini e Margatho (2003) avaliaram os princípios ativos mais utilizados para a desinfecção de tetos frente às bactérias causadoras de mastite e encontraram uma baixa eficácia do iodo a 0,5%, do hipoclorito de sódio a 0,5%, e do cloreto de benzalcônio a 1%.

Assim, cabe ressaltar que as práticas “limpas” para atenção à saúde do gado leiteiro, criado dentro de um sistema de produção orgânica, ainda são carentes de métodos seguros e eficazes (Associação da Agricultura Orgânica, 2004). O Instituto Biodinâmico acrescenta a seguinte informação quanto aos produtos veterinários de uso permitido na agricultura orgânica: antibióticos – nenhum. Como tratamentos auxiliares em desordens dos ductos mamários podem ser usadas plantas com ação antiséptica, tais como: uva ursina (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng), cavalinha (*Equisetum arvense*), rosa canina (*Rosa canina* L.), hipérico (*Hypericum perforatum*), própolis e extrato de calêndula (*Calendula officinalis*) (INSTITUTO BIODINÂMICO, 2004).

1.3.2 FITOTERÁPICOS

Atualmente, o desenvolvimento de fitoterápicos tem recebido muita atenção tanto por parte da comunidade científica quanto pelas indústrias farmacêuticas. Apesar da grande aceitação e seu extenso uso terapêutico pela população em geral, principalmente a de baixa renda, as plantas medicinais têm sido relativamente pouco avaliadas cientificamente, sendo dessa forma, necessários estudos mais detalhados no sentido de verificar e assegurar sua qualidade, segurança e eficácia (LAPPA, 2006).

Em 2000, Avancini, Wiest e Mundstock avaliaram o potencial antimicrobiano do decocto da carqueja (*Baccharis trimera* Less.) D.C. Compositae e testaram suas atividades bacteriostática e bactericida sobre bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. uberis*) e Gram-negativas (*Salmonella gallinarum* e *Escherichia coli*) e concluíram que as bactérias Gram-positivas demonstram maior sensibilidade ao decocto em relação às Gram-negativas.

Em um outro estudo sobre plantas utilizadas na medicina popular brasileira para o tratamento de doenças infecciosas, Holetz et al. (2002) apresentaram uma análise de treze plantas medicinais selecionadas pela sua atividade antimicrobiana. A partir da análise, extratos de pelo menos oito famílias de plantas diferentes apresentaram alguma atividade antimicrobiana, principalmente sobre bactérias Gram-positivas, o que representa 77% dos extratos analisados. Os autores concluíram que, apesar de a pesquisa sobre os resultados do uso etnobotânico das treze espécies de plantas estudadas terem sido realizadas *in vitro*, a pesquisa *in vivo* pode ajudar na determinação do potencial de ação dessas plantas para o tratamento de doenças infecciosas.

No Núcleo de Ciências Agrárias (NCA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), estudos com extratos de plantas medicinais do cerrado têm sido realizados visando testar a atividade antimicrobiana destes contra microrganismos causadores de mastite ovina, provavelmente transmitida pelo contato direto com vacas infectadas. As plantas que estão sendo testadas são: barbatimão, aroeira, pequi, alecrim-pimenta (*L. sidoides*), carqueja e chá-do-rio, tendo o barbatimão apresentado os melhores resultados.

Diversos produtores e veterinários fazem uso de fitoterápicos em mastite bovina, tanto para a prevenção quanto para o tratamento. No entanto, ao buscar-se

literatura científica sobre o assunto, poucas publicações são obtidas. Buscando suprir esta lacuna de conhecimento e fornecer sustentação às práticas realizadas por veterinários e produtores, tornam-se necessários estudos para avaliar extratos brutos e frações de plantas com indicação etnográfica como antimicrobianos frente a microrganismos isolados de mastite bovina.

1.4 FITOTERAPIA NO SETOR VETERINÁRIO

A fitoterapia esteve inserida no arsenal terapêutico até meados do século XIX. Desde então, ela foi cedendo lugar a preparados feitos com moléculas puras de elementos ativos de plantas medicinais, dotadas de ação farmacológica mais específica. Assim, as plantas medicinais foram sendo substituídas por terapêuticas baseadas no uso de substâncias químicas sintéticas ou semi-sintéticas (ALMEIDA, FREITAS e PEREIRA, 2006).

Entretanto, a partir da década de 1980, com o desenvolvimento de novos métodos de isolamento de substâncias ativas, foi possível identificar substâncias em amostras complexas, como extratos de plantas, ressurgindo o interesse por compostos de origem vegetal que pudessem ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

O movimento denominado "Onda Verde", que surgiu nos anos 70, também contribuiu para a revalorização da medicina tradicional. Este movimento foi caracterizado por uma demanda crescente de produtos naturais na forma de fármacos, alimentos e cosméticos, sustentado principalmente, pelos efeitos colaterais resultantes do uso crescente de produtos químicos em várias áreas da vida, incluindo a medicina veterinária (BIZIMANA, 1997).

Na atenção primária e secundária em medicina veterinária, o estudo e a utilização da medicina tradicional vêm ganhando espaço. A produção de alimentos de origem animal nas modernas criações utilizando produtos químicos de alto custo, acabam resultando em resíduos nos alimentos com potencial risco à saúde do consumidor (SHUCH, 2007).

A Medicina Tradicional pode ser entendida como um termo amplo que se refere à medicina tradicional chinesa, a ayurvédica ou às diversas medicinas indígenas. Inclui terapias com medicação à base de ervas ou a ausência de

medicação, como a acunpultura ou outras técnicas manuais (ZHANG, 2005). Em muitos países, como por exemplo, na China, a valorização da medicina tradicional e a associação de seus métodos com a medicina moderna tem promovido importantes avanços no seu sistema de saúde (HORN, 1969).

As plantas medicinais em mastite bovina aparecem, na maioria das vezes, como curativas. Abaineh e Sintayeihu (2001) utilizaram *Persicaria senegalense* para tratamento de mastite bovina sub-clínica, selecionada a partir de um trabalho etnográfico no sul da Etiópia. A planta era utilizada por agricultores para tratamento da mastite e pelas mulheres para higiene pós-parto. Os autores testaram, *in vitro*, diferentes extratos (éter de petróleo, acetona e metanol) obtidos a partir das folhas da planta e alcançaram inibição das bactérias: *S. aureus*, *Corynebacterium bovis* e *Pseudomonas aeruginosa* (mastite clínica), na concentração de 0,2 g/mL.

Hu et al. (1995) realizaram testes *in vitro* com extratos de ginseng (*Panax ginseng*) sobre a atividade de PMN obtidos do leite de vacas e demonstraram a capacidade de amplificar a resposta oxidativa destas células. Hu et al. (2003) utilizaram extrato de ginseng via sub-cutânea em vacas com mastite sub-clínica e como adjuvante de vacina para *S. aureus* e obtiveram taxa de proteção superior e um aumento na atividade de células de defesa desses animais em comparação ao controle.

Resultados semelhantes foram encontrados por Mukherjee, Dash e Ram (2005) que detectaram atividade antibacteriana e imunomodulatória para o extrato das folhas de *Ocimum sanctum* (devido à presença de flavonóides e triterpenos) usado em casos de mastite subclínica. Segundo os autores, ambos os efeitos parecem estar relacionados ao aumento de PMN na glândula mamária bovina e contribuem para reforçar o uso dessa substância natural como uma alternativa para o tratamento de mastite subclínica.

Comparativamente, em outro estudo realizado em 2009, Mukherjee concluiu que a infusão intramamária de sementes de *Azadirachta indica* demonstrou atividade antiinflamatória, antibacteriana e imunomodulatória em quadros de mastite bovina.

Meresta et al. (1989) utilizaram o extrato de própolis e obtiveram recuperação completa em 86,6% das vacas com mastite aguda e 100% nos casos de infecção causada por *Candida albicans*, 85% por *Escherichia coli*, 91% por *Staphylococcus* sp. e de 84,3% por *Streptococcus* sp. Os autores concluíram, ainda que, o extrato de

própolis apresentou-se bastante eficaz na terapia de mastite causada por microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais. O estudo de Pinto et al. (2001) demonstrou que o extrato etanólico de própolis foi eficaz como antimicrobiano contra isolados de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativo* e *Streptococcus agalactiae*, tendo apresentado resultados estatisticamente diferenciados, quando se utilizou etanol ou água como solvente de extração. Para esses autores, o *Streptococcus* sp. apresentou-se mais sensível ao extrato do que os isolados de *Staphylococcus* sp. A maior sensibilidade à própolis estaria de acordo com o perfil de maior sensibilidade aos antimicrobianos de uso comum, que o gênero *Streptococcus* apresenta, quando comparado a outras bactérias causadoras de mastite.

Loguercio et al. (2006) testou a atividade do propólis contra agentes bacterianos causadores de mastite que consistiam de 36 linhagens de *Staphylococcus* coagulase positivos e 27 de *Streptococcus* sp. Entre as 63 linhagens testadas, a sensibilidade média dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positivos (94,4%) foi superior à dos isolados de *Streptococcus* sp (85,2%). Valores semelhantes foram encontrados por Langoni (1996) que obteve 90% de inibição para *Streptococcus agalactiae* e 100% para *Staphylococcus aureus*.

Todos esses trabalhos indicam a possibilidade do uso terapêutico de plantas contra a mastite bovina. Contudo, é importante ressaltar que estudos prospectivos de isolamento desses princípios ativos, avaliação dos resíduos dessas drogas no leite e seus efeitos colaterais no homem e nos animais também precisam ser aprofundados.

Devido à restrição ao uso de aditivos, como antibióticos químico-sintéticos, na alimentação animal e consequentes barreiras ao comércio internacional (REGULAMENTO DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO RELATIVO AOS ADITIVOS, DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2003), começam a aparecer na literatura publicações que buscam validar saberes tradicionais associados à metodologia moderna de produção animal, utilizando extratos de plantas medicinais em substituição aos antibióticos e outros químicos convencionais (SHUCH, 2007).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), 42% da população dos Estados Unidos, 49% da francesa e 70% da canadense utilizam algum método tradicional (OMS, 1998) para o tratamento de doenças. O mercado mundial de ervas

medicinais está em franco desenvolvimento e atinge mais de 20 bilhões de dólares por ano (CONFERÊNCIA DAS NAÇÕES PARA O COMÉRCIO E DESENVOLVIMENTO, 2000). Reforçando essa idéia da necessidade da utilização de substâncias naturais, Baquero e Blázquez (1997) relataram o perigo do retorno a uma era pré-antibiótico considerando que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas. Em vista do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais representa uma importante área de pesquisa nas companhias farmacêuticas. Tais estudos com plantas visam à obtenção e caracterização de substâncias com potencial terapêutico que possam ser futuramente usadas como protótipos para a síntese de moléculas de interesse medicinal (FILHO, 2000).

Também o fato dos tratamentos médicos convencionais no mundo industrializado serem demasiadamente caros para muitos países, ajudou a contribuir para a decisão da OMS de promover estudos direcionados à verificação (científica) da eficácia de plantas utilizadas na medicina tradicional e à identificação de princípios ativos responsáveis por seus efeitos terapêuticos (BIZIMANA, 1997).

Dentre as diversas atividades farmacológicas, os vegetais são muito utilizados devido às suas propriedades antimicrobianas que se correlacionam principalmente, com compostos obtidos a partir de seu metabolismo secundário, como por exemplo, os taninos que são compostos fenólicos com propriedades antisséptica e antioxidante (NASCIMENTO et al., 2000, COWAN, 1999). Em muitos casos, tais substâncias provenientes do metabolismo secundário das plantas, funcionam como mecanismo de defesa da mesma contra a predação por microrganismos, insetos e herbívoros. Alguns, como os terpenóides, conferem odor às plantas, outros são responsáveis pela sua pigmentação, além de outras funções (COWAN, 1999).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações ao longo dos anos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas para a regulamentação destes medicamentos desde a Portaria nº 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos. Em seguida, foram elaboradas as Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 de 2000 e nº 48 de 2004, esta última atualmente em vigor, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (TUROLLA et al., 2006).

Tal controle sanitário faz-se necessário, visto que, muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes ou pela presença de contaminantes. A preocupação das autoridades regulatórias com a normatização dos fitoterápicos propicia a avaliação de aspectos importantes como a eficácia e a segurança dos produtos de origem vegetal, permitindo a obtenção de informações sobre o uso racional e específico destes medicamentos. Portanto, um rigoroso controle de qualidade desde o seu cultivo, passando pela coleta da planta, extração de seus constituintes até a elaboração do medicamento final é imprescindível.

Em 2006, através do decreto nº 5813 de 22 de junho, o governo brasileiro confere forma de Lei à Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Entre as diretrizes estão: o reconhecimento das práticas populares com plantas medicinais, a necessidade da preservação da biodiversidade através do uso sustentável, a inclusão da agricultura familiar nos arranjos produtivos de plantas medicinais e a garantia de promover a segurança, eficácia e a qualidade de acesso às plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006).

Assim, laboratórios do mundo todo descobrem, diariamente, novos compostos fitoquímicos com efeitos inibitórios sobre vários tipos de microrganismos *in vitro*, mas muitos desses compostos devem ser avaliados também *in vivo*, para determinar sua eficácia no sistema orgânico como um todo, incluindo estudos de toxicidade e efeitos benéficos sobre a microbiota normal (COWAN, 1999).

Algumas medidas podem ser tomadas para minimizar o problema da resistência microbiana: controlar o uso de antibióticos, ampliar as pesquisas para melhor entender o mecanismo genético de resistência ou continuar estudos para desenvolver novos fármacos de origem sintética, natural ou, ainda, obtidos por via biotecnológica (AMOROSO, 2002; NASCIMENTO et al., 2000).

Com relação ao tratamento farmacológico no campo veterinário, em especial, na bovinocultura leiteira, observa-se com freqüência, o uso de medicamentos em excesso e sem respeitar o período de carência necessário. Além de prejudicar a saúde das pessoas que consomem esses produtos de origem animal, há um grande investimento econômico por parte dos produtores para adquirirem medicamentos convencionais para o tratamento das mais variadas doenças de origem bovina (GALDINO et al., 2007).

Almeida, Freitas e Pereira (2006) através de um questionário direcionado à

cerca de 140 estudantes de medicina veterinária sobre seus conhecimentos sobre fitoterapia, constataram que: 86,2% dos estudantes confiam na fitoterapia, podendo passar a incentivá-la; 73,9% dos estudantes conhecem a fitoterapia, porém apenas 36,2% usaram-na, e destes, todos obtiveram resultado eficaz; o baixo custo associado ao menor efeito colateral da flora medicinal foram as vantagens de maior importância e, finalmente, a fitoterapia não apresentou qualquer desvantagem, na opinião de 23,0% dos entrevistados, porém, ressaltaram a necessidade de mais pesquisas nesta área.

Tão importante quanto o cuidado com a saúde das pessoas, o tratamento adequado dos animais de produção garante um alimento seguro e de qualidade para o consumo humano. A prática de utilização de produtos naturais no animal em substituição ao tratamento tradicional apresenta inúmeras vantagens como: tornar mais saudável o alimento de origem animal (uma vez que os medicamentos naturais tendem a não apresentar resíduos nocivos), diminuir o custo da produção e, incrementar a renda de todos os envolvidos no processo (GALDINO et al., 2007).

Cabe salientar que, as observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais contribuem, de forma relevante, para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais apesar de, na maioria das vezes, não terem seus constituintes químicos elucidados. Assim, usuários de plantas medicinais de todo o mundo mantendo em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornam válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (BERTINI et al., 2005).

De Maar (1992) enfatiza a necessidade de revisar nosso enfoque de medicina veterinária, na direção da integração do novo ou cientificamente desenvolvido com os saberes tradicionais ou não ortodoxos. O autor ressalta a importância dos países em desenvolvimento resgatarem os conhecimentos praticados por centenas de anos pelos povos nativos, buscando soluções eficazes e de baixo custo aos problemas veterinários, elegendo a etnoveterinária como a ciência capaz de identificar e analisar estes conhecimentos. Altieri (1987) concorda, sob a perspectiva da agroecologia, reafirmando a necessidade de modelos de agricultura sustentável que combinem elementos de ambos os conhecimentos: tradicional e moderno-científico.

É interessante, portanto, que estudos na área de produtos naturais sejam aprofundados no intuito de conhecer melhor suas atividades biológicas para que, cada vez mais possam ser utilizados no controle de microrganismos.

1.5 METABOLISMO VEGETAL

As plantas contêm várias substâncias que agem sobre os organismos vivos. É a fitoquímica que se encarrega de estudar essas substâncias chamadas de princípios ativos, bem como sua estrutura, isolamento, distribuição e armazenamento.

Já os processos de transformação e biossíntese que ocorrem durante o desenvolvimento vegetal fazem parte dos estudos do metabolismo secundário dos vegetais (PAULA e CLEMENTE, 2003). As substâncias ativas das plantas podem ser originárias também do metabolismo primário, no entanto, predominam as substâncias provenientes do seu metabolismo secundário (PAULA e CLEMENTE, 2003).

Os processos fotossintéticos contribuem para a geração de compostos do metabolismo primário (envolvidos nos processos de assimilação, respiração e diferenciação). Destacam-se pelo emprego medicinal principalmente os polissacarídeos e os peptídeos (PAULA e CLEMENTE, 2003). Contudo, na maioria das vezes, os efeitos benéficos dos extratos vegetais resultam da combinação de seus metabólitos secundários. Vários autores têm mostrado que os metabólitos secundários exercem importantes funções ecológicas e representam estratégias alternativas para a sobrevivência das plantas, exercendo efeitos alelopáticos, intimidando predadores, atraindo polinizadores, entre outros.

Os compostos secundários podem ser divididos basicamente em três grandes grupos: os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos contendo nitrogênio (Figura 3). Os terpenos são compostos sintetizados do acetil CoA, da via ácido mevalônico e os compostos fenólicos são substâncias aromáticas. Os produtos secundários contendo nitrogênio são primariamente biossintetizados a partir dos aminoácidos, destacando-se neste grupo os alcalóides (PAULA e CLEMENTE, 2003). Segundo Costa (1994), diversos fatores influenciam na disponibilidade de princípios ativos nas plantas e estes se diferenciam de uma espécie para outra.

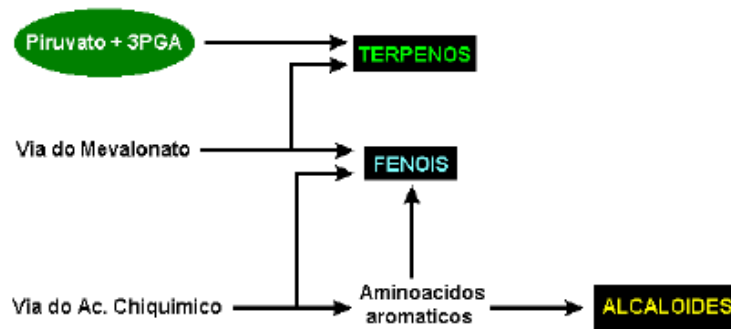


Figura 3 - Principais vias do metabolismo secundário (Adaptado de Metabolismo Secundário, Peres, S. L. E. P.).

Em seguida, será apresentada uma breve revisão baseada em informações contidas em Neto e Lopes (2007), na qual são apresentados os principais fatores responsáveis por alterações no metabolismo secundário das plantas:

1) A época em que uma droga é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. Existem também, cada vez mais estudos mostrando que a composição de metabólitos secundários de uma planta pode variar apreciavelmente durante o ciclo dia/noite, tendo sido descritas, por ex., variações circadianas nas concentrações de óleos voláteis, iridóides, alcalóides, glucosinolatos, glicosídeos cianogênicos e tiocianato; 2) a idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura; 3) a temperatura, pois as plantas freqüentemente são capazes de existir em uma considerável faixa de temperatura. A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura exerce uma grande influência no seu desenvolvimento, afetando a produção de metabólitos secundários; 4) os fatores fisiológicos críticos, tais como fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, podem ser alterados por estresse hídrico e, conseqüentemente, levar a alterações no metabolismo secundário. 5) a intensidade de radiação solar que está diretamente relacionada à produção de compostos fenólicos como flavonóides, taninos e antocianinas. Isso pode ser explicado, principalmente no caso de flavonóides e fenilpropanóides correlatos, pela proteção contra a foto-destruição proporcionada por estes metabólitos ao absorver

e/ou dissipar a energia solar, dificultando assim a danificação dos tecidos mais internos pela radiação UVB; 6) a altitude é outro parâmetro que exerce efeitos sobre o desenvolvimento e a produção de metabólitos secundários em plantas, apesar de existirem relativamente poucos estudos neste sentido. A correlação positiva geralmente existente entre o conteúdo total de flavonóides e a altitude, é de particular interesse farmacêutico, uma vez que estes são constituintes ativos de um grande número de plantas medicinais. Esta correlação pode ser explicada pela maior susceptibilidade à radiação UV em altitudes maiores, uma vez que, conforme comentado anteriormente, os flavonóides são reconhecidos por propiciarem proteção à radiação e seus efeitos. 7) Finalmente, os danos causados às plantas por ferimentos ou ataque de herbívoros ou patógenos freqüentemente levam a uma resposta bioquímica com a produção de outros compostos como as fitoalexinas (derivados de fenilpropanóides, terpenóides ou poliacetilenos).

Os fatores expostos aqui, bem como outros que podem afetar o conteúdo final de metabólitos secundários em plantas medicinais, tais como condições de coleta, estabilização e estocagem, podem ter grande influência na qualidade e, conseqüentemente, no valor terapêutico de preparados fitoterápicos. O controle de qualidade e a padronização desses medicamentos envolvem várias etapas, entretanto, a fonte e a qualidade das matérias-primas têm um papel central na obtenção de produtos, garantindo a constância na composição e em propriedades terapêuticas reprodutíveis.

O aprimoramento e o investimento em estudos de domesticação, produção biotecnológica e melhoramento genético de plantas medicinais, ao invés do uso de plantas selvagens coletadas diretamente no campo, contribuirá para a obtenção de matérias-primas uniformes e de melhor qualidade.

1.6 PEPTÍDEOS OBTIDOS DE VEGETAIS

Os peptídeos antimicrobianos constituem parte da resposta inata e representam a primeira linha de defesa contra infecções microbianas em muitos organismos (ZASLOFF, 2002; YEAMAN e YOUNT, 2003; TOSSI, 2005). Muitos desses peptídeos têm sido clonados, expressos e testados tanto *in vivo* como *in vitro* (WU et al., 2000; METLITSKAIA et al., 2004; INGHAM et al., 2005), e têm

demonstrado grande habilidade em combater ou minimizar os impactos das infecções bacterianas.

Atualmente, cerca de 880 diferentes peptídeos antimicrobianos já foram identificados. Essas moléculas constituem um único e diverso grupo, as quais são divididas em subgrupos, tendo como base sua composição de aminoácidos e sua estrutura (BROGDEN, 2005).

As tioninas, por exemplo, constituem uma família de peptídeos básicos, com baixo peso molecular e um rico conteúdo de resíduos de aminoácidos básicos contendo enxofre (arginina, lisina e cisteína). Os membros desta classe peptídica possuem uma elevada similaridade seqüencial e estrutural e apresentam efeitos tóxicos contra fungos, leveduras, células animais e vegetais (CASTRO e FONTES, 2005).

De um modo geral, os peptídeos atingem a célula microbiana de forma muito rápida, em baixas concentrações inibitórias mínimas. O seu provável alvo de ação são os fosfolípidos e não as enzimas, resultando em uma diminuição de resistência do patógeno aos mesmos. Essas características tornam o uso dos peptídeos antimicrobianos mais convincente e apelativo (OARD e ENRIGHT, 2006).

Segundo o modelo de Matsuzaki (1999), o mecanismo de ação da maioria dos peptídeos antimicrobianos é baseado nas interações entre as cargas dos peptídeos com os fosfolípidos de membrana, resultando na ruptura da mesma e dano celular (MATSUZAKI, 1999; YANG et al., 2000).

De fato, alguns estudos sugerem que os peptídeos translocados possam alterar a formação do septo da membrana citoplasmática e inibir a síntese da parede celular, dos ácidos nucléicos e de proteínas ou, ainda, alterar a atividade enzimática (BROGDEN, 2005). Segundo Brogden (2005), as seguintes características dos peptídeos afetam tanto a sua atividade antimicrobiana como a especificidade: tamanho (geralmente di e tri-peptídeos apresentam uma maior atividade antimicrobiana), a seqüência de aminoácidos, conformação, estrutura (peptídeos com estrutura em α -hélice exibem maior atividade do que aqueles com uma estrutura secundária pouco definida), hidrofobicidade e anfipaticidade.

Apesar da inter-relação entre a estrutura do peptídeo e sua atividade antimicrobiana, pouco se sabe sobre a base molecular e as diferenças entre atividade e especificidade. Quanto à susceptibilidade dos microrganismos, sabe-se que a composição da membrana lipídica é importante e que bactérias com

membranas citoplasmáticas ricas em fosfolipídeos são mais susceptíveis aos peptídeos (BROGDEN, 2005).

A grande quantidade de peptídeos e proteínas oriundos de vegetais com efeitos inibitórios sobre o crescimento e desenvolvimento de outros organismos tem demonstrado que essas substâncias podem constituir uma fonte potencial de estudos envolvendo a genética de diferentes espécies de plantas (CASTRO e FONTES, 2005). Estas observações têm uma aplicação prática no uso desses peptídeos na produção de plantas transgênicas (LACERDA, 2006).

As doenças bacterianas e fúngicas provocam gastos de milhões de dólares e representam um grande desafio para os produtores rurais. Ao mesmo tempo, a produção de colheitas resistentes a diversos microrganismos através de métodos convencionais tem apresentado sucesso limitado. Segundo Hancock e Lehrer (1998) e Zasloff (2002), a introdução de peptídeos antimicrobianos através da transformação genética da planta poderá oferecer uma solução para a resistência tanto aos patógenos fúngicos, como aos bacterianos. Acredita-se que a biotecnologia terá uma contribuição fundamental no aumento da produção agroindustrial através do aumento da qualidade da produção. Tal fato será possível através da manipulação dos mecanismos endógenos que envolvem a expressão de genes de defesa, especialmente, aqueles que controlam a interação planta-patógeno.

1.7 ESPÉCIES VEGETAIS DE INTERESSE

Para o estudo da atividade antimicrobiana foram selecionadas as espécies: *P. ermarginatus* Vogel, *L. lacunosa*, *L. salvifolia* e *L. rotundifolia*. Tal escolha ocorreu devido aos relatos encontrados na literatura sobre suas propriedades farmacológicas e amplo uso na medicina popular.

1.7.1 *Pterodon ermarginatus* Vogel

Pterodon emarginatus Vog. (Figura 4) conhecida popularmente como faveiro, sucupira-branca, fava-de-sucupira ou sucupira é uma árvore que faz parte da

vegetação do cerrado brasileiro (KLINK et al., 1985). Pertence à família Leguminosae (Papilionoideae), apresenta como sinonímia botânica *P. pubescens* Benth e é facilmente encontrada em toda a extensão desse ecossistema. É bem adaptada a solos de baixa fertilidade, apresentando porte de 10 m a 15 m (SILVA et al., 2005).

É uma planta decídua, heliófita, xerófito, característica de terrenos secos e arenosos do cerrado. Sua dispersão é irregular e descontínua, ocorrendo em agrupamentos densos e, muitas vezes até em populações puras. Um dos seus principais usos justifica-se pela sua madeira, considerada pesada (densidade 0,94 g/cm³), com tecido compacto e revesso, bastante dura, difícil de rachar, de longa durabilidade mesmo quando em contato com solo e umidade. Geralmente, é utilizada em construção civil e naval, pilares de pontes, postes, dormentes, assoalho de vagões e de carrocerias, carvão e lenha. A árvore é ornamental, porém, infelizmente ainda não foi devidamente aproveitada para o paisagismo. Apesar de seu lento crescimento, pode ser usada com sucesso na arborização de ruas e praças. Como planta tolerante à luz direta e pouco exigente em solos, não pode faltar nos reflorestamentos mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1992).

A planta inteira é empregada na medicina popular em toda região de sua ocorrência natural. A casca produz um óleo volátil e aromático, muito eficiente no tratamento do reumatismo, possivelmente o mesmo encontrado nos alvéolos das sementes. As túberas radiculares ou “batatas-de-sucupira” são empregadas no tratamento de diabetes (MORS et al., 1966).

As sementes do gênero *Pterodon* estão disponíveis comercialmente no mercado de flora medicinal e são usadas na medicina popular devido aos seus efeitos anti-reumáticos, analgésicos e propriedades antiinflamatória (COELHO et al., 2001, DUARTE et al., 1996). Segundo Neves et al. (2007), a planta possui como principais constituintes químicos com atividade farmacológica: 14,15-epoxigeranilgeraniol, diterpenos e isoflavonas.

O gênero *Pterodon* compreende cinco espécies brasileiras nativas: *P. abruptus* Benth, *P. apparicioni* Pedersoli, *P. emarginatus* Vogel, *P. pubescens* Benth e *P. polygalaeflorus* Benth. Os estudos voltados para estas espécies foram motivados pelos achados sobre atividade anti-cercária tanto do óleo do fruto de *P. pubescens* Benth como das outras quatro espécies, além da atividade

antimicrobiana *in vitro* do óleo obtido de *P. pubescens* Benth (CARVALHO et al., 1999).

Dutra (2008) demonstrou atividade bactericida do óleo essencial das sementes de *P. ermaginatus* contra *S. aureus* com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 2,5 mg/mL. O mesmo não foi observado para *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Cândida albicans*. No mesmo estudo ficou evidenciada atividade antioxidante (frações butanólica e metanólica), atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, antinociceptiva, cicatrizante, gastroprotetora, antiinflamatória e antitumoral.

1.7.2. *Lippia lacunosa*, *Lippia salvifolia* e *Lippia rotundifolia*

O gênero *Lippia* abrange cerca de 200 espécies distribuídas principalmente nos neotrópicos e subtropicais, tendo o Brasil, México e Argentina como centros de diversidade. O maior número de espécies se encontra no Brasil, cerca de 150, com ocorrência especialmente nos campos rupestres e cerrados. Um dos principais centros de diversidade do gênero está localizado na Cadeia do Espinhaço (SALIMENA, 2000). O gênero é de grande importância econômica devido aos diferentes usos dos óleos essenciais, sendo muitas espécies medicinais.

Os óleos essenciais obtidos de suas folhas são produzidos comercialmente, sendo indicados para o tratamento de problemas respiratórios, gastrintestinais e como vermífugos (Hennebelle et al., 2008). Leitão et al. (2006) demonstraram o efeito antimicobacteriano das espécies *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* contra o *Mycobacterium tuberculosis*.

Uma das espécies extensivamente estudadas é *L. sidoides*, conhecida vulgarmente como alecrim-pimenta. Além do estudo acima citado sobre a atividade antimicobacteriana, poucos foram os relatos obtidos na literatura científica sobre as atividades farmacológicas das espécies alvo deste estudo: *L. lacunosa*, *L. salvifolia* e *L. rotundifolia*.

1.8 CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

O uso de testes *in vitro* possibilita uma rápida compreensão sobre os perfis

toxicológicos dos compostos químicos e os efeitos destas substâncias sobre tecidos ou células específicos (EISENBRAND et al., 2002). Várias das substâncias químicas estudadas apresentaram uma boa correlação entre a toxicidade basal e a toxicidade em humanos (CLEMEDSON et al., 2000). A citotoxicidade basal, comumente avaliada, é aquela que afeta estruturas e funções comuns a todas as células do organismo como membrana celular, mitocôndria, ribossomos, cromossomos e lisossomos. Alterações nas funções basais geralmente afetam as específicas (BARILE, 1994). Os estudos de citotoxicidade se baseiam, portanto, no estudo de parâmetros relacionados às funções celulares basais. As células respondem rapidamente ao estresse causado por substâncias tóxicas, ocorrendo alterações, por exemplo, nas taxas metabólicas, crescimento celular e transcrição de genes que controlam funções básicas (EISENBRAND et al., 2002). Quando comparadas com as investigações *in vivo*, os estudos *in vitro* são mais facilmente controlados e apresentam melhor reprodutibilidade (SCHMALZ, 1994; FRESHNEY, 2000).

A avaliação de citotoxicidade pode ser feita através de ensaios qualitativos ou quantitativos. Os ensaios qualitativos consistem na avaliação da morfologia das células após a exposição a um agente exógeno através de descrição ou atribuição de escores. Os quantitativos caracterizam-se pela quantificação do número e atividade celulares após a exposição ao agente teste (INTERNACIONAL STANDARD ORGANIZATION–ISO 10993-5).

Além da descrição da morfologia frente a um material potencialmente tóxico, diferentes resultados podem ainda ser utilizados como indicadores de dano celular, tais como: efeitos na membrana, na atividade celular e na taxa de proliferação (SCHMALZ, 1994). As alterações morfológicas podem ser analisadas, comparando-se as células expostas ao material-teste com células não-expostas (LEYHAUSEN et al., 1998). A exposição das células a agentes tóxicos pode levar à morte celular alterando, portanto, o número e a taxa de proliferação das mesmas. A contagem de células utilizando-se hemocitômetro é um método empregado para avaliar citotoxicidade (COSTA et al., 2003; KOULAOZIDOU et al., 1998; FRICAIN et al., 2002).

A partir da avaliação da atividade antimicrobiana e testes de citotoxicidade dos extratos vegetais, pode-se analisar a viabilidade de empregá-los como substâncias tóxicas auxiliares no tratamento da mastite ou ainda na formulação de produtos desinfetantes utilizados na assepsia dos tetos e mãos de ordenhadores.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliação *in vitro* da atividade de plantas com indicativo etnográfico antimicrobiano contra bactérias causadoras de mastite bovina.

2.2 ESPECÍFICOS

1- Avaliar a atividade antimicrobiana, *in vitro*, de frações vegetais da espécie *Pterodon emarginatus* e dos extratos aquosos de *Lippia lacunosa*, *Lippia salvifolia* e *Lippia rotundifolia* frente aos seguintes microrganismos isolados de mastite bovina: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Klebsiella pneumoniae*.

2- Avaliar, *in vitro*, a atividade citotóxica dos extratos vegetais com atividade antimicrobiana em fibroblastos bovinos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As sementes da espécie *P. emarginatus* Vogel foram coletadas no cerrado em setembro de 2006, no município de Três Marias/MG, com respectiva caracterização botânica realizada pela Dr^a Fátima Regina Gonçalves Salimena e tombada na coleção do Herbário CESJ (n^o 48077) do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) - Minas Gerais, Brasil.

As espécies de *Lippia* foram obtidas da Estação Experimental de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora. As flores de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* foram coletadas no mês de agosto e entre os meses de junho a setembro de 2007, respectivamente. As folhas de *L. salvifolia* foram coletadas no mês de dezembro do mesmo ano. A caracterização botânica das espécies foi realizada pela Dr^a Fátima Regina Gonçalves Salimena. Os exemplares "Voucher" de cada coleta foram incorporados ao herbário CESJ (ICB/UFJF) conforme as técnicas usuais.

3.2 PREPARO DAS FRAÇÕES

3.2.1 *Pterodon emarginatus*

Para a realização dos ensaios, as sementes de *P. emarginatus* foram trituradas com auxílio de tesoura de poda. O preparo das frações, a partir das sementes de *P. emarginatus*, foi realizado segundo Costa (2000). Todos os reagentes empregados foram de grau analítico (para análise- p.a.) (Dinâmica-Brasil). Após a coleta, as sementes foram submetidas à extração com hexano, acetato de etila, butanol, metanol e etanol utilizando aparelho de Soxhlet. Cerca de 30 g de sementes de *P. emarginatus* foram acondicionadas ao cartucho e acopladas ao extrator do aparelho. O balão foi adaptado e ao extrator foi adicionado, inicialmente, hexano em quantidade suficiente para atingir a primeira sifonagem. Foi ligado a este conjunto o respectivo condensador, que foi arrefecido por água corrente. O

aquecimento ocorreu por meio de manta de aquecimento (MA 553, Marconi, Brasil) e todas as sifonagens ocorreram até o esgotamento completo da extração (24 h). Ao final deste período, o sistema foi desligado e o balão trocado. Foi adicionado o novo solvente, neste caso, acetato de etila realizando os mesmos procedimentos descritos acima. Foram, ainda, empregados na seqüência, os solventes: butanol, metanol, e etanol, obtendo-se frações de diferentes polaridades. Para a eliminação dos solventes, as frações foram submetidas à rotaevaporação (R-114, Buchi, Suíça). Ao final, foram obtidas cinco frações de diferentes polaridades: fração hexânica (FH), acetato de etila (FAE), butanólica (FB), metanólica (FM) e etanólica (FE).



Figura 4 - Sementes de *Pterodon ermaginatus* Vogel.
Autora: Carolina C. R. Quintão, 2009.

3.2.2 GÊNERO *LIPPIA*

3.2.2.1 EXTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Folhas frescas de *L. salvifolia*, flores secas de *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* foram trituradas utilizando tampão Tris-ácido clorídrico (Tris-HCl) a 0,1% e cloreto de sódio (NaCl) a 0,6M. Os extratos foram centrifugados (5810R, Eppendorf, Alemanha) a 5.000 rotações por minuto (rpm), à temperatura de 4°C por 40 minutos e o sobrenadante foi submetido à precipitação com sulfato de amônio (50%). Após a precipitação, o material foi centrifugado a 5.000 rpm (5810R, Eppendorf, Alemanha) à temperatura de 4°C por 30 minutos (PELEGRINI et al., 2006). O precipitado formado foi submetido à diálise contra água destilada empregando membrana

(Modelo Spectra/3) de 3,5 kD e posteriormente liofilizado (4451F, Labconco, EUA).

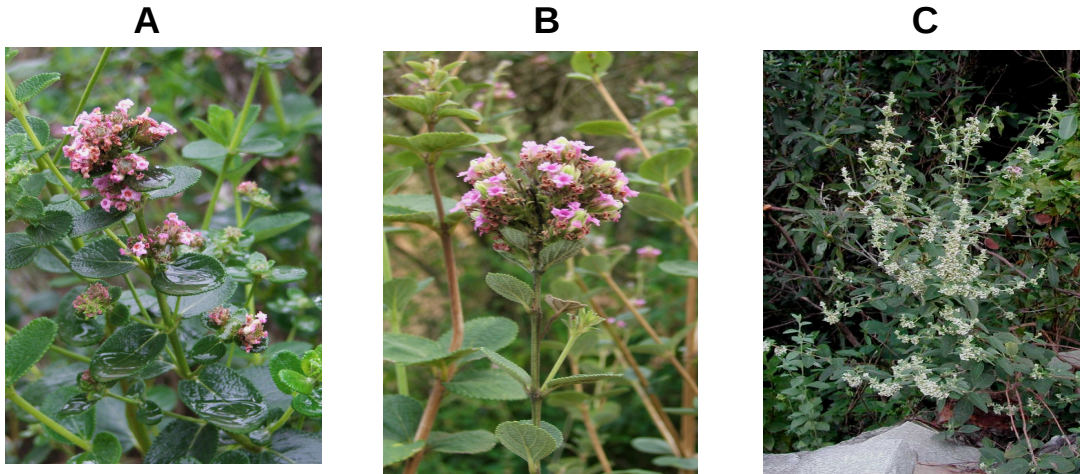


Figura 5 - Espécies do gênero *Lippia* . A) *Lippia lacunosa*; B) *Lippia rotundifolia*; C) *Lippia salvifolia*. Autor: Lyderson Facio Viccini, 2008.

3.2.2.2 QUANTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

A quantificação de proteínas no extrato utilizado no bioensaio foi determinada usando o método de Bradford (BRADFORD et al., 1976) com subsequente leitura de absorbância no espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu, Japão). Para a determinação das proteínas totais, foi utilizada uma curva padrão de proteínas utilizando-se albumina bovina sérica (BSA) (Sigma-Aldrich), nas seguintes concentrações: 0,016; 0,032; 0,063; 0,125; 0,25 e 0,5 mg/mL. Os tubos contendo os calibradores e as amostras foram lidas em espectrofotômetro empregando comprimento de onda fixo de 595 nm. Todas as determinações dos níveis de proteínas foram realizadas em triplicata.

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi realizada utilizando seis microrganismos isolados de animais com mastite, disponibilizados pela Embrapa Gado de Leite, com sede em Juiz de Fora, MG. São estes: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

agalactiae, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Klebsiella pneumoniae*. Esses microrganismos foram obtidos de bovinos infectados, localizados em propriedades rurais no interior de Minas Gerais, no período de abril/1999 a fevereiro/2007.

Para a realização desta atividade foi utilizado o método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (USP 21,1985). O antibiótico padrão utilizado para todas as análises foi a gentamicina (sulfato de gentamicina, Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA) nas concentrações de 0,001-10 µg/mL.

3.3.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), uma suspensão bacteriana de cada microrganismo foi preparada com solução fisiológica estéril (9,0 g/L NaCl). Para a padronização desta suspensão foi utilizado espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu, Japão) ($\lambda = 580\text{nm}$). Os microrganismos foram diluídos com solução fisiológica estéril até a obtenção de 25% de transmitância. Logo em seguida, a suspensão microbiana padronizada foi submetida à uma diluição seriada (10^{-1} - 10^{-9}) com solução fisiológica estéril. Alíquotas de 1,0 mL das diluições 10^{-6} a 10^{-9} foram plaqueadas, por técnica de *pour-plate*, em meio *Tryptic Soy Agar* (TSA), em duplicata. Após a incubação a 37° C em estufa bacteriológica (502 Orion, Fanem, Brasil) por 24 horas, as colônias foram contadas com auxílio de contador de colônias (CP 600 Plus, Phoenix, Brasil) e foi definida a diluição que apresentava entre 10^3 a 10^4 unidades formadoras de colônia (UFC) /mL. Foram preparadas cinco diluições sucessivas da amostra a ser testada: 0,625 - 10 mg/mL, para as sementes de *P. ermaginatus* e 5 - 80 µg/mL para as espécies de *Lippia*. Para o preparo do controle positivo (Figura 7) foram adicionados a um tubo de ensaio 4 mL de caldo caseína somente inoculado com o microrganismo. Para o controle negativo (Figura 7) foram adicionados ao tubo de ensaio 4 mL de caldo caseína estéril. O procedimento foi realizado em triplicata. No preparo dos tubos teste foram acrescentados 4 mL de caldo caseína inoculados com os referentes microrganismos e 1 mL de cada concentração da amostra-teste utilizada. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C por 24 horas. A concentração inibitória mínima foi determinada através da observação de turvação dos meios de cultura, após o

período de 24 horas (USP 21, 1985).

3.4 CULTIVO CELULAR

3.4.1 MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

Foi utilizado o meio de cultura DMEM (Nutricell) que consiste basicamente em uma modificação do Eagle's Basal Medium (BME). O meio DMEM inclui concentrações de aminoácidos maiores que o BME assemelhando-se às concentrações protéicas das células de mamíferos. O DMEM tem sido utilizado na cultura de grande variedade de células de crescimento em monocamada. Na fórmula modificada, a eliminação do cálcio possibilita o crescimento de células em suspensão (FRÖHNER, 2003).

O soro fetal bovino foi adicionado ao meio DMEM para permitir que as células em cultura não apenas sobrevivam, mas também se reproduzam. Sabe-se que a divisão celular só é possível na presença de um certo número de fatores mitógenos, que são então fornecidos pelo soro fetal. É preferível a utilização de soro de origem animal, extraído de indivíduos jovens, já que o efeito estimulante do soro é inversamente proporcional à idade do doador. Portanto, ao meio DMEM foi acrescentado 10% de soro fetal bovino (Nutricell) para o crescimento e manutenção das células (FRÖHNER, 2003).

Antibióticos foram adicionados ao meio para evitar a contaminação das culturas por bactérias, na proporção de 0,1ml de penicilina/estreptomicina (Sigma 250.000U penicilina, 0,25 g estreptomicina) para cada 100 ml de meio DMEM.

A tripsina é uma enzima que faz parte do grupo das proteases, que catalisam reações de quebra da cadeia polipeptídica em determinadas sequências de aminoácidos. A tripsina rompe a cadeia peptídica quando os aminoácidos da extremidade amino-terminal são L-lisina ou L-leucina. Esta enzima não requer a presença de co-fatores e é muito utilizada em culturas celulares, que necessitam de um suporte para se fixarem e proliferarem. Ela age, então, sobre as proteínas que permitem a fixação das células no suporte, liberando-as. A tripsina deve ter sua ação proteolítica inibida, após o descolamento das células, para evitar a citólise. Esta inibição é feita através da adição de SFB às células. Nos experimentos foi utilizada

tripsina (Sigma) preparada em uma solução de EDTA a 0,25%. O ácido etilenodiaminotetracético – EDTA é adicionado a fim de potencializar a ação da tripsina pela remoção do cálcio e magnésio da superfície das células (VIDAL, 2007).

3.4.2 OBTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR

Para avaliação de citotoxicidade foram utilizadas linhagens de fibroblastos bovinos congeladas, obtidas no Campo Experimental de Coronel Pacheco (CECP) da Embrapa Gado de Leite.

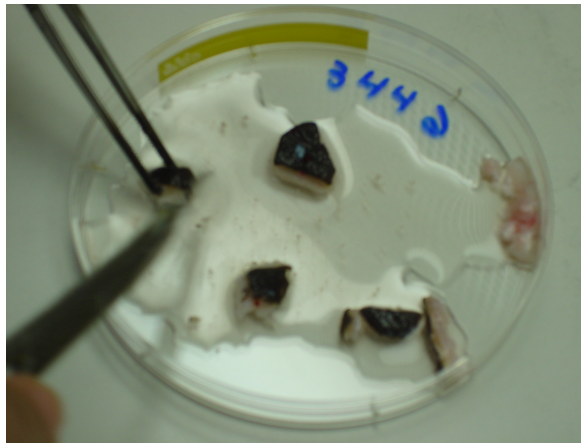


Figura 6- Explante obtido de orelha bovina.

Os fibroblastos foram obtidos a partir de fragmentos (explantes) de orelha de vacas (Figura 6). Para tal, foi realizada a assepsia e a tricotomia da orelha do animal e em seguida retirado um fragmento de aproximadamente 1 cm². O material seguiu para o laboratório em solução salina de fosfato tamponado (PBS) acrescida de antibiótico e soro fetal bovino (SFB) em gelo. Os explantes foram lavados com a mesma solução de transporte e então foi realizada a retirada da cartilagem. Após esta etapa, os explantes foram lavados e cultivados em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) enriquecido com SFB (10%), glutamina (0,584g/L), glicose (4,5 g/L), NaHCO₃ e antibiótico (1%). O cultivo para estabelecimento das linhagens celulares foi realizado por aproximadamente 14 dias, em incubadora mantida a temperatura em 37°C, 5% CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade. Os explantes foram retira-

dos em torno do sétimo dia de cultivo. A primeira passagem só foi realizada quando as células atingiram a confluência de 80% da placa. O crescimento celular foi observado, diariamente, através de um microscópio de fase invertida (ICM 405, Zeiss, Alemanha).

O meio de cultura foi trocado a cada dois dias, substituindo-se apenas metade do conteúdo das placas de cultivo por meio de cultura novo. A alteração da coloração do meio de cultura, que indica atividade metabólica celular e alteração de pH, foi controlada diariamente. O protocolo de cultura utilizado foi aquele proposto por Kuru et al. (1998) com modificações.

Todos os procedimentos para a obtenção do cultivo primário de fibroblastos bovinos foram realizados sob capela de fluxo laminar (VECO, Campinas, Brasil), em temperatura ambiente, entre 25 e 28°C.

Para análise da viabilidade celular e morfologia foram utilizadas amostras celulares na 6ª passagem e as células remanescentes foram congeladas para estocagem.

3.4.3 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES

A linhagem celular de fibroblastos bovinos foi mantida em nitrogênio líquido e armazenada em criotubos no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite até o momento de uso. A solução de congelamento das células consistia em uma solução de DMEM (Nutricell) com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) e 30% de soro fetal bovino - SFB (Nutricell).

As células foram removidas da solução de congelamento e colocadas em banho-maria a 37°C. A suspensão celular foi diluída (1:10, v/v) no meio de cultivo e centrifugada a 18 rpm (BE-6000, Bioeng) por 3 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspenso em DMEM para o cálculo da concentração da suspensão celular. Posteriormente, foi feita a contagem das células em hemocítmetro de *Neubauer*; as células foram distribuídas nas placas de cultivo conforme a concentração desejada.

Para a manutenção dessa linhagem celular, o meio de cultura foi removido e as células foram repicadas duas vezes por semana, em fluxo laminar (Veco, Campinas, Brasil) previamente limpo com álcool 70%. Em cada repique, foram

mantidas 5×10^4 células/mL em placas de *Petri* de poliestireno de 100 mm de diâmetro (Iwaki) obtendo um volume final de 10 mL.

As culturas foram visualizadas em microscópio invertido (ICM 405, Zeiss, Alemanha) e mantidas em estufa com 5% de CO_2 (6100, Napco, Canadá) a 37°C até o momento de seu uso nos testes de citotoxicidade.

3.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

3.5.1 MORFOLOGIA CELULAR

Para a avaliação microscópica das alterações celulares foi seguido o modelo proposto por Fröhner (2003), com algumas modificações. As células cultivadas em estufa incubadora mantida em temperatura de 37°C , 5% de CO_2 em ar atmosférico e 95% de umidade, foram observadas quanto à formação do tapete celular (confluência). As células foram tripsinizadas e distribuídas em uma placa de cultivo de 96 poços, na qual cada poço continha 100 μL da suspensão celular (aproximadamente 2×10^4 células/mL). Essas células foram levadas à estufa por mais 24h. Em seguida, as diferentes concentrações (10 - 160 $\mu\text{g/mL}$) dos extratos de *L. salvifolia*, *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* foram adicionadas. A análise morfológica foi feita após 24 h de contato entre os extratos e as células, em um microscópio invertido (ICM 405, Zeiss, Alemanha). Nos controles celulares, foi adicionado somente o meio DMEM.

As alterações morfológicas foram comparadas com os controles celulares. Esta técnica permitiu estimar a concentração que causa citotoxicidade a 50% das células de uma cavidade (CC_{50}). As alterações morfológicas do tapete celular foram classificadas em quatro categorias, de acordo com a porcentagem de alteração celular (SIMÕES et al., 1990):

- 1 = de 0 a 25% aproximadamente do tapete celular com alterações;
- 2 = de 26 a 50% aproximadamente do tapete celular com alterações;
- 3 = de 51 a 75% aproximadamente do tapete celular com alterações;
- 4 = de 76 a 100% aproximadamente do tapete celular com alterações;

A CC_{50} foi estimada a partir dos valores das categorias (1 a 4), em relação aos

controles celulares, por análise de regressão (SOKAL e ROHLF, 1995).

3.5.2 VIABILIDADE CELULAR

Diferentes técnicas de coloração (cristal violeta, eosina, vermelho neutro, azul de *Trypan*, etc.) são usualmente utilizadas para avaliar a citotoxicidade de substâncias. No presente trabalho foi utilizado o teste de exclusão com o azul de *Trypan*, um corante que só penetra em células mortas, cujas membranas não podem mais excluí-lo. Este fenômeno de permeabilidade da membrana celular permite estimar indiretamente o grau de integridade da mesma. O percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular (WALUM, STRENBORG e JENSSEN, 1990).

Para o ensaio de citotoxicidade através do teste de exclusão do azul de *Trypan* foi seguido o modelo proposto por Fröhner (2003) com algumas modificações. Uma suspensão celular foi distribuída em uma placa de cultivo de 96 poços (100 μ L / poço). Após 24 horas de incubação, a 37°C, em estufa de CO₂, o tapete celular estava confluyente e foram adicionados os extratos vegetais (10 -160 μ g/mL), dissolvidos em meio DMEM. Mais 24 horas de incubação, o meio de cultivo foi descartado e o poço com as células foi lavado em PBS. O tapete celular foi dissociado por tripsinização. Após cinco minutos de contato entre a tripsina e as células, a enzima foi inativada através da adição de DMEM contendo 10% de SFB. A suspensão celular foi recolhida e centrifugada a 18 rpm (BE-6000, BIOENG) por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado ao pellet 50 μ L do corante azul de *Trypan* (solução a 0,4% em PBS). Esta solução foi mantida em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Em seguida, ocorreu uma nova centrifugação e o pellet foi lavado em PBS novamente. Após todas essas etapas, o pellet foi ressuspendido em 300 μ l de PBS e procedeu-se a contagem em hemocítmetro. As contagens foram realizadas (diluição 1/20 v/v), estabelecendo-se os percentuais de células viáveis em relação aos controles celulares.

A CC₅₀ foi estimada a partir das porcentagens das células viáveis em relação aos controles celulares, por análise de regressão (SOKAL e ROHLF, 1995).

3.6 DETERMINAÇÃO DA CC₅₀

Os resultados dos testes de citotoxicidade (viabilidade celular por exclusão do azul de *Trypan* e análise morfológica) foram convertidos em porcentagem onde as células na ausência dos extratos (controle negativo) correspondiam a 100% de viabilidade celular e ausência de alterações morfológicas. Assim, a análise de regressão foi realizada para os resultados de viabilidade celular e morfologia, resultando em uma equação usada para calcular a concentração de substância necessária para produzir 50 % de efeitos citotóxicos.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata para cada teste de citotoxicidade. As análises descritivas dos dados utilizaram de medidas de posição e de dispersão (média e erro padrão). Para avaliar a significância das diferenças entre as médias dos resultados nos grupos do teste de viabilidade celular, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software Statistical Package of Social Sciences* versão 14. Foi estabelecido como nível de significância um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para a espécie *Pterodon ermarginatus* foram testadas as frações hexânica, acetato de etila, butanólica, metanólica e etanólica. Para as espécies de *Lippia*, foi preparado o extrato aquoso contendo os peptídeos. Na Tabela 1 foram citadas somente as frações ou extratos que apresentaram atividade bactericida ou bacteriostática.

Tabela 1 Atividade antimicrobiana dos extratos vegetais frente às bactérias causadoras de mastite bovina.

Amostra	Microrganismo	CIM	Atividade antimicrobiana	Atividade da Gentamicina
<i>P. ermarginatus</i> (FE)	<i>S. aureus</i>	2,5 mg/mL	Bacteriostática	Bactericida*
<i>L. lacunosa</i> (EA)		80 µ g/mL	Bacteriostática	Bactericida*
<i>P. ermarginatus</i> (FH) (FE)	<i>S. agalactiae</i>	1,25 mg/mL 2,50 mg/mL	Bacteriostática Bacteriostática	Bacteriostática (CIM=10µg/mL)
<i>Lippia salvifolia</i> (EA)		80 µ g/mL	Bacteriostática	
<i>P. ermarginatus</i> (FH) (FE)	<i>S. uberis</i>	1,25 mg/mL 5,00 mg/mL	Bactericida Bactericida	Bacteriostática (CIM=10µg/mL)
<i>Lippia rotundifolia</i> (EA)		10 µ g/mL	Bacteriostática	Bactericida (CIM=0,01µg/mL)
<i>P. ermarginatus</i> (FH) (FE)	<i>S. bovis</i>	1,25 mg/mL 10,00mg/mL	Bactericida Bacteriostática	Bactericida (CIM=0,01µg/mL)
<i>P. ermarginatus</i> (FH)	<i>S. dysgalactiae</i>	0,625mg/mL	Bacteriostática	ND
<i>P. ermarginatus</i> (FH)	<i>Klebsiela pneumoniae</i>	5 mg/mL	Bacteriostática	ND
<i>P. ermarginatus</i> FH				ND
				Bacteriostática

Legenda: EA= extrato aquoso; FE= fração etanólica; FH= fração hexânica; ND= não detectada; * para todas as concentrações testadas (0,001-10 µg/mL.).

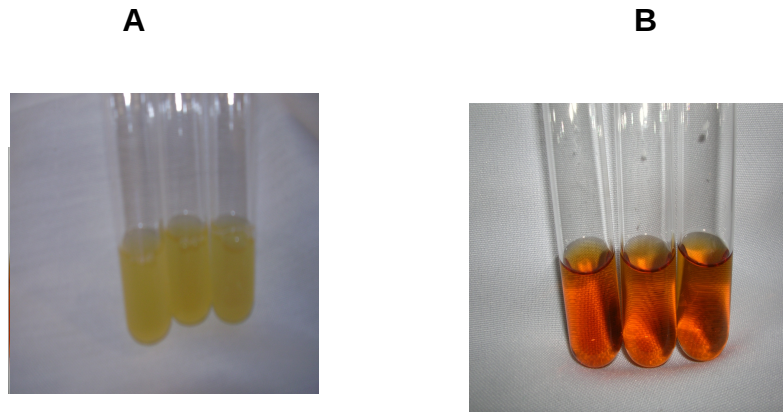


Figura 7 – Atividade antimicrobiana pelo método turbidimétrico
A) Controle positivo (aspecto turvo); B) Controle negativo (aspecto límpido).

4.2 CITOTOXICIDADE CELULAR

Foram utilizados dois parâmetros para a avaliação da citotoxicidade: a morfologia celular e a viabilidade celular, através do método de exclusão do corante azul de *Trypan*. Para estes testes foram utilizados os extratos aquosos contendo os peptídeos das espécies de *Lippia*.

Os valores de CC_{50} obtidos estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 Citotoxicidade dos extratos de *Lippia* em fibroblasto bovino.

Método utilizado	Extrato	CC_{50} (μ g/mL)
Avaliação microscópica das alterações morfológicas celulares	<i>L. salvifolia</i>	115
	<i>L. lacunosa</i>	ND
	<i>L. rotundifolia</i>	82±6,96
Viabilidade celular por exclusão do azul de <i>Trypan</i>	<i>L. salvifolia</i>	154,24
	<i>L. lacunosa</i>	ND
	<i>L. rotundifolia</i>	ND

Os valores representam a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes analisados em triplicata; ND = não detectada.

4.2.1 VIABILIDADE CELULAR

Células de fibroblastos bovinos foram expostas a diferentes diluições dos extratos de *L. salvifolia*, *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* durante 24 horas. A contagem do número de células remanescentes permitiu detectar uma relação diretamente proporcional entre dose e efeito dessas diluições na proliferação celular (Figura 8). As células tratadas com o extrato de *L. salvifolia*, apresentaram redução estatisticamente significativa em seu número, em relação ao controle, nas concentrações iguais ou superiores a 40 μ g/mL ($p < 0,05$).

As células tratadas com os extratos *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*, apesar de também apresentarem uma citotoxicidade dose-dependente, não apresentaram redução significativa no número de células quando comparadas ao controle ($p < 0,05$). Interessante destacar que os extratos de *Lippia lacunosa* e *Lippia rotundifolia*, mesmo na maior concentração testada, não promoveram a redução em 50% do número de células.

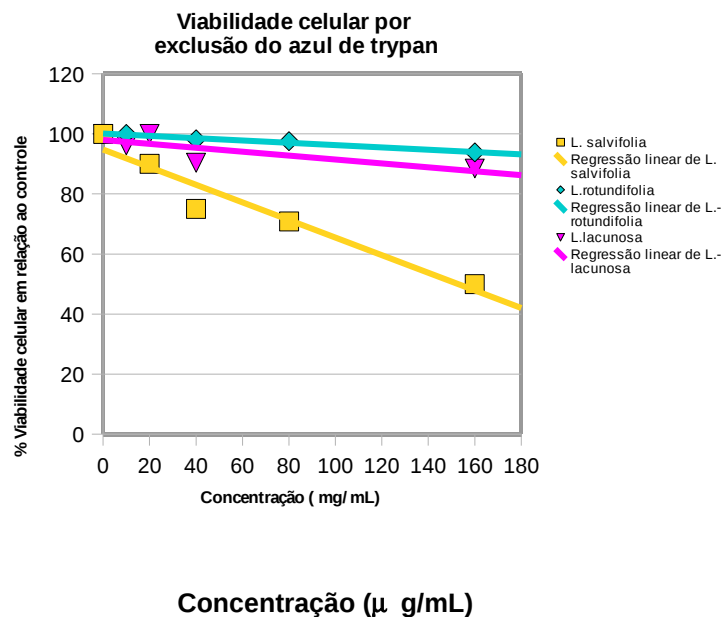


Figura 8 – Viabilidade celular de fibroblastos bovinos expostos a extratos de *Lippia salvifolia* (linha amarela), *Lippia lacunosa* (linha rosa) e *Lippia rotundifolia* (linha verde). Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes.

4.2.2 MORFOLOGIA CELULAR

Além da análise estatística das alterações morfológicas, foram realizadas análises descritivas de outros parâmetros celulares como confluência e aspecto alongado das células, a partir do tratamento com diferentes concentrações dos extratos. A análise descritiva dos achados foi realizada em relação ao grupo controle com o auxílio de um microscópio invertido. Foi possível observar que as células do grupo controle (Figura 9A) estão homogeneamente distribuídas na placa, apresentando um aspecto alongado, característico dos fibroblastos.

As células tratadas com *Lippia salvifolia* tiveram sua forma alterada com as concentrações de 160 μ g/mL (Figura 9B) e 80 μ g/mL (Figura 9C). Nestas concentrações, as células não apresentaram aspecto alongado, demonstrando-se irregulares e sem formato definido. O mesmo foi observado para os extratos de *Lippia lacunosa* e *Lippia rotundifolia* nestas concentrações. Através do gráfico da figura 10, é possível constatar uma relação diretamente proporcional entre o escore de alterações morfológicas e a concentração dos extratos (mg/mL). A concentração que promoveu 50% de alterações morfológicas nas células foi obtida a partir dos valores de cada categoria por análise de regressão (SOKAL e ROHLF, 1995). Tais concentrações foram de 115 μ g/mL para *Lippia salvifolia* e de $82 \pm 6,96$ μ g/mL para *Lippia rotundifolia*. O extrato aquoso de *Lippia lacunosa* não promoveu 50% de alterações morfológicas nas células nem na maior concentração.

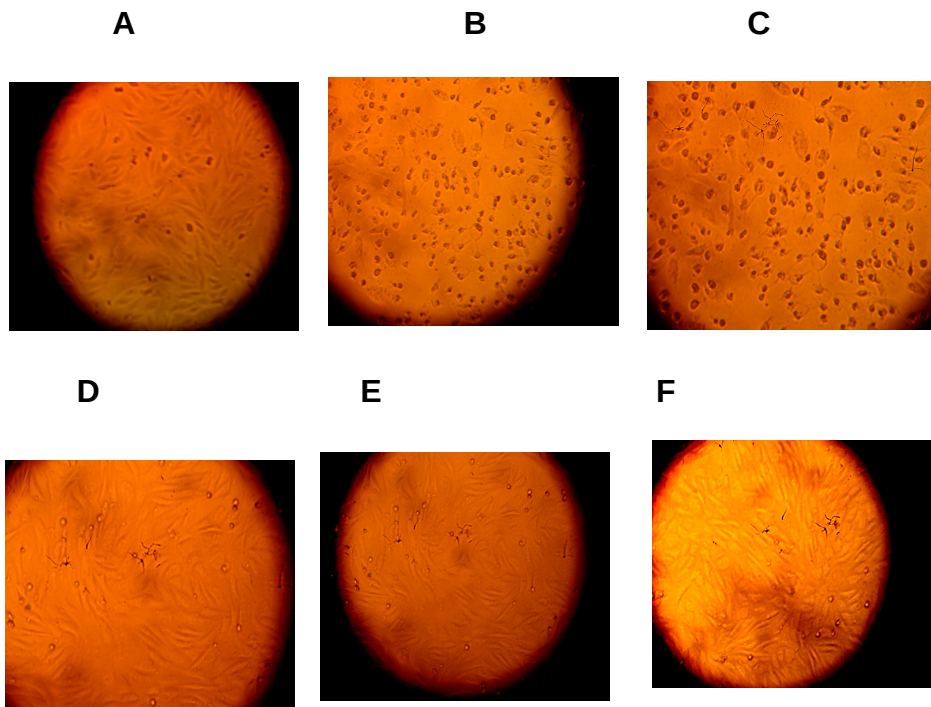


Figura 9 - Alteração na morfologia celular de fibroblastos bovinos após 24h de incubação com extratos vegetais. Controle negativo (A); *Lippia salvifolia* nas concentrações de 160 (B), 80(C), 40(D), 20(E) e 10mg/ mL (F).

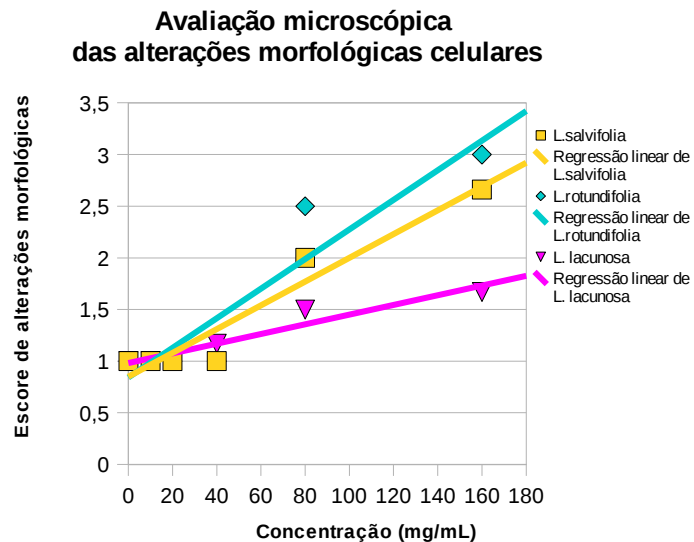


Figura 10 - Alterações morfológicas de fibroblastos bovinos após a incubação com os extratos de *Lippia salvifolia* (linha amarela), *Lippia lacunosa* (linha rosa) e *Lippia rotundifolia* (linha verde). Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

A mastite bovina representa o maior problema econômico relacionado à saúde animal. O tratamento com antibióticos tem sido o método mais usado para o controle e cura da doença. No entanto, há várias desvantagens clínicas e econômicas inerentes ao uso de antibióticos comerciais em vacas em lactação como, a rápida diluição do agente antimicrobiano, a necessidade de descarte do leite e a possível presença de resíduos desses antibióticos no alimento disponibilizado para consumo (BERGHASH et al.,1983).

A baixa qualidade do leite produzido no país provém, na maioria das vezes, de rebanhos com vacas com índices representativos de mastite. Além da baixa qualidade de matéria-prima, ocorrem prejuízos com o descarte das vacas e o custo de sua reposição, com a perda de material genético, com gastos com laboratório, medicamentos e assistência veterinária, com a redução na produtividade dos rebanhos, e com os problemas relacionados à saúde pública (ZADOKS, 2004). Diante disso, o controle da mastite deve tornar-se uma rotina indispensável em qualquer sistema de exploração leiteiro.

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Os produtos encontrados na natureza revelam uma grande diversidade em termos de estruturas e propriedades físico-químicas e biológicas (WALL e WANI, 1996). Os enfoques dados pelo movimento da agroecologia, buscando a sustentabilidade da produção agropecuária e baseados na necessidade de gerar um conhecimento contextualizador, subjetivo e pluralista, nascido das culturas locais, reforçam a necessidade de trabalhos acadêmicos buscando resgatar e estabelecer bases científicas para os saberes populares (SCHUCH, 2007). Contudo, é importante destacar que a utilização de plantas medicinais em sistemas de produção animal precisa ser feita com critério e atenção à biodisponibilidade de matéria-prima e ao risco de extinção dessas plantas por uso predatório. Devem ser aplicadas estratégias para manejo de reservas espontâneas de plantas ou a sua domesticação para uso medicinal (REIS et al., 2003).

5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta amazônica e a mata atlântica têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistosomose, leishmaniose, malária e infecções tanto fúngicas como bacterianas (ALVES et al., 2000).

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas são reconhecidas empiricamente há séculos (JANSEN, SCHEFFER e BAERHEIM, 1987). Estudos sobre essa atividade antimicrobiana de plantas nativas têm sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (MARTÍNEZ et al., 1996; NAVARRO et al., 1996; MAHASNEH, ADEL e EL-OQLAH, 1999; AHMAD e BEG, 2001; DUARTE et al., 2005).

A detecção da atividade antimicrobiana das plantas medicinais é realizada através da exposição dos microrganismos aos extratos da planta a ser testada. Existem muitos métodos descritos com esse objetivo, porém os mais citados são os métodos de difusão e de diluição (RIOS, RECIO e VILLAR, 1988). Utilizamos neste trabalho o método de diluição, que segundo esses autores, são os mais simples, apresentam boa reprodutibilidade, permitem o teste com extratos pouco solúveis em solventes aquosos e não dependem da capacidade de difusão do princípio ativo no meio de cultura.

Há descrito um número significativo de famílias e espécies de plantas estudadas até o momento. Entretanto, se levarmos em conta a existência das cerca de 300.000 espécies de plantas conhecidas, muito trabalho ainda tem de ser feito. Ainda, para a maioria das plantas, somente uma das partes, como folha, raiz ou caule, ou somente um tipo de preparação como óleo essencial ou extrato foram estudados. A atividade antimicrobiana tem sido atribuída a pequenos terpenóides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol e mentol, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica (SMID, KOEKEN e GORRIS, 1996; HELLANDER et al. 1998). Há uma suspeita do mecanismo de ação antimicrobiana desses compostos estar associado ao seu caráter lipofílico, havendo, portanto, seu acú-

mulo em membranas lipídicas e, conseqüentemente, perda de energia pelas células (CONNER, 1993; SIKKEMA, DE BONT e POOLMAN, 1995).

5.1.2 *Pterodon ermaginatus* Vogel

No trabalho realizado por Dutra (2008), o óleo essencial obtido das sementes de *Pterodon ermaginatus* apresentou atividade bactericida contra *S. aureus*, mas não apresentou atividade contra *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Rizzini (1978) verificou que o óleo extraído de sucupira detém apreciáveis propriedades contra a esquistossomose, impedindo a penetração das cercárias na pele dos mamíferos. Em outro experimento, realizado por Carvalho et al. (1999) também utilizando extrato de sucupira, controlaram-se inflamações do peritônio (edema), em ratos e outros animais. Ademais, esta espécie já vem sendo aproveitada na medicina popular há alguns anos, pois os frutos fervidos são usados em gargarejos para o alívio das dores de garganta (BRANDÃO et al. 2002). Silva et al. (2005) utilizaram o óleo de sucupira contra fitobactérias e obtiveram como resultado uma atividade antimicrobiana bactericida revelando a espécie também como um agente promissor no combate às doenças em plantas.

Das frações da planta testadas neste trabalho, aquelas com ação antibacteriana foram as etanólica e hexânica. A fração etanólica apresentou atividade bacteriostática contra *S. aureus* (CIM = 2,5 mg/mL), *S. agalactiae* (CIM = 2,5 mg/mL) e *S. bovis* (CIM = 10 mg/mL) e atividade bactericida contra *S. uberis* (CIM = 5,00 mg/mL). A fração hexânica apresentou atividade bacteriostática contra *S. agalactiae* (CIM = 1,25 mg/mL), *S. dysgalactiae* (CIM = 0,625 mg/mL) e *Klebsiela pneumoniae* (CIM = 5mg/mL) e bactericida contra *S. uberis* (CIM = 1,25 mg/mL) e *S. bovis* (CIM = 1,25 mg/mL) (Tabela 1). *S. uberis* foi o microrganismo que apresentou maior sensibilidade frente as frações bactericidas. Tais resultados também se mostram interessantes ao compará-los com o antibiótico padrão utilizado, gentamicina (Tabela 1). Para *S. bovis*, enquanto a gentamicina não apresentou nenhum efeito de inibição microbiana, a fração hexânica apresentou ação bactericida e a etanólica, ação bacteriostática. De modo semelhante, para *S. dysgalactiae*, a gentamicina não demonstrou atividade biológica, em contrapartida, a fração hexânica foi bacteriostática.

Aligianis et al. (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como: forte inibição - CIM até 500 µg/mL; inibição moderada – CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - CIM acima de 1600 µg/mL. Seguindo esta classificação, a fração hexânica demonstrou um maior potencial de ação quando comparada à fração etanólica. Apresentou uma inibição moderada para *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* e *S. bovis*. Possivelmente, a melhor atividade da fração hexânica pode ser atribuída à sua constituição química. Segundo Dutra (2008), os principais constituintes encontrados na fração hexânica de *Pterodon ermaginatus* Vogel foram flavonóides, leucoantocianidinas, taninos e cumarinas.

Teixeira (2006) detectou atividade biológica dos extratos etanólico e hexânico de sucupira branca em *Aedes aegypti*, onde também se verificou uma maior atividade repelente dos extratos apolares. No extrato hexânico dos frutos de sucupira branca, obtido por extração em aparelho de Soxhlet, foi observada a presença dos diterpenos furânicos, bem como outros terpenos e esteróides. Utilizando cromatografia com fase gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massa foram caracterizados ácidos graxos em pequena quantidade, sesquiterpenos (cariofileno, cariofileno, mirceno, pineno) e diterpenos tricíclicos furânicos.

Sabe-se que dependendo da polaridade do solvente utilizado na extração, diferentes constituintes químicos são obtidos das plantas, resultando na detecção de diferentes atividades biológicas. Tais constituintes químicos, provenientes da atividade metabólica secundária dos vegetais superiores, podem atuar como substâncias antibióticas utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por microorganismos, insetos e herbívoros (GOTLIEB, 1981). Terpenóides e óleos essenciais (POZZATTI et al., 2006; DUARTE et al., 2007), alcalóides (MOREL et al., 2005), lecitinas e polipeptídeos (TERRAS et al., 1993; ZHANG, LEWIS e FABATINS, 1997), substâncias fenólicas, como fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides, taninos e cumarinas, são os principais grupos de compostos extraídos de plantas com propriedades antimicrobianas relatadas.

Weiduo et al. (2006) relacionaram a atividade dos polifenóis do chá verde, particularmente, epigallocatequina galato, na diminuição da resistência a antibióticos

por *S. aureus*, sugerindo que esses compostos podem atuar como métodos alternativos para o controle da mastite bovina.

Na literatura pesquisada, não foi encontrado nenhum trabalho relacionando a atividade antimicrobiana das frações hexânica e etanólica oriundas do extrato bruto de *Pterodon ermagnatus* Vogel com os microrganismos objeto deste estudo, o que torna o dado obtido inédito, amplia as informações científicas para esta espécie e instiga novas pesquisas tanto para a descoberta dos constituintes responsáveis por esta ação como para seus possíveis efeitos citotóxicos.

5.1.3 GÊNERO *LIPPIA*

A pesquisa de novas drogas a partir de recursos naturais, especialmente a partir de plantas, vem ganhando importância nas últimas décadas (KAGEYAMA, 1987). Em meio a tal diversidade no Brasil, a família *Verbenaceae* se faz representativa ao incluir 22 gêneros e 296 espécies que possuem importantes propriedades medicinais, destacando-se entre eles, *Stachytarpheta*, *Lantana* e, principalmente, *Lippia* (SALIMENA e GIULIETI, 1998).

Pesquisadores do núcleo de Ciências agrárias (NCA) da UFMG estão testando em laboratório a atividade antimicrobiana de plantas medicinais do cerrado contra microrganismos causadores de mastite. O estudo foi motivado devido à alta incidência de mastite em ovinos no norte de Minas e a sua alta resistência aos antibióticos convencionais.

Os estudos químicos relacionados ao gênero *Lippia* são mais relacionados com os componentes do óleo essencial, existindo poucos estudos para a identificação de componentes não voláteis (CATALAN e LAMPASONA, 2002). As espécies *Lippia lacunosa* e *Lippia rotundifolia* tem sido consideradas sinônimos em muitos herbários (SOUSA, 2008). No entanto, já existem estudos evidenciando diferenças entre as espécies.

Pinheiro et al. (2004) prepararam extratos etanólicos de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* e posterior partição destes utilizando solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) para a detecção de componentes químicos por comparação através de cromatografia em camada fina (CCF). Através deste método, obtiveram diferenças sutis na composição química entre as duas

espécies. Leitão et al. (2008) confirmaram o exposto acima, ressaltando que as duas espécies apresentam diferenças marcantes na composição de seus óleos essenciais. A descrição olfativa dos constituintes voláteis dessas duas espécies, floral para *L. rotundifolia* e aroma de manga para *L. lacunosa*, contribuem para auxiliar na diferenciação dessas espécies e posterior classificação botânica.

Quanto à atividade biológica, Leitão et al. (2006) demonstraram um efeito antimicobacteriano acentuado das frações hexano e diclorometano de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* contra o *Mycobacterium tuberculosis*.

Os trabalhos envolvendo o gênero *Lippia* descrevem atividades principalmente para *Lippia sidoides* e *Lippia alba*, as duas espécies mais relatadas na literatura científica. Oliveira et al (2006) buscaram avaliar a efetividade do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham na inibição do crescimento de linhagens de *S. aureus* isoladas de material clínico humano. Os resultados apresentaram destacada efetividade na inibição da viabilidade do microrganismo em caldo, durante 24 horas de interação com o extrato, apresentando efeito bacteriostático com CIM de 0,4 µL/mL. No presente estudo, foi detectado um efeito bacteriostático dos peptídeos de *Lippia lacunosa* contra *S. aureus* na concentração de 80 µg/mL.

Preparados a base de *Lippia alba* também são utilizados na medicina popular para o tratamento de diversos males; entre eles encontram-se distúrbios estomacais como cólicas, indigestão, dores, náuseas e espasmos (GAZOLA et al. 2004; BRAGA et al. 2005). Esta espécie também é utilizada nos casos de tosse (SCARPA, 2004; BRAGA et al. 2005), resfriado (STASI et al., 2002; BRAGA, et al., 2005), como tranqüilizante ou calmante (GAZOLA et al. 2004), no combate à hipertensão (STASI et al. 2002; GAZOLA et al., 2004), como sedativo (STASI et al., 2002), analgésico (VALE et al., 1999) bem como nos casos de distúrbios hepáticos, gripe, bronquite, sífilis, diarreia, disenteria, como carminativo (BRAGA et al., 2005), no tratamento de dores de cabeça (DUARTE et al., 2005) e malária (VIGNERON et al., 2005).

Em relação à atividade antimicrobiana, o óleo essencial de *L. alba* causou inibição moderada no crescimento de *Candida albicans* (CIM = 0,6 mg/L). No entanto, o extrato etanólico mostrou-se inativo. A análise química dos componentes do óleo evidenciou o linalol (76,30%) como componente majoritário (DUARTE et al. 2005). Em contrapartida, os extratos hidroalcoólicos obtidos por maceração apresentaram

atividade antimicrobiana moderada contra *C. krusei* (125 µg/mL) e fraca contra *C. parapsilosis* (1000 µg/mL), utilizando-se o método de microdiluição em caldo (HOLETZ et al. 2002). No caso da atividade antibacteriana, os extratos aquoso e metanólico apresentaram baixas porcentagens de inibição do crescimento bacteriano, na concentração de 8 mg/mL, contra alguns dos microrganismos testados (*Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* e *Salmonella* sp.) No entanto, esta porcentagem de inibição foi maior do que aquela demonstrada pelo cloranfenicol (ALANIS et al. 2005).

Neste trabalho, foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato protéico obtido de folhas e flores de *L. salvifolia*, *L. rotundifolia* e *L. lacunosa*. O interesse por essas substâncias surgiu a partir de vários relatos na literatura, identificando os peptídeos catiônicos como um dos principais mecanismos de defesa antibacteriana das superfícies mucosas do homem (LEE et al., 1989; MOORE et al., 1996; HANCOCK, 1997; HANCOCK e CHAPPLE, 1999). Devido a esse potencial antimicrobiano, os peptídeos podem vir a constituir potenciais agentes terapêuticos no tratamento das mais diversas infecções (LEE et al., 1989, LEHRER et al., 1989).

Os resultados obtidos demonstraram atividade bacteriostática para o extrato bruto protéico de *Lippia lacunosa* e *Lippia salvifolia* contra *S. aureus* e *S. agalactiae* na concentração de 80 µg/mL, respectivamente. *Lippia rotundifolia* apresentou a menor concentração inibitória mínima, de 10 µg/mL contra *S. uberis*.

Um aspecto importante a ser ressaltado na avaliação farmacológica dos extratos de *Lippia* foi a especificidade encontrada nestas espécies para os microrganismos testados, de forma que cada extrato demonstrou atividade antimicrobiana para apenas uma dentre as seis bactérias testadas.

Outra perspectiva para a utilização desses peptídeos com atividade antimicrobiana seria sua introdução em plantas, através do conhecimento do gene que controla sua atividade. Estes genes poderiam ser inseridos em plantas (de valor econômico agregado) resultando em organismos transgênicos e dotados de características defensivas contra predadores, como microrganismos patogênicos, insetos e animais herbívoros.

De modo semelhante ao resultado dos estudos com *P. ermaginatus*, os dados de atividade antimicrobiana obtidos de *Lippia* são inéditos, considerando ainda o fato das bactérias utilizadas no ensaio constituírem-se em microrganismos retirados de

animais com mastite e resistentes a uma grande variedade de antibióticos utilizados nos tratamentos convencionais.

5.2 CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade foi definida por Nardone (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular, que leva a uma série de modificações, que interferem na capacidade adaptativa das células, na sua sobrevivência, reprodução e realização de suas funções metabólicas.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a habilidade intrínseca de um composto em causar alterações e morte celular, como consequência de dano das funções celulares básicas. Esses testes são necessários para definir o limite de concentração para testes *in vivo* posteriores e mais detalhados, e também para fornecer informações significativas sobre outros parâmetros a serem pesquisados, como a genotoxicidade (EISENBRAND et al., 2002). O estudo de qualquer atividade biológica em cultura celular tem como vantagem, entre muitas outras, a homogeneidade das amostras (SOKAL; ROHLF, 1995).

Segundo Freshney (1990), o estudo *in vitro* utilizando culturas de células tem se mostrado preferencial devido à homogeneidade das amostras e à facilidade de padronização, pois é possível o controle de fatores tais como: pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de O₂ e CO₂. Porém, algumas desvantagens podem ser consideradas para este método em estudo, dentre elas, a necessidade de se trabalhar em ambiente asséptico e estéril, o que exige certa prática por parte do pesquisador, e o fato do custo de um experimento feito com cultura de células ser muito maior do que o mesmo feito em animais.

As células retiradas de tecidos são chamadas de primárias, e normalmente, passam por 50 ciclos celulares com as respectivas divisões mitóticas, sendo então chamadas de células normais (VIDAL, 2007). Neste trabalho, foram utilizadas células na 6ª passagem, pois segundo Freshney (1999), linhagens celulares com poucas passagens são instáveis e necessitam de um período de adaptação em culturas. Baseando-se no mesmo princípio, Almeida-Lopes (1999) utilizou fibroblastos humanos na 6ª passagem em seus experimentos com o uso de laser.

Os fibroblastos foram o modelo celular escolhido, pois são células encontradas em alta predominância no tecido conjuntivo, e uma das utilizações previstas para esses extratos é o seu emprego em formulações tópicas para a glândula mamária, que possam ser auxiliares no tratamento de mastites. Outra alternativa prevista é sua aplicação como desinfetantes na assepsia do teto do animal e mãos de ordenhadores.

Os ensaios mais freqüentemente usados para avaliar citotoxicidade baseiam-se na alteração da permeabilidade celular (ex. uso de corantes vitais, tais como azul de Trypan), nas funções mitocondriais (ex. ensaio do MTT), na morfologia celular e na proliferação celular (WILSON, 2000; EISENBRAND et al., 2002). Em relação à potencial subjetividade, causadora de erros, todos os métodos baseados na inspeção visual consomem tempo e são trabalhosos, e portanto, são inapropriados para pesquisas em grande escala (GUTLEB, MORRISON e MURK, 2002).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a habilidade intrínseca de um composto em causar alterações e morte celular, como consequência de dano das funções celulares básicas. Esses testes são necessários para definir o limite de concentração para testes *in vivo* posteriores e mais detalhados, e também para fornecer informações significativas sobre outros parâmetros a serem pesquisados, como a genotoxicidade (EISENBRAND et al., 2002).

5.2.1 *Pterodon ermaginatus* Vogel

Segundo Da Luz Dias (1995), há poucos estudos referentes à citotoxicidade do óleo obtido das sementes de sucupira. Estudos preliminares, *in vivo*, demonstraram ausência de clastogenicidade do óleo das sementes em células de mamíferos. Apesar destes resultados, estudos toxicológicos envolvendo a determinação da CC₅₀ podem identificar alguma restrição ao uso destas plantas.

Dutra (2008) ao avaliar a citotoxicidade, *in vitro*, do óleo essencial de *P. ermaginatus*, em fibroblastos normais de rim de hamster, não encontrou diferença de atividade entre células tumorais e células normais, evidenciando a necessidade de mais estudos toxicológicos envolvendo esta espécie vegetal.

No presente trabalho não foi realizada avaliação de citotoxicidade das frações das sementes de sucupira. O foco do trabalho voltou-se mais às espécies de *Lippia*, devido principalmente, à baixa concentração inibitória encontrada (na ordem de μ g/mL) e à possibilidade de correlação entre os peptídeos presentes no extrato com a atividade antimicrobiana e aos escassos relatos de atividade farmacológica dessas espécies descritos na literatura.

5.2.2 O GÊNERO *LIPPIA*

Optou-se por estudar a citotoxicidade das espécies do gênero *Lippia*, pois nestas, sabe-se que a ação bacteriostática demonstrada está relacionada ao extrato bruto protéico, o que propicia, de maneira mais facilitada, o estabelecimento do binômio constituinte/atividade farmacológica.

Não foram encontrados na literatura, pesquisas evidenciando a citotoxicidade dos extratos avaliados neste estudo. De todas as espécies, *Lippia salvifolia* foi a única que apresentou um valor de CC_{50} (μ g/mL) para os dois testes de citotoxicidade, avaliação morfológica e viabilidade celular, ambos apresentando valores semelhantes (Tabela 2). No entanto, cabe salientar, que esse valor de citotoxicidade para *L. salvifolia* não inviabilizaria seu uso como antimicrobiano pois sua concentração inibitória mínima é inferior à dose tóxica.

No teste de avaliação microscópica de alterações morfológicas celulares, *Lippia rotundifolia* apresentou uma concentração citotóxica muito maior do que sua concentração inibitória sobre *S. uberis*, portanto, esse dado também não exclui a possibilidade de seu uso como antimicrobiano.

Através da análise das figuras 8 e 10, pode-se observar que a concentração dos extratos foi inversamente proporcional à porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (teste do azul de *Trypan*) e diretamente proporcional ao *escore* de alterações morfológicas, confirmando os resultados esperados. Assim, os três extratos brutos de *Lippia* demonstraram citotoxicidade dose-dependente. *Lippia lacunosa* e *Lippia rotundifolia* não apresentaram redução significativa no número de células em relação ao controle e mesmo na maior concentração testada, não chegaram a promover redução em 50% do número de células. Os dados de

citotoxicidade obtidos para *Lippia salvifolia* são superiores aqueles referentes à atividade antimicrobiana, o que significa que a dose responsável pela atividade terapêutica é inferior à dose tóxica, demonstrando boas perspectivas para seu uso no campo farmacêutico.

Além do já exposto, outras considerações podem ser abordadas a partir desse estudo como a resistência microbiana, a presença de resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal e às demais finalidades de utilização desses extratos, como por exemplo, na formulação de produtos antissépticos para uso geral.

A resistência de patógenos humanos e animais às drogas é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (DUARTE, 2006). A resistência bacteriana emergiu pouco após a introdução dos antibióticos nos anos 1930 e 1940 (VIRK e STECKELBERG, 2000). Em meados de 1940, dois anos apenas após a introdução da penicilina no mercado, os cientistas observaram a emergência de uma estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina (WHO, 2000; WALSH, 2000).

No passado, a fitoterapia era mais adotada pela população carente da área rural ou urbana, devido à fácil disponibilidade e menores custos. Atualmente, o uso de plantas como uma fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde e está bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África (DUARTE, 2006), principalmente porque os microrganismos que causam prejuízos à saúde humana estão se mostrando resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda mais a procura por antibióticos de ocorrência natural.

Outro aspecto relevante a ser abordado na utilização dessas plantas está na preocupação mundial com a saúde e a busca crescente por alimentos livres de resíduos químicos e contaminações e que possam ser produzidos sem agredir o meio ambiente. Neste contexto, vale ressaltar que, a transformação da agricultura por conta da agroecologia está intimamente ligada à transformação da sociedade como um todo e não à uma simples substituição de insumos (MOREIRA e CARMO, 2004). Também é central o caráter sustentável desde o ponto de vista social, econômico, ecológico e cultural, das formas de produzir (NAVARRO, 1992).

Nos últimos anos, segundo Heinzmann e Barros (2007), a procura por drogas vegetais como recurso terapêutico tem aumentado. Entre os fatores que mo-

tivam esse aumento estão a insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos com a medicina convencional, os efeitos indesejáveis causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos, a falta de acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada, a consciência ecológica e a crença popular de que o natural é inofensivo .

Segundo dados de Rivera e Brugarolas (2003), entre 1997 e 2000, o mercado orgânico cresceu 87% especialmente, nos países industrializados e mais conscientizados.

Campos (2004) estudou amostras de leite oriundas de produção orgânica e comparou com amostras de leite produzidas de forma convencional em uma região de São Paulo. A autora concluiu que as amostras de leite oriundas de produção orgânica apresentavam menor contaminação com antibióticos β -lactâmicos, com um resultado negativo nas amostras de produção orgânica e com 6,67% de positividade naquelas produzidas convencionalmente. As plantas avaliadas neste trabalho podem constituir-se em uma nova opção viável para o tratamento de mastite nesse sistema de produção.

Outra possibilidade de utilização desses extratos vegetais, segundo Nascimento et al. (2000) é sua aplicação concomitante com antibióticos convencionais, devido a um possível efeito sinérgico. Tal achado pode vir a constituir uma nova opção de tratamento para as doenças infecciosas, principalmente quando permite o uso do antimicrobiano quando ele já não possui atividade, se usado em regime de monoterapia. O autor revela em seu estudo que os extratos isolados de *Syzygium cumini* e *Thymus vulgaris* inibiram o crescimento microbiano na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, entretanto, um efeito sinérgico foi observado quando 10 $\mu\text{g/mL}$ desses extratos foram combinados com cada um dos antibióticos testados (cloranfenicol, ampicilina e tetraciclina – 500 mg/mL). Esses resultados revelam mais esse campo de atuação para as plantas, visto que nesses casos, os extratos são ativos em baixas concentrações inibitórias, o que minimiza a possibilidade de efeitos tóxicos.

Simões e Schenkel (2002) enfatizaram a necessidade da interação entre a indústria com a academia, enquanto Maciel et al. (2002) ressaltaram a importância dos estudos multidisciplinares com plantas medicinais, envolvendo a etnobotânica, a química e a farmacologia. Segundo os últimos autores, a integração entre as diferentes áreas na pesquisa de plan-

tas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para a descoberta de novos medicamentos.

Segundo dados de 2007 (HEINZMANN e BARROS, 2007), o crescimento do mercado de medicamentos fitoterápicos é da ordem de 15% ao ano, enquanto o crescimento anual do mercado de medicamentos sintéticos gira em torno de 4%. Este crescimento, também observado em outros países, pode gerar divisas para o Brasil desde que a produção de fitomedicamentos atenda os quesitos de qualidade, eficácia e segurança. O decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, fortalece e amplia as ações políticas voltadas ao setor, constituindo-se num marco regulatório histórico.

Em relação a mais uma de suas aplicabilidades, Avancini e Wiest (2008) apontam para o desenvolvimento de projetos para se verificar se extrações de espécies vegetais utilizadas em sistemas tradicionais/ populares de saúde possuem viabilidade de uso, cientificamente assegurada, ecológica, econômica e socialmente sustentáveis como desinfetante ou antisséptico para aplicação em saúde pública e animal, substituindo ou complementando os produtos convencionais.

Com esse objetivo, Farias, Santos e Such (2003) desenvolveram um trabalho piloto buscando a produção orgânica do leite bovino no qual foram observados o desempenho produtivo e a saúde dos animais por um período de dois anos. No primeiro ano, foi utilizado manejo convencional e no segundo introduziu-se o extrato cru obtido por decocto de plantas como desinfetante e extrato alcoólico de própolis para o tratamento dos casos de mastite. Foi possível observar uma redução da prevalência de mastite subclínica de 13,37% no primeiro ano para 7,43% no segundo ano. Da mesma forma, houve uma redução nos casos de mastite clínica. Foi concluído que adequando e aprimorando as práticas higiênico-sanitárias do rebanho é possível produzir leite com qualidade e baixa ocorrência de mastite sem o uso de antibióticos, substituindo os desinfetantes químicos comerciais por extratos de plantas e utilizando tratamentos naturais (própolis) para os casos clínicos.

Segundo Bessems (1998), no que se refere à utilização de extratos de plantas na assepsia dos tetos do animal, mãos de ordenhadores e equipamentos de ordenha, a aplicação do desinfetante ou anti-séptico também deve levar em consideração as condições ambientais onde ele será utilizado. Se, por exemplo, em condições de ambiente limpo ou sujo, se para saúde animal ou na indústria de alimentos.

Todas essas questões conduzem ao entendimento de que pesquisas voltadas

para o estudo e avaliação de produtos naturais como terapêuticos e, principalmente, com atividade antimicrobiana, devem ser estimuladas no intuito de se criar novas drogas ou adaptar as já existentes para que voltem a ter atividade. Logo, esses estudos de atividade antimicrobiana e citotoxicidade dos extratos e frações vegetais obtidos de *P. ermagnatus*, *L. lacunosa*, *L. salvifolia* e *L. rotundifolia*, poderão contribuir como testes preliminares para a obtenção de uma via alternativa de tratamento para mastite (com redução de efeitos colaterais e resíduos de antibióticos no leite) e demais infecções causadas por estes patógenos, e para formulação de produtos antissépticos utilizados também em laboratórios.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram o potencial farmacológico dos extratos de *Pterodon ermagnatus* Vogel, *Lippia lacunosa*, *Lippia rotundifolia* e *Lippia salvifolia* como prováveis agentes antimicrobianos.

Das frações de *P. ermagnatus* testadas, aquelas com atividade foram a hexânica (FH) e a etanólica (FE). A FH foi bacteriostática para *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *Klebsiela pneumoniae* e bactericida para *S. uberis* e *S. bovis*. A FE foi bacteriostática para *S. aureus*, *S. agalactiae* e *S. bovis* e bactericida para *S. uberis*.

As espécies *Lippia lacunosa*, *Lippia salvifolia* e *Lippia rotundifolia* apresentaram somente atividade bacteriostática contra os microrganismos *S. aureus*, *S. agalactiae* e *S. uberis*, respectivamente. O teste de viabilidade celular demonstrou que os extratos obtidos de *Lippia lacunosa* e *Lippia rotundifolia* não foram tóxicos quando comparados ao controle, enquanto que a análise descritiva da morfologia das células revelou que concentrações igual e superiores a 80 µg/mL já promovem alterações no formato das células para as três espécies de *Lippia* (extrato aquoso).

A análise conjunta dos dados deste estudo fornece base científica para pesquisas posteriores utilizando esses extratos vegetais como auxiliares no tratamento de mastite bovina, seja como antimicrobianos usados em casos clínicos, seja na formulação de antissépticos para os tetos do animal e mãos de ordenhadores.

Apesar de ainda haver questões importantes que aguardam análises mais profundas (análise *in vivo*), este estudo amplia o conhecimento científico sobre *L. lacunosa*, *L. rotundifolia* e *L. salvifolia* e contribui para a possibilidade de sua utilização como fonte natural para obtenção de protótipos e moléculas com atividade biológica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAINEH, D.; SINTAYEHU, A. 2001. Treatment trial of subclinical mastitis with the herb *Persicaria senegalense* (*Polygonaceae*). **Tropical Animal Healthy and Production**, **33(6)**: 511-519.

AHMAD, I.; BEG, A.Z. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, **74**: 113-123.

ALANIS, A.D.; CALZADA, F.; CERVANTES, J.A.; TORRES, J.; CEBALLOS, G.M. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, **100**: 153-157.

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **49**: 4168-4170.

ALMEIDA, K.T.; FREITAS, F.L.; PEREIRA T. F. C. 2006. Etnoveterinária: A fitoterapia na visão do profissional veterinário. **Revista Verde**, **1 (1)**: 67-74.

ALMEIDA-LOPES, L. 1999. **Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

ALMEIDA, L.A.B. 2000. Normatização e certificação de produtos orgânicos, leite e derivados. In: BRESSAN, M.; MARTINS, C.E.; VILELA, D. **Sustentabilidade da Pecuária de leite no Brasil**: 165-174.

ALMEIDA, L.A.B. 2001. Curso Introdutório sobre homeopatia. In: Seminário Brasileiro sobre Homeopatia na Agropecuária Orgânica-Espírito Santo do Pinhal. **Anais**. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 197 p.

ALTIERI, M. 1987. **Agroecology. The scientific basis of alternative agriculture**, 210 p.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO M.; GRANDI, T.S. M.; SMÂNIA, E.F.;

SMÂNIA, J.A.; ZANI, C.L. 2000. **Biological screening of Brazilian medicinal plants**, **95**: 367-373.

AMOROSO, M.C.M. 2002. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botânica**: 189-203.

ASSOCIAÇÃO DA AGRICULTURA ORGÂNICA. 2004. **Normas de produção orgânica**. AAO. 3ª Atualização. São Paulo. 21p.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. 2008. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Schlecht. –Guttiferae (“escadinha/sinapismo”), frente diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, **10 (1)**: 64-69.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; MUNDSTOCK, E. 2000. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C. - Compositae, carqueja, como desinfetante ou antiséptico. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, **52 (3)**: 230-234.

BAQUERO F. A.; BLÁZQUEZ J. 1997. Evolution of antibiotic resistance. **Tree**, **12**: 482-487.

BARILE, F.A. 1994. Mechanisms of cytotoxicology: Introduction to in vitro cytotoxicology mechanisms of cytotoxicology. **Mechanisms and methods (2)**: 27-45.

BARLOW, J. 2001. Organic dairies - mastitis and milk quality challenges. In: **National Mastitis Council Annual Meeting, 40. Reno, Proceedings... Reno National Mastitis Council Annual Meeting**: 143-151.

BARRAGY, T.B. 1994. Bovine mastitis. In: **Veterinary Drug therapy**. New York: Lea e Febiger : 655-687.

BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; COSTA, E.O. 2001. Modificação da técnica de contagem de células somáticas de Prescott & Breed utilizando-se a coloração hematoxilina e eosina. **Napgama**, **4 (3)**: 6-9.

BERGHASH, S.R.; DAVIDSON, J.N.; ARMSTRONG, J.C.; DUNNY, G.M. 1983. Effects of antibiotic treatment of nonlactating dairy cows on antibiotic resistance patterns of bovine mastitis pathogens. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, **24 (5)**: 771-776.

BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L.L.; MENEZES, E.A.; MORAIS, S.M.; CUNHA, F.A.; CAVALCANTI, E.S.B. 2005. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, **17** (3/4).

BESSEMS, E. 1998. The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, **41**: 177-83.

BEVINS, C.L.; ZASLOFF, M. 1990. Peptides from frog skin. **Annual Review of Biochemistry**, **59**: 395-414.

BIESENKAMP-UHE, C.; LI, Y.; HEHNEN, H.R.; SACHS, E.K.; KALTENBOECK, B. 2007. Therapeutic *Chlamydophila abortus* and *C. pecorum* Vaccination Transiently Reduces Bovine Mastitis Associated with *Chlamydophila* Infection. **Infection and Immunity**, **75** (2): 870-877.

BIZIMANA, N. 1997. Scientific evidence of efficacy of medicinal plants for animal treatment: Proceedings of an International Conference. **Ethnoveterinary medicine**, **2**: 4-6.

BRABES, K.C.S.; CARVALHO, E.P.; DIONÍSIO, F.L.; PEREIRA, M.L. GARINO, JR., F.; COSTA, E.O. 1999. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Napgama**, **2** (3): 4-11.

BRADFORD, M. M.1976. **Analytical Biochemistry**, **72**, 248 p.

BRAGA, M.E.M.; EHLERT, A.D.; MING, L.C.; MEIRELES, M.A.A. 2005. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, **34**: 149-56.

BRAMLEY, A.J. 1992. Sources of *Streptococcus uberis* in the dairy herd I: isolation from bovine feces and from straw bedding of cattle. **Journal of Dairy Research**, **49**: 369-381.

BRAMLEY, A.J.; CULLOR, J.S.; ERSKINE, R.J.; FOX, L.K.; HARMON, R.J.; HOGAN, J.S.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; SMITH, K.L.; SORDILLO, L.M. **1996**. Current concepts of bovine mastitis. **The Nacional Mastitis Council**, **4^a ed.**

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

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDIA, J.P.; MACEDO, J.F. 2002. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Epamig, 63p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 7 de 17 de Maio de 1999. Dispõe sobre normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 de maio de 1999. Seção 94, p. 11.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. Dispõe sobre a proibição de fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham esses princípios ativos, para uso veterinário e susceptível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 junho, seção 1: 1-2.

BRASIL. Presidência da República, Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006 - aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, nº 199, seção 1.

BROGDEN, K.A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, **3**: 238-250.

CAMPOS, E.P. 2004. **Qualidade microbiológica, físico-química e pesquisa de resíduos de antibióticos e pesticidas no leite produzido pelo sistema convencional e pelo sistema orgânico**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista- UNESP, 58p.

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

CARVALHO, J.C.T.; SERTIE, J.A.A.; BARBOSA, M.V.J.; PATRÍCIO, K.C.M.; CAPUTO, L.R.G.; SARTI, S.J.; FERREIA, L.P.; BASTOS, J.K. 1999. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology**, **64**: 127-133.

CASTRO, M.S.; FONTES, W. 2005. Plant defense and antimicrobial peptides. **Protein and Peptide Letters**, **12**: 11-16.

CATALAN, C.A.N; LAMPASONA, M.E. 2002. **The chemistry of the genus *Lippia* (Verbenaceae)** In: Kintzios, S.E. (Ed.), *The genera *Origanum* and *Lippia**, 25: 127-149.

CLEMEDSON, C.; BARILE, F.A.; CHESNE, C.; COTTIN, M.; CURREN, R.; ECKWALL, B.; FERRO, M.; GOMEZ-LECHON, M.J.; IMAI, K.; JANUS, J., KEMP R.B.; KERSZMAN, G.; KJELLSTRAND, P.; LAVRIJSEN, K.; LOGEMANN, P.; MCFARLANE-ABDULLA, E.; ROGUET, R.; SEGNER, H.; THUVANDER, A.; WALUM, E.; EKWALL, B. 2000. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part VII. Prediction of human toxicity by results from testing of the first 30 reference chemicals with 27 further in vitro assays. **ATLA**, **28**: 159–200.

COELHO, M.G.C.; MARQUES P.R.; GAYER, C.R.M.; VAZ, L.C.A.; NETO, J.F.N.; SABINO, K.C.C. 2001. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, **77**: 159–164.

COELHO, V.R.P. 2003. **Avaliação de resíduos antimicrobianos no leite de quartos mamários não tratados de vacas com mastite tratadas por via intramamária**. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga.

CONFERENCIA DE LAS NACIONES UNIDAS SOBRE COMERCIO Y DESARROLLO. 2000. Systems and nacional experiences for protecting tradicional knowledge, innovations and practices. **Background note by the UNCTAD Secretariat. Ginebra, Conferencia de las naciones unidas sobre comercio y desarrollo.**

CONNER D.E. 1993. Naturally occurring compounds. In: Davidson, P.M., Branem, A. L. **Antimicrobials and Foods**: 441-468.

COSTA, A.F. 2000. **Farmacognosia**. Fundação Calouste Gulbenkian.

COSTA, A.F. 1994. **Farmacognosia**. Fundação Calouste Gulbenkian. 1031 p.

COSTA, C.A.; HEBLING, J.; GARCIA, G.F.; HANKS, C.T. 2003. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. **Biomaterials**, **21**.

COSTA, E.O. 1991. Importância econômica da mastite bovina. **Comunicações científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, **15 (1)**: 21-26.

COSTA, E.O. 1998. Mastite: Mecanismo de infecção da glândula mamária. **Pardo-Suíço em Revista**.

COSTA, E.O. 2002. Uso de antimicrobianos na mastite. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan: 443-455.

COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; GUERRA, J.L., MELVILLE, P.A. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine**, **47**: 99-103.

COSTA, E.O.; MANGERONA, A.M.; BENITES, N.R. 1996. Avaliação de campo de quatro tratamentos intramamários de mastite clínica bovina. **A Hora Veterinária**, **93**: 19-21.

COWAN, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, **12**: 564-582.

CULLOR, J.S.; TYLER, J.W.; SMITH, B.P. 1994. Distúrbios da glândula mamária. **Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais**, **2**: 1041- 1060.

DA LUZ DIAS, F.; TAKAHASHI, C.S.; SAKAMOTO-HOJO, E.T.; VICHNEWSKI, W.; SARTI, S.J. 1995. Genotoxicity of the natural cercaricides 'Sucupira' oil and eremanthine in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, **26**: 338-344.

DANIEL, L.R.; CHEW, B.P.; TANAKA, T.S.; TJOELKER, L.W. 1991. *In vitro* effects of β -carotene and vitamin A on peripartum bovine peripheral blood mononuclear cell proliferation. **Journal of Dairy Science**, **74**: 911-915.

DAROLT, M.R. 2003. O papel do consumidor no mercado de produtos orgânicos. Planeta Orgânico. <http://www.planetaorganico.com.br/trabdarolt1.htm>. Consultado em 18/09/2007

DE MAAR, T. W. 1992. Qué contienen esas botellas? **CERES**, **136**: 40-45.

DIXON, R.A. 2001. Natural aspects and plants disease resistance. **Nature**, **411**: 843-847.

DOMINGO, D.; LÓPEZ, B.M.L. 2003. Plantas com acci3n antimicrobiana. **Revista Espan3la de Quimioterapia**, **16**: 385-393.

DUARTE, M.C.T. 2006. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e arom3ticas utilizadas no Brasil. **Construindo a hist3ria dos produtos naturais**, **7**.

DUARTE, M.C.T.; LEME, E.E; DELARMELINA, C; SOARES, A.A; FIGUERA, G.M. 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**: 197-201.

DUARTE M.C.T.; FIGUEIRA G.M.; SARTORATTO A.; REHDER V.L.G.; MACHADO A.L.M.; DELARMELINA, C. 2005. Anti-Candida activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, **97**: 305 - 311.

DUARTE, I. D. G.; ALVES, D. F. A.; VELOSO, D. P.; CRAIG, M. N. 1996. Evidence of the involvement of biogenic amines the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeiflorus* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, **55**: 13 -18.

DUTRA, R.C. 2008. **Avalia33es fitoqu3mica e farmacol3gica das sementes de *Pterodon ermaginatus* Vogel**. Disserta33o de mestrado. Instituto de Ci3ncias Biol3gicas. UFJF.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES; LHUGUENOT, S.J.; PIETERS, R.; KLEINER. 2002. Journal of Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, **40**: 193–236.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. 2004. Infec333es intramam3rias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implica333es em sa3de p3blica. **Ci3ncia Rural [online]**, **34 (4)**: 1315-1320.

FARIAS, N.A.R.; SANTOS, T.R.B.; SUCH, L.F.D. 2003. Relat3rio de Projeto de pesquisa "Implanta333o de novas tecnologias para a produ333o do leite ecol3gico." Processo n3 00/2648.5, FAPERGS, Porto alegre, RS.

FILHO, V.C. 2000. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: Estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, **23(5)**.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. 2000. **Qualidade do leite e controle de mastite: 39-41.**

FRESHNEY, R.I. 1990. **Biology of the cultured cell. A manual of basic technique.** 2^a ed. 347 p.

FRESHNEY, R. I. 1999. **Culture of Animal Cells. A Multimedia Guide.** Wiley-Liss. CD.

FRESHNEY, R.I. 2000. **Culture of animal cells: A manual of basic technique,** 4^a ed. 600 p.

FRICAIN, J.C.; ALOUF, J.; BAREILLE, R.; ROUAIS, F.; ROUVILLAIN, J.L. 2002. Cytocompatibility study of organic matrix extracted from Caribbean coral porites astroides. **Biomaterials**, **3**: 673- 679.

FRÖHNER, C.R.A. 2003. **Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum*.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina.

FUEYO, J.M.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R.; MUNIZ, J.; ALVAREZ, M.A.; MARTÍN, M.C. 2005. Cytotoxin and Pyrogenic Toxin Superantigen Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Associated with Subclinical Mastitis in Dairy Cows and Relationships with Macrorestriction Genomic Profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, **43 (3)**: 1278-1284.

GALDINO, M.; STAMATO, B.; TASSI, M.E., MOREIRA R.; PESTELI, M.; BERGAMO A.; PEREIRA, S. 2007. Incentive of utilizing Medicinal Plants from the Collective of Women from the Rural Settlement Pirituba II on Animal Production. **Revista Brasileira de Agroecologia**, **2 (2)**.

GAZOLA R.; MACHADO D.; RUGGIERO C.; SING, G.; ALEXANDRE M.M. 2004. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacological Research**, **50**: 477-80.

GIANNEECHINI R.E.; CONCHA C.; FRANKLIN A. 2000. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay. [Acta Veterinaria Scandinavica](#), **43**: 31-41.

GIRAUDO, J.A. 1996. Conceptos basicos sobre inmunologia de la glandulamamaria y utilización de vacunas contra mastitis. In: VERÍSSIMO, C. J.; AMARAL, J. B. **2º Encontro de pesquisadores em mastite bovina do Estado de São Paulo. São Paulo: Instituto de Zootecnia: 73-86.**

GOTLIEB, O. 1981. New and underutilized plants in the Américas: solution to problems of inventory through systematics. **Interciência, 6:** 22-9.

GRUNERT, E. 1993. Sistema genital feminino. In: Rosenberger, G. **Exame Clínico dos Bovinos.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 299-309.

GUTLEB, A.C.; MORRISON, E.; MURK, A.J. 2002. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology, 11:** 309-320.

HANCOCK, R.E.W.1997. Peptides antibiotics. **Lancet, 349:** 418–422.

HANCOCK R.; LEHRER R.I. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends Biotechnology, 16:** 82–88.

HANCOCK, R.E.W.; CHAPPLE, D.S. 1999. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43:** 1317–1323.

HEINZMANN, B.M; BARROS, F.M.C. 2007. Potential of Brazilian native plants for the development of phytomedicines having *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) as example. **Saúde, 33 (1):** 43-48.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POLI, SMID, E.J.; GORRIS, L.G. M. e VON WRIGHT A. 1998. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46:** 3590-3595.

Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; Joseph, H.; Bailleul, F. 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology 116:** 211–222

HILLERTON, J.E. 1996. Controle da mastite bovina. In: **Workshop Sobre Programa de Controle Integrado da Mastite Bovina. Anais, 6.**

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA,

C.V.; DIAS FILHO, B.P. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **97**: 1027-1031.

HORN, J.S. 1969. **Medicina Chinesa: A experiência para milhões**. 280 p.

HU, S.; CONCHA, C.; COORAY, R.; HOLMBERG, O. 1995. Ginseng enhanced oxidative and phagocytic activities of polymorphonuclear leucocytes from bovine peripheral blood and stripping milk. **Veterinary Research**, **26**: 155-161.

HU S.; CONCHA C.; LIN F.; PERSSON WALLER K. 2003. Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunization against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. **Veterinary Immunology Immunopathology** **91**: 29-37.

HURLEY, W.L.; MORIN, D.E. 2001. Factors affecting susceptibility to mastitis. **Lactation biology**. <http://www.classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/> .Consultado em 05/03/07.

INTERNACIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO) 10993-5. Biological evaluation of medical devices. 1999. Part 5: Tests for cytotoxicity: *In vitro* methods. International Organization for Standardization.

INSTITUTO BIODINÂMICO. 2004. **Diretrizes para o padrão de qualidade Orgânico**. Associação de certificação Biodinâmico, Botucatu, São Paulo, 88p.

INGHAM, A.B.; SPROAT, K.W.; TIZARD, M.L.V.; MOORE, R.J. 2005. A versatile system for the expression of nonmodified bacteriocins in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, **98 (3)**: 676- 683.

JANSEN A.M.; SCHEFFER J.J.C.; BAERHEIM S. A. 1987. Antimicrobial activity of essential oils from Greek Sideritis species, **Pharmazie**: 45 - 70.

KAGEYAMA, P.Y. 1987. Conservação *in situ* de recursos genéticos de plantas. **Revista do Instituto de Pesquisas Florestais**, **35**: 41-46.

KITCHEN, B.J. 1981. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, **48**: 167-188.

KLINK, C.A.; MACEDO, R.H.; MUELLER, E.C.C.; KLINK, C.A.; MACEDO, R.H. e

MULLER, C.C. 1985. De grão em grão o cerrado perde espaço, Cerrado Impactos no Processo de Ocupação. **WWF/PRO-CER (Documento para Discussão) Base de Dados Tropicais - BDT**, 66 p.

KOULAOUZIDOU, E.A.; PAPAISIS, K.T.; BELTES, P.; GEROMICHALOS, G.D.; KORTSARIS, A.H. 1998. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. **Endodontics & dental traumatology**, **4**: 182-185.

KURU, L; PARKAR, M.H.; GRIFFITHS, G.S.; NEWMAN, H.N.; OLSEN, I.1998.Flow cytometry of ingival and periodontal ligament cells. **Journal of Dental Research**, **77 (4)**: 555-564.

LACERDA, A.L.S. Plantas Transgênicas. 2006. http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/transgenicos/index.htm>. Consultado em: 06/01/2009.

LADEIRA, S.R.L. 1998. Mastite ovina. **IN: Doenças de ruminantes e eqüinos**. RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.D.C. Pelotas: Ed. Universitária/UF-Pel, 651p.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; FUNARI, S.R.C.; CHANDE, C.G.; NEVES, I.R.1996. Efeito antimicrobiano “*in vitro*” da própolis. **Arquivos Brasileiros de Veterinária e Zootecnia**, **48**: 227-229.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; SILVA, A.V. 1999. Tratamento da mastite bovina com cefapiridina sódica em vacas em plena lactação. **A hora Veterinária ano 19, (112)**: 37-39.

LAPPA, F.R. 2006. **Avaliação da atividade antinociceptiva, antiinflamatória e protetora gástrica do extrato hidroalcoólico bruto da *Polygana paniculata* L.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba, 120p.

LEE, J.Y.; BOMAN, A.; CHUANXIN, S.; ANDERSSON, M. H; JORNALL, V.; MUTT; BOMAN, H.G. 1989. Antimicrobial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**: 9159–9162.

LEHRER, R.I.; BARTON, A.; DAHER, K.A.; HARWIG, S.S.L.; GANZ, T.; SELSTED, M.E. 1989. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. **The Journal of Clinical Investigation**, **84**: 553–561.

LEITÃO, S.G.; CASTRO, O.; FONSECA, E.N.; JULIÃO, L.S.; ELIANA S.TAVARES, E.S.; LEO R.R.T.; VIEIRA, R.C.; OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; VIRGINIA MARTINO, V.; SULSEN, V.; BARBOSA, Y.G.; PINHEIRO, D.P.G.; ALMEIDA, P.E.S.; TEIXEIRA, D.F.; JUNIOR. 2006. I.N: LOURENÇO, M.C.S. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16 (1)**.

LEITÃO, S.G.; OLIVEIRA, D.R.; SÜLSEN, V.; MARTINO, V.; BARBOSA, Y.G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; VICCINI, L.F.; SALIMENA, F.R.G.; PEIXOTO, P.H.P.; LEITÃO, G.G. 2008. Analysis of the Chemical Composition of the Essential Oils Extracted from *Lippia lacunose* Mart. & Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Brazilian Chemical Society**, **19 (7)**: 1388-1393.

LEYHAUSEN, G.; ABTAHI, M.; KARBAKHSCH, M.; SAPOTNICK, A.; GEURTSSEN, W. 1998. Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. **Biomaterials**, **6**: 559-64.

LOGUERCIO, A.P.; GROFF, A.C.M., PEDROZZO, A.F.; WITT, N.M.; SILVA, M. S.; VARGAS, A.C. 2006. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **41 (2)**: 347-349.

LORENZI, H. 1992, Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Plantarum**, Nova Odessa, 168p.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, JR. V.F. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, **25(3)**: 429-38.

MAHASNEH, A.M.A.; ADEL, M.A.; EL-OQLAH, A.A.B. 1999. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. **Journal of Ethnopharmacology**, **64 (3)**: 271-276.

MARTÍNEZ M.J.; BETANCOURT J.; ALONSO-GONZÁLEZ N.; JAUREGUI A. 1996. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity, **Journal of Ethnopharmacology** **52(3)**: 171-174.

MATSUZAKI K. 1999. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defence? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochimica et Biophysica Acta** **1(2)**: 1-10.

MELO, P.S.; MARIA, S.S.; VIDAL, B.C.; HAUN, M.; DURAN, N. 2000. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. ***In vitro Cellular & Developmental Biology: Animal***, **36**: 639-543.

MERESTA, L.; MERESTA, T.; BURDZINSKI, J.; CHMURZYNSKI, P. 1989. Treatment of mastitis in cows using an extract of propolis. ***Medycyna Weterinaryjna***, **45**: 392-395.

METLITSKAIA, L.; CABRALDA, J.E.; SULEMAN, D.; KERRY, C.; BRINKMAN, J.; BARTFELD; GUARNA, M. M. 2004. Recombinant antimicrobial peptides efficiently produced using novel cloning and purification processes. ***Biotechnology and Applied Biochemistry***, **39 (3)**: 339-345.

MOORE, A. J.; BEAZLEY, W.D.; BIBBY, M.C.; DEVINE, D.A. 1996. Antimicrobial activity of cecropins. ***Journal Antimicrobiology Chemotherapy***, **37**: 1077–1089.

MOREIRA, L. F. 1995. Diagnóstico dos problemas ecotoxicológicos causados pelo uso de inseticidas (metamidofos) na região de Viçosa-MG- Viçosa, UFV, ***Viçosa: UFV***, 95p.

MOREIRA, L.F.; PAIXÃO, J.L.F. 2005. Diferenças entre produção convencional. Belo Horizonte: ***Emater, MG***, 23 p.

MOREIRA, R.M.; CARMO, M.S. 2004. Agroecologia na construção do desenvolvimento rural sustentável. ***Agricultura, São Paulo, São Paulo***, **51 (2)**: 37-56.

MOREL, A. F.; MALDANER, G.; ILHA, V.; MISSAU, F.; SILVA, F. U.; DALCOL, I. 2005. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. ***Phytochemistry***, **66**: 2571-76.

MORS, W.B.; PELLEGRINO, J.; SANTOS FILHO, M.F. 1966. Ação profilática do óleo dos frutos de Sucupira-branca, *Pterodon pubescens* Benth., contra a infecção pelo *Schistosoma mansoni*. ***Anais da Academia Brasileira de Ciências***, **38**: 325-330 Suplemento.

MUKHERJEE, R. U.K. 2009. Expression of cytokines and respiratory burst activity of milk cells in response to *Azadirachta indica* during bovine mastitis. ***Tropical Animal Health and Production***, **41**: 189 –197.

MUKHERJEE, R.; DASH, P.K.; RAM, G.C. 2005. Immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* (L) in bovine subclinical mastitis. **Research in Veterinary Science**, **79** (2005): 37–43.

MÜLLER, E.E. 2002. Qualidade do Leite, células somáticas e prevenção da mastite. **Anais do II Sul-Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil / NUPEL**, 212 p.

NARDONE, R.M. 1977. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G.H.; CRISTOFALO, V.J. (Ed.). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**: 471-495.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, **31**: 247-256.

NAVARRO, M.G.M. 1992. Agroecologia: bases teóricas para uma história agrária alternativa. **Agroecologia Y desenvolvimento: Rev. Clades, Santiago** (4). <http://www.clades.org/r4-3.htm>. Consultado em: 24/02/2008.

NAVARRO V.; VILLARREAL M.L.; ROJAS G.; XAVIERB L. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases, **Journal of Ethnopharmacology**, **53** (3): 143-147.

NETO, L.G.; LOPES, N.P. 2007. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, **30** (2).

NEVES, F.A.; SANTOS, D.R.; LUCENA, P.A.; SOUZA J.; GENEBALDO F.; OLIVEIRA, C.M.; SILVA, M.R.R. 2007. Teste de susceptibilidade de dermatófitos ao extrato semi-sintético hexanóico de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Suplemento IV**, **2**: 44-46.

NICKERSON, S.C. 1985. Immune mechanisms of the bovine udder: An overview. **Journal American Veterinary Medical Association**, **87** (1): p. 41-45.

OARD, S.V.; ENRIGHT, F.M. 2006. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. **Plant Cell Reports**, **25**: 561–57.

OLIVEIRA, F.P.; LIMA, E.O.; SIQUEIRA J.; PINTO J.; SOUZA, E.L.; SANTOS, B.H.C.; MEDEIROS, H. 2006. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from

clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16 (4)**: 510-516.

OLIVEIRA, M.A.; CLARO, T.A. 2008. Biotecnologia dos anitibióticos. <http://www.fes.br/disciplinas/far/biotecnologia/Ta%Eds%20e%20> Mirene.doc. Consultado em 06/01/09

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUDE. 1998. Tradicional, Complementary and alternative medicines and therapies. Washington, DC, Oficina regional de la OMS para las Americas/ Organizacion Panamericana de la salute.

ORMOND, J.G.P.; PAULA, S.R.L.; FAVERET, F.P; ROCHA, L.T.M. 2002. Agricultura Orgânica, quando o passado é futuro. BNDS. <http://www.bndes.gov.br/conhecimento/bnest/set1501.pdf>. Consultado em 05/12/08.

PAAPE, M.J.; WERGIN, W.P.; GUIDRY, A.J.; PEARSON, R.E. 1979. Leukocytes - second line of defense against invading mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, **62**: 135-153.

PAULA, A.C.; CLEMENTE F.F. 2003 Plantas medicinais: utilização popular e diversidade química para a indústria. **Lavras: UFLA/ FAEPE**.

PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L.F.F. 2003. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente à diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, **70 (4)**: 391-395

PEELER, E.J.; GREEN, M.J.; FITZPATRICK, J.L.; MORGAN, K.L.; GREEN, L.E. 2000. Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British-dairy herds. **Journal Dairy Science**, **83 (11)**: 2464-2472.

PELEGRINI, P.B.; NORONHA, E.F.; MUNIZ, M.A.R.; VASCONCELOS, I.M.; CHIARELLO, M.D.; OLIVEIRA, J.T.A.; FRANCO, O.L. 2006. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. **Biochimica et Biophysica Acta** : 1141–1146.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. 2002. Vencendo a luta contra a mastite. **Westfalia**, 192 p.

PINHEIRO, D.P.G.; BARBOSA, Y.A.G.; LEITÃO, S.S.G. 2004. Análise Comparativa de extratos obtidos de *Lippia lacunosa* e *Lippia rotundifolia* (Verbenaceae). **XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense**.

PINTO, M.S.; FARIA, J.E; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSSO, M.M. 2001. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, **38**: 278-283.

POZZATTI, P; MULLER, L.G; SPADER, T.B; ALVES, S.A. 2006. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de condimentos. **Saúde**, **1**: **32**: 53-58.

RAIA, R.B.; COSTA, E. O.; GARINO, JR. F.; WATANABE, E. T.; THIERS, F. O.; GROOF, M. R. 1999. Estudo da persistência da eliminação de resíduos de antibióticos no leite após tratamento sistêmico e intramamário de mastite. **Napgama**, **2 (1)**: 4-8.

REGULAMENTO (CE) Nº 1831/2003 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO, de 22 de Setembro de 2003, relativo aos aditivos destinados à alimentação animal.

REIS, M.S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. 2003. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC: 45-74.

RIBAS, N.P. 1996. A mastite e a contagem de células somáticas. **Revista Batavo (60)**: 4-6. Encarte Técnico.

RIOS, J.L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. 1988. Antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology** **23**: 127-149.

RIVERA, L.M.; BRUGAROLAS, M. 2003. Estratégias comerciales para los productos ecológicos. **Distribución y Consumo, Madrid**: 15-22.

RIZZINI, C.T. 1978. **Manual de dendrologia brasileira: árvores e madeiras úteis**, 255 p.

SALIMENA, F.R.G. 2000. Revisão taxonômica de *Lippia L. sect. Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae). **Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo**

SALIMENA, P.F.R., GIULIETI, A.M. 1998. Flora da cerra do cipó, Minas gerais: Verbenaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, **17**: 155-186, 1998.

SCARPA G.F. 2004. Medicinal plants used by the criollos of Northwestern Argentine Chaco. **Journal of Ethnopharmacology**, **91**: 115-35.

SCHAELLIBAUM, M. 2000. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. **Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite- CIETEP/FIEP**, **2**: 21-26.

SCHALM, O.M.; CARROL, E.J.; JAIN, N.C. 1971. **Bovine Mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, 360p.

SCHMALZ, G. 1994. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. **Journal of Dentistry**, **2**: 6-11.

SILVA, N. 1999. Diagnóstico de mastite em animais de importância econômica. Encontro de pesquisadores em Mastites, III Botucatu, SP. **Anais... Botucatu**: 51-55.

SILVA, I.D.; SHIGEO, S.F.; TAKATSUKA; ROCHA, M. R.; CUNHA, M. G. 2005. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, **2 (35)**: 109-115.

SIMÕES, C.M.O.; AMOROS, M.; GIRRE, L.; GLEYE, J.; FAUVEL, M.T.H. 1990. Antiviral activity of ternatin and meliternatin, 3-methoxyflavones from species of Rutaceae. **Journal of Natural Products**, **53**: 989-992.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. 2002. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **12(1)**: 35-40.

SHUCH, L.F.D. 2007. **Plantas medicinais em atenção primária veterinária: Atividade antimicrobiana frente à bactérias relacionadas com a mastite bovina e dermatófitos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto alegre.

SIKKEMA J.; DE BONT J.A.M.; POOLMAN B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Reviews**, **59**: 201-222.

SMID E.J.; KOEKEN J.P.G.; GORRIS L.G.M. 1996. Fungicidal and fungistatic action of the secondary plant metabolites cinnamaldehyde and carvone. In: Lyr H., Russell P.E., Sisler H.D. **Modern Fungicides and Antimicrobial Compounds**, 173-180.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. 1995. **Biometry**, 850 p.

SOUSA, S. M. 2008. **Contribuições à biosistemática do gênero *Lippia* L. (Verbenaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras, MG.

STASI, L.C; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.. 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, **73**: 69-91.

SURIYASATHAPORN, W.; SHUKKEN, Y.H.; NIELEN, M.; BRAND, 2000. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. **Journal Dairy Science**, **83 (6)**: 1248-1255.

TEIXEIRA, D. F. 2006. **Estudo químico e avaliação biológica de *Attalea excelsa* MART. ex. (urucuri) e *Pterodon emarginatus* Vog. (sucupira branca) em *Aedes aegypti***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

TERRAS, F.R.G; SCHOOF, H.M.E; THEVISSSEN, H.M.E; BROEKAERT, W.F. 1993. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, **103**: 1311-1319.

TOSSI, A. 2005. Host defense peptides: roles and applications. **Current Protein and Peptide Science**, **6 (1)**: 1-3.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. 2006. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, **42 (2)**.

UNITED STATES PHARMACOPEIA 21/ NATIONAL FORMULARY 16 (USP) Maryland: United States Pharmacopeial Convention, Inc., 16th edition.

VALE, T.G.; MATOS, F.J.A.; LIMA, T.C.M.; VIANA, G.S.B. 1999. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**, **167**: 127-33.

VIDAL, K.A.L. 2007. **Estudo da citotoxicidade de três cimentos obturadores endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol em cultura de células L929**. Dissertação (mestrado), Universidade do Grande Rio, Escola de Odontologia.

VIGNERON, M.; DEPARIS, X.; DEHARO, E.; BOUDY, G. 2005 Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. **Journal of Ethnopharmacology**, **98**: 351-60.

VIRK, A.; STECKELBERG, J.M. 2000. "Clinical aspects of antimicrobial resistance". **Mayo Clinic Proceedings**, **75 (2)**: 200-214.

WALL, M.E.; WANI, M.C. 1996. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, **51**: 239-254.

WALSH, C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance". **Nature**, **406**: 775-781.

WALUM, E.; STRENBORG, K.; JENSSEN, D. 1990. **Understanding cell toxicology: principles and practice**: 97-111.

WEIDUO, S.; JOSHUA G.; RONG, T.; MILOSH, K.; RAYMOND, Y.; Y, Y. 2006. Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. **Journal of Chromatography A**, **1125**, 204–210.

WHO (World Health Organization). 2000. **"World Health Organization Report on Infectious Diseases 2000 – Overcoming antimicrobial resistance"**. World Health Organization 2000 Publication Code: WHO/CDS/2000.2. <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000> Consultado em: 28/03/2008.

WIEST, J.M.; FENSTERSEIFER, L.M. 1985. Considerações sobre o processo de desinfecção. **Arquivo Faculdade Veterinária**, **13**: 75-79.

WILSON, A.P. 2000. Cytotoxicity and viability assays. In: MASTERS, J.R.W. **Animal Cell Culture**: 175-219.

WU, H.; ZHANG, G.; MINTON, E.J.; ROSS, C.R.; BLECHA, F. 2000. Regulation of cathelicidin gene expression: induction by lipopolysaccharide, interleukin-6, retinoic acid, and *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection. **Infection and Immunity**, **68 (10)**: 5552-5558.

YANG L.; WEISS T.; LEHRER R.; HUANG. 2000. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. **Biophysical Journal** **79**: 2002–2009.

YEAMAN, M.R.; YOUNT, N.Y. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, **55 (1)**: 27-55.

ZADOKS, R.N. 2004. Molecular methods on dairy farms: case studies. **Molecular methods in milk quality**: 31-38.

ZASLOFF. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, **415**: 389 – 439.

ZHANG, Y; LEWIS, K; FABATINS, K. 1997. New antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiological Letters**, **149**: 59-64.

ZHANG, X. 2005. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional **Bulletin of International Dairy Federation**, **345**: 15-18. <http://www.who.int>. Consultado em 06/11/07.

ZECCONI, A.; HAHN, G. 2001. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF, Brussels**, **345**: 15-18. **NEXO B – Resumo apresentado em Congresso.**

ANEXO A – Resumo apresentado em Congresso

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FRAÇÕES DE *Pterodon ermuginatus* Vogel CONTRA MICROORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA

¹QUINTÃO, C.C.R.; ¹FERREIRA, A.S.; ¹DUTRA, R.C.; ¹BARBOSA N.R.; ²LANGE, C.C.

¹Faculdade de Farmácia e Bioquímica- NIQUA - UFJF, Juiz de Fora- MG

²Embrapa- Empresa Brasileira de Agropecuária-Gado de Leite

E-mail: nadiafox@gmail.com

INTRODUÇÃO

A mastite consiste em um processo inflamatório da glândula mamária acompanhado da redução de secreção de leite (BRITO et al, 2002). Bactérias, como *Staphylococcus aureus*, são consideradas patógenos primários e têm sido o agente mais freqüentemente isolado tanto de infecções clínicas como subclínicas (BRITO et al, 2002, FUEYO et al, 2005).

O úbere bovino consiste de 04 glândulas mamárias sendo que, cada uma delas pode contrair mastite independente das outras. As freqüências de infecção intramamária entre vacas foram estimadas em 48,5 % em um levantamento realizado nos Estados Unidos da América, enquanto no Canadá, 19,8 % das vacas analisadas apresentaram mastite durante a lactação (GILL et al, 2006).

Estudos crescentes sobre as atividades antimicrobianas de produtos do metabolismo secundário de plantas têm sido conduzidos, visando a busca de novos agentes terapêuticos; necessidade esta decorrente da resistência desenvolvida por muitos microorganismos (COWAN, 1999, NASCIMENTO et al, 2000;).

OBJETIVOS DO ESTUDO

O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos e frações da planta *Pterodon ermuginatus* Vogel (sucupira branca) sobre as bactérias causadoras de mastite: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Klebsiella pneumoniae*, os quais poderão representar uma alternativa viável para o tratamento da mastite bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Pterodon emarginatus* foram coletadas no cerrado em setembro de 2006, no município de Três Marias/MG, com respectiva caracterização botânica realizada pela Dra Fátima Regina Gonçalves Salimena e tombada na coleção do Herbário CESJ (n° 48077) do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz (UFJF), Juiz de Fora - Minas Gerais.

As frações (hexânica, acetato de etila, butanólica metanólica, etanólica) vegetais foram obtidas por extração utilizando-se o aparelho de Soxhlet, na presença de solventes de diferentes polaridades, e, em seguida, submetidas à rotaevaporação até a obtenção de resíduo sólido.

Os microorganismos testados e supra-citados foram cedidos pela empresa Embrapa-Gado de Leite, com sede em Juiz de Fora, MG.

Para a realização da atividade antimicrobiana foi utilizado o método de turbidimétrico, a partir do qual foi calculada a concentração inibitória mínima (MIC) (Candan et al, 2003). Os ensaios foram conduzidos empregando-se as concentrações de 10 mg.mL⁻¹ a 0,625 mg.mL⁻¹ de cada fração e, ainda, realizados em triplicata. O antibiótico padrão utilizado foi a gentamicina na concentração de 0,001 µg.mL a 10 µg.mL.

RESULTADOS

Os resultados de atividade antimicrobiana e os valores de MIC obtidos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana dos extratos vegetais de *Pterodon ermaganatus* contra bactérias causadoras de mastite bovina

Microorganismo	Extrato com ação bacterostática	Extrato com ação bactericida	MIC (mg.mL ⁻¹)	Ação da gentamicina (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	E	ND	2,5	Bactericida*
<i>S. agalactiae</i>	A; E	ND	A:1,25 E:2,5	Bacteriostático
<i>S. uberis</i>	ND	A; E	A: 1,25 E:5	Bactericida
<i>S. bovis</i>	E	A	E:10 A:1,25	ND
<i>S. dysgalactiae</i>	A	ND	0,63	ND
<i>K. pneumoniae</i>	A	ND	5	Bacteriostático

Legenda: A = Fração hexânica de sucupira ; E =Fração etanólica de sucupira; * para todas as concentrações testadas; ND = não detectada

CONCLUSÕES

A partir da análise dos dados foi possível concluir que os extratos obtidos de sementes de *Pterodon ermaganatus* apresentaram ação antimicrobiana contra linhagens causadoras de mastite bovina. Vale ressaltar que as espécies empregadas foram resistentes à maioria dos antibióticos convencionais. Esses dados demonstraram a potencialidade desta planta como um tratamento alternativo e viável para esta patologia, o que poderá contribuir para a redução de prejuízos à economia leiteira e à saúde do animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRITO, M.A.V.P.; CAMPOS, G.M.M.; BRITO, J.R.F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 79-82, 2002.
- CANDAN, F.; UNLU, M.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, A.; AKPULAT, A. Antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 215-220, 2003.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.
- FUEYO, J.M.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R.; MUÑIZ, J.; ALVAREZ, M.A.; MARTIN, M. C. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclin-

ical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1278–1284, 2005.

GILL, J.J.; PACAN, J.C.; CARSON, M.E.; LESLIE, K.E.; GRIFFITHS, M.W.; SABOUR, P.M. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 2912–2918, 2006.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.


III SIMPÓSIO MINEIRO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS III FÓRUM DE DEBATES SOBRE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Certificamos, para os devidos fins, que

o trabalho ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FRAÇÕES DE *Pterodon ermagenatus* Vogel CONTRA MICROORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA; de autoria de QUINTÃO, C.C.R.; FERREIRA, A.S.; DUTRA, R.C.; BARBOSA N.R.; LANGE, C.C. ficou em 4º Lugar entre aqueles apresentados no

III Simpósio Mineiro de Microbiologia de Alimentos e III Fórum de Debates sobre Vigilância Sanitária, promovido pelo Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (DTA/UFV) realizado de 14 a 18 de abril de 2008, no Campus da Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais.

Viçosa, 18 de Abril de 2008.


Regina Célia Santos Mendonça
COORDENADORA DO EVENTO


José Benício Paes Chaves
PRESIDENTE SBCTA - REGIONAL MG

Realização: Universidade Federal de Viçosa
Departamento de Tecnologia de Alimentos - DTA
Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos - Regional MG