

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

**ATIVIDADE DE DESINFETANTES E DE EXTRAÇÕES DE PLANTAS
MEDICINAIS NO SUL DO BRASIL SOBRE CEPAS DE *Candida* PADRÃO E
ISOLADAS EM MASTITE BOVINA**

FELIPE LOPES CAMPOS

PORTO ALEGRE

2014

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

**ATIVIDADE DE DESINFETANTES E DE EXTRAÇÕES DE PLANTAS
MEDICINAIS NO SUL DO BRASIL SOBRE CEPAS DE *Candida* PADRÃO E
ISOLADAS EM MASTITE BOVINA**

Autor: Felipe Lopes Campos

Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Veterinárias na
especialidade epidemiologia,
saneamento e profilaxia

Orientador: Cesar Augusto
Marchionatti Avancini

PORTO ALEGRE
2014

CIP - Catalogação na Publicação

Campos, Felipe Lopes
ATIVIDADE DE DESINFETANTES E DE EXTRAÇÕES DE
PLANTAS MEDICINAIS NO SUL DO BRASIL SOBRE CEPAS DE
CANDIDA PADRÃO E ISOLADAS EM MASTITE BOVINA / Felipe
Lopes Campos. -- 2014.
80 f.

Orientador: Cesar Augusto Marchionatti Avancini.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2014.

1. Plantas Medicinais. 2. Desinfetantes. 3.
Candida albicans. 4. Candida krusei. 5. Candida
rugosa. I. Avancini, Cesar Augusto Marchionatti,
orient. II. Título.

Felipe Lopes Campos

**ATIVIDADE DE DESINFETANTES E DE EXTRAÇÕES DE PLANTAS
MEDICINAIS NO SUL DO BRASIL SOBRE CEPAS DE *Candida* PADRÃO E
ISOLADAS EM MASTITE BOVINA**

Aprovada em ____/____/____

Prof. Dr. César Augusto Marchinonatti Avancini

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur

Membro da Comissão

Prof. Dra. Saionara de Araujo Wagner

Membro da Comissão

Prof. Dra. Verônica Schmidt

Membro da Comissão

A Deus.

“Inteligência Suprema Causa primária de todas as coisas” (Livro dos Espíritos, p.0001)

À minha filha Livia (01/01/2011 – 11/01/2011) por ter me ensinado tanto em tão pouco tempo... (“E até que nos encontremos de novo que Deus lhe guarde na palma da mão” - Prece Irlandesa)

Ao meu filho Luiz Gustavo que chegando em 01/11/2012 veio me ensinar um pouco mais... E a vida se (re)fez sorriso...

Ao meu orientador Cesar Augusto pela forma como conduziu esta orientação e fazendo do doutoramento uma fonte de aprendizado que foi “além da letra”... Dedico esta obra, também a ti, por sua Grandeza ...

AGRADECIMENTOS

“... Não te ouvides o valor da gratidão nos passos da vida... A cada instante estás chamado ao reconhecimento pelas concessões que te enriquecem em experiência...”

Joanna de Angelis.

Agradecer talvez seja o ato final de lembrança àqueles que direta ou indiretamente foram importantes na construção desta etapa... Tantas foram as trocas de vivências que talvez a palavra falhe em reproduzir o tamanho do agradecimento... ou por outro lado talvez no

*lapso de memória que o calendário pode nos trazer, alguém não esteja aqui em palavras,
mas envio ainda assim meus sinceros agradecimentos...*

*A minha esposa por ter dividido comigo esta etapa, delicada e intensa, doando o seu
melhor a cada dia.*

A toda equipe do laboratório de Medicina Veterinária Preventiva – UFRGS

*A querida Jane Both por dividir tantas etapas deste projeto e por compartilhar tantos
momentos de vida*

A Mônica pelas boas trocas de experiências

As estagiárias Ellusa e Natália por suas contribuições

*A prof. Patrícia Valente e ao prof. Laerte Ferreiro, pelo apoio no isolamento e
identificação das leveduras*

*A prof. Ingrid Bergman, ao Prof. José Maria Wiest, e a Prof. Veronica Schmidt, por
terem participado de minha qualificação no segundo ano do doutoramento e contribuído
dessa maneira para a continuidade deste trabalho.*

Ao prof. Eduardo Miranda Ethur pela disponibilidade nas análises fitoquímicas

*Aos vigilantes da FAVET que nos mais diversos horários dos finais de semana
ininterruptos não deixavam de receber-me cumprindo de forma qualificada o seu
trabalho*

*Ao colega de trabalho Luiz Antonio Piovesam pelo prestimoso apoio ao apresentar
algumas plantas medicinais em sua propriedade.*

*A todos os professores que passaram por minha vida, desde as professoras do maternal
que me apresentaram o mundo do saber até os que até a presente data contribuem para a
minha formação como profissional e como ser humano.*

Aos amigos Rosângela, Aurélio, por sua disponibilidade, carinho e atenção.

Por fim... Mas não menos importante... Aos meus pais, Amaury e Marina, que sempre fizeram do sacrifício de suas próprias vidas, os passos necessários ao meu crescimento intelectual e moral.

RESUMO

CAMPOS, F.L. ATIVIDADE DE DESINFETANTES E DE EXTRAÇÕES DE PLANTAS MEDICINAIS NO SUL DO BRASIL SOBRE CEPAS DE *Candida* PADRÃO E ISOLADAS EM MASTITE BOVINA

No defrontar-se com os problemas relacionados às condições de saúde humana ou animal, mais especificamente as doenças infecciosas, os seres humanos das mais diversas culturas produzem conhecimentos e recursos para debelá-las. Esse reconhecimento tem despertado em investigadores em ciência o interesse pelo desenvolvimento de pesquisas etnográficas, como acontece aqui no estado do Rio Grande do Sul, visando o levantamento de espécies de plantas medicinais utilizadas por diferentes comunidades. A possibilidade de encontrar entre as plantas nativas alguma propriedade antimicrobiana constitui-se um grande desafio principalmente em um momento com relatos de resistência de microrganismos a inúmeros fármacos e desinfetantes convencionais existentes. Nesse sentido objetivando avaliar a ação desinfetante de plantas consideradas medicinais no Rio Grande do Sul assim como de desinfetantes convencionais como fungicidas, foram utilizadas cepa de *Candida albicans* ATCC e 21 isolados de *Candida krusei*, nove isolados de *Candida rugosa* e um isolado de *Candia albicans*, em mastite bovina. As plantas foram selecionadas por pesquisa bibliográfica cujo teor tivesse relação com estudos etnográficos no Rio Grande do Sul e, na sequência, foram realizados testes de triagem na forma de decocção e extrato hidroetanólico hidratado (EH), obtido de maceração hidroetanólica 70° GL, desalcoolizada e hidratada ao volume inicial, ambas as formas na proporção 5g/100 mL, frente as densidade as populacionais 10^5 , 10^4 e 10^3 UFC/mL da cepa padrão, nos tempo de contato de uma e 24 horas. Da etapa de triagem foi selecionada a planta “Macela” *Achyrocline satureioides* na forma de EH para teste com os isolados com as mesmas densidades populacionais usadas na triagem e tempos de contato iniciando em 15 minutos até o tempo em que não mais se observava o crescimento de colônias. Os desinfetantes convencionais Iodóforo e Amônia Quaternária (QAC – cloreto de cetil trimetilamônio) nas concentrações de 100%, 50% e 25%, foram confrontados com a cepa padrão e os 31 isolados de campo na densidade populacional de 10^6 UFC/mL, nos tempos de contato de 15, 30 e 60 minutos, baseado na técnica do teste de suspensão na avaliação quantitativa da atividade fungicida e

leveduricida de desinfetantes e antissépticos. A forma de decoto não apresentou diminuição logarítmica nas densidades populacionais testadas, nos tempos preconizados e a forma EH demonstrou diminuição logarítmica e tendo a marcela inibido o crescimento da cepa padrão já na primeira hora de contato sendo, por isso, escolhida para os testes com os isolados que apresentaram inativação entre os tempos contato de 30 minutos e 12 horas. Nos desinfetantes convencionais a menor concentração testada, no menor tempo de contato já foi capaz de inativar as células de leveduras, como era esperado. Em relação a atuação de *Achyrocline satureioides* a mesma apresentou na forma EH 5g/mL ação que nos permite sua utilização no controle da densidade populacional da levedura *Candida* spp.

Palavras-Chave: Desinfetante, leveduricida, *Candia albicans*, *Candida krusei*, *Candida rugosa*, plantas medicinais

ABSTRACT

CAMPOS, F.L.: ACTIVITY OF DISINFECTANTS AND EXTRACTS OF BRAZILLIAN MEDICINAL PLANTS AGAINST STANDARD *Candida* AND *Candida* STRAINS ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS

When faced with problems related to the conditions of human or animal health,, specifically infectious diseases, human beings of diverse cultures produce knowledge and resources to quenching them. This recognition has attracted the interest of researchers to develop ethnographic studies, as it happens here in the state of Rio Grande do Sul, aiming at the survey of medicinal plants used by different communities. The possibility of finding native plants with antimicrobial property constitutes a major challenge especially in a moment with reports of microorganisms resistance to several drugs and conventional disinfectants. In this way, the aim of this study was to evaluate the Disinfectant activity of medicinal plants from Rio Grande do Sul and the fungicidal activity of conventional disinfectants. The *Candida* strains used was *Candida albicans* ATCC and *Candida* spp strains isolated from bovine mastitis cases (21 isolates of *Candida krusei*, nine isolates of *Candida rugosa* and one isolate of *Candida albicans*). The plants were selected by bibliographic research related to ethnographic studies in Rio Grande do Sul. Later, it was performed screening of decoction and hydrated hydroethanolic extract (HE), obtained by maceration hydroethanol 70 ° GL, dealcoholized and hydrated to the initial volume, in the proportion 5 g/100 mL, front standard *Candida albicans* population densities of 10^5 , 10^4 and 10^3 CFU.mL⁻¹, in a contact time of 1 h and 24 h. After screening, the selected plant was “Macela” *Achyrocline satureioides*. The hydrated hydroethanolic extract of *Achyrocline satureioides* was tested front isolates with the same population densities used in screening and the time of contact begin at 15 minutes until the time that does not observe growth of colonies. The disinfectants iodophor (I) and quaternary amonium (QAC - cetyl trimethylammonium chloride), at concentrations 100%, 50% and 25%, were confronted with standard strain and 31 isolates from mastitis cases, population density of the initial inoculum was 10^6 CFU /mL, for contact times of 15, 30 and 60 minutes. The method used was dilution by the quantitative suspension test for evaluation of fungicidal and yeasticidal

activities of Disinfectants and Antiseptics Chemicals. The decoction form does not present logarithmic reduction of tested population densities, at the recommended time and HE demonstrated logarithmic reduction; Marcela inhibited the growth of the standard strain within the first hour of contact and because of that it was chosen to the tests on isolates. Isolates showed inactivation between 30 minutes to 12 hours of contact time. It was observed that the lowest concentrations of the conventional disinfectants, at the lowest time of contact, inactivated all tested yeasts, as it was expected. Regarding the performance of *Achyrocline satureioides*, the extract (5g/mL) presented action that allows us to use it in the control of population density of the yeast *Candida* spp.

Key-words: Desinfectant, yeasticidal, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida rugosa*, medicinal plants.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Número de isolados (n=31) de *Candida* spp, com densidade populacional 10^6 UFC/mL, inativados frente a três concentrações dos desinfetantes Idofór (I) e Composto Quaternário de Amônio (QAC – cloreto de cetil triametilamônio).....30

ARTIGO 2

Tabela 1 - Triagem da capacidade de redução da densidade populacional inicial ou de inativação do decocto e do extrato hidroetanólico reidratados de plantas, frente *Candida albicans* ATCC 14053, avaliadas pelo teste de suspensão quantitativo.... 42

ARTIGO 3

Tabela 1 - Unidades formadoras de colônia viáveis (UFC) ou inativação total de *Candida albicans* padrão promovido pelo extrato hidroetanólico hidratado *Achyrocline satureioides* (5g:100 mL e 2,5g:100mL), usando teste de suspensão quantitativo 54

Tabela 2 - Unidades formadoras de colônia viáveis (UFC) ou inativação total de *Candida albicans* padrão e isolado em situação-problema de mastite bovina. promovido pelo extrato hidroetanólico hidratado *Achyrocline satureioides* (5 g : 100 mL), usando teste de suspensão quantitativo 55

Tabela 3 - Número de isolados (em situação-problema de mastite bovina) de *Candida krusei* (N=21) com redução de unidades logarítmicas ou inativados pelo extrato hidroetanólico hidratado de *Achyrocline satureioides* (5 g : 100 mL), usando teste de suspensão quantitativo 56

Tabela 4 - Número de isolados (em situação-problema de mastite bovina) de *Candida rugosa* (N=9) com redução de unidades logarítmicas ou inativados pelo extrato hidroetanólico hidratado de *Achyrocline satureioides* (5g:100mL), usando teste de suspensão quantitativo 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD – Agar Sabouraud Dextrose

ATCC – American Type Culture Collection

DDA – Departamento de Defesa Agropecuária

EH – Extrato hidroetanólico hidratado

OMS – Organização Mundial da Saúde

PPGCV – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária

RS – Rio Grande do Sul

SEAPA – Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Situação problema: mastite micótica	16
1.2. Desinfetantes	17
1.2.1. Compostos de amônia quaternária	18
1.2.2. Iodóforo.....	18
1.3. Plantas medicinais	19
1.3.1. <i>Achyrocline satureioides</i> DC.	20
1.3.2. <i>Baccharis trimera</i> (Less.)DC.	20
1.3.3. <i>Bidens pilosa</i> L.....	21
1.3.4. <i>Chaptalia nutans</i> (L.) Pol.....	21
1.3.5. <i>Cyperus ferox</i> Vahl	21
1.3.6. <i>Cyperus brevifolius</i> (Rottb) Hassk.....	22
1.3.7. <i>Maytemus ilicifolia</i> (Schrad) Planch.....	22
1.3.8. <i>Polygonun punctatum</i> Elliot.....	22
2. PROBLEMAS DE PESQUISA	22
3. HIPÓTESE	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. FINANCIAMENTO	24
6. ARTIGO 1 - Eficácia <i>in vitro</i> dos desinfetantes iodóforo e composto amônio quaternário sobre cepa de <i>Candida</i> padrão e isoladas em situação-problema de mastite bovina	25
7. ARTIGO 2 - Triagem da ação antimicrobiana/desinfetante do decocto e do extrato hidroalcoólico hidratado de plantas, frente <i>Candida albicans</i> padrão	34
8. ARTIGO 3 - Atividade antimicrobiana/desinfetante de extrato hidratado de maceração hidroetanólica de <i>Achyrocline satureioides</i> DC. - Asteracea (“macela”), sobre <i>Candida albicans</i> padrão e leveduras isoladas em situações-problema de mastite bovina	49

CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	70

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Situação-problema: Mastite Micótica

A mastite bovina causada por leveduras e fungos filamentosos pode ser considerada epidemiologicamente como enfermidade emergente, sendo os principais gêneros envolvidos *Candida* spp (CRUZ, 1998; JONES; HUNT; KING, 2000) e *Cryptococcus* spp, além de *Geotrichum* spp, *Pichia* spp e *Trichosporum* spp (SPANABERG, *et al.*, 2009). Observou-se um aumento na incidência a partir das décadas de 50 e 60 com o advento da antibioticoterapia antibacteriana (JUNIOR, 2007). Assim como para agentes causais bacterianos, a sua gestão sanitária necessita de procedimentos adotados no corpo do animal, através das terapias com antibióticos, e também a ação sobre os agentes morbígenos quando em vida livre.

Segundo Ladeira (2007), a fonte de infecção dos fungos reside nos utensílios de ordenha, preparações medicamentosas, instrumentos para introdução intramamária, mãos do ordenhador e na pele que reveste o teto do animal. A infecção da glândula mamária ocorre, geralmente, via canal do teto, principalmente após a ordenha quando o esfíncter deste se encontra relaxado e o agente infeccioso consegue penetrar. Além das práticas no processo de ordenha, a contaminação do ambiente está entre os fatores mais importantes para que aconteça a infecção. (TYLER & CULLOR, 2002)

Existe relação direta entre o número de microrganismos presentes na superfície dos tetos, das teteiras e mãos do ordenhador e as taxas de infecções intramamárias, sendo que a adequada higiene (limpeza, antissepsia e desinfecção) do úbere e do ambiente de produção é uma importante medida na prevenção e controle de enfermidades da glândula mamária (JUNIOR, 2007). A manipulação de superfícies apresenta-se como fonte de contaminação, tendo a *Candida* spp ampla distribuição e capacidade de sobreviver no ambiente (BRASIL, 2010).

No entanto, a implantação de programas sanitários frequentemente enfrenta limitações como custo ou mesmo resistências de agentes causais aos produtos comerciais (CHAPMANN, 1998; O.I.E., 2003). Também os sistemas tecnológicos de criação animal

referenciados nos modelos agroecológico e orgânico sofrem limitações com a carência de investigações científicas que deem segurança aos sanitaristas para que insumos veterinários considerados sustentáveis sejam usados em substituição ou em complementaridade aos produtos convencionais.

Tendo esses argumentos postos, a investigação proposta pauta-se pelos seguintes objetos:

- posto que as situações-problema em mastite bovina possam ter ocorrido devido ao fato de isolados de *Candida* spp terem vencido a barreira sanitária desinfecção, pretende-se monitorar a atividade de desinfetantes sobre as cepas isoladas;
- descobrir novos antimicrobianos para serem usados, de modo mais marcado, como recurso sanitário para a produção animal utilizando insumos de baixo custo.

1.2 – Desinfetantes

Os microrganismos são as formas mais difundidas na natureza, e tendo em vista seus possíveis efeitos, o controle é fundamental a fim de evitar reações indesejáveis para a saúde e o meio ambiente. Os fungos tem apresentado crescente resistência tanto aos antissépticos quanto aos desinfetantes, sejam por mecanismos intrínsecos promovendo inativação enzimática de agentes químicos ou por mecanismos extrínsecos como a mutação (MCDONNELL & RUSSELL, 1999). O controle químico é uma das formas preconizadas e os desinfetantes são usualmente utilizados, tendo por definição ser um produto que mata todos os microrganismos patogênicos mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas em objetos e superfícies inanimadas, sendo considerado fungicida o produto letal para todas as formas de fungos (BRASIL, 2007).

A desinfecção é definida como procedimento adotado após a limpeza, que elimina microrganismos patogênicos na forma vegetativa, não esporos, sobre objetos inanimados. Já a antissepsia é procedimento adotado sobre tecidos vivos (ACHA, 1992; BRASIL 2007; BRITISH STANDARD, 2005; SIDRIM & CAFÉ, 2004). A desinfecção e antissepsia se

localizam no período pré-patogênico, como prevenção primária e se inserem na categoria de saneamento ambiental, como medida preventiva (BRASIL, 2007; GELMAN; CLARK; OMARAN, 1978).

1.2.1 Compostos Quaternário de Amônio (QAC)

Compostos quaternários de amônio têm ação bactericida, viricida (somente contra vírus lipofílicos ou envelopados) e fungicida. É pouco corrosivo e tem baixa toxicidade, tendo indicações para superfícies fixas, incluindo ambiente de nutrição e neonatologia (sem a presença dos neonatos). Seu mecanismo de ação está relacionado com inativação de enzimas produtoras de energia, desnaturação de proteínas e quebra da membrana celular, mas apresenta a desvantagem de poder ser inativado na presença de matéria orgânica. Quando em contato com a membrana celular dos microrganismos, alteram sua permeabilidade estimulando a glicólise, provocando assim o esgotamento celular. Possuem a vantagem de ser de fácil preparo e aplicação (BRASIL, 2010; NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010).

Agentes surfactantes, como é o caso dos QAC, apresentam duas regiões na estrutura molecular, uma com características hidrofóbicas e outra hidrofílica ou polar. São usados para uma variedade de situações em função do seu potencial papel, incluindo limpeza de superfícies e desodorização. Em leveduras induz a lise do protoplasto, tendo como efeito tóxico inicial a desorganização e ruptura da membrana plasmática e sua camada lipídica (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

1.2.2 Iodofor (I)

Iodóforos têm sua ação no alto poder de penetração na parede celular, levando a ruptura de proteínas. Usualmente utilizados em concentração de 30 a 50 ppm por um tempo menor ou igual a 10 minutos. São menos irritantes à pele e menos corrosivos aos metais que o cloro, ativo em baixa concentração, estável e de fácil preparo. Diminui a eficiência com a elevação do pH e podem alterar o sabor ou odor dos alimentos, possuem um custo

superior ao do cloro e não pode ser utilizado em temperaturas acima de 45°C (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010).

Embora menos reativo que o cloro, o iodo é bactericida, fungicida, tuberculocida, viricida e esporicida, dependendo da concentração e tempo de contato. Na forma aquosa ou alcoólica, soluções de iodo são usadas como um antisséptico, porém elas estão associadas a irritação e coloração. Além disso, as soluções aquosas são geralmente instáveis. Estes problemas foram ultrapassados pelo desenvolvimento de iodóforos (agentes liberadores de iodo). Os mais amplamente utilizados são iodo-povidona-iodo e poloxâmico, ambos como antissépticos e desinfetantes. Embora a atividade germicida sendo mantida, os iodóforos são considerados menos ativos contra certos fungos e esporos que as tinturas. Sua ação é rápida, mesmo em concentrações baixas, mas o modo de ação exato é desconhecido. O Iodo penetra rapidamente nos microrganismos e ataca os principais grupos de proteínas, nucleotídeos e ácidos graxos livres, que termina na morte celular. (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

1.3 Plantas medicinais

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, despertando a percepção no homem que diferentes formas de preparo poderiam proporcionar benefícios ao estado geral do indivíduo. Para atender a demanda de conhecimento que a utilização de plantas medicinais exige é necessário o conhecimento da distribuição geográfica das mesmas (LORENZI & MATOS, 2008). Segundo os mesmos autores, o adentrar a esse conhecimento significa ingressar em um universo vasto e variado para descobrir que as plantas podem beneficiar nos processos de cura e manutenção do bem estar de nossos semelhantes. Há um interesse científico de avaliar a possibilidade de substâncias bioativas capazes de promover resultados terapêuticos satisfatórios, avaliando, contudo, o potencial toxicológico capaz de promover possíveis danos ao indivíduo (MENTZ; LUTZEMBERGER; SCHENKEL, 1997).

O Brasil detém um valioso conhecimento tradicional e popular associado ao uso de plantas medicinais, tendo o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2006). Neste sentido, vários

grupos tem dedicado atenção ao estudo de plantas consideradas medicinais através de pesquisas bibliográficas ou etnográficas, organizando seleções de espécies com diversas indicações terapêuticas, entre elas o uso como antimicrobianos e empregadas pela medicina popular (ARCEGO, 2005; AVANCINI, 2002; CASAGRANDE, 2009; CEOLIN, 2009; CLEMENTE & STEFFEN, 2010; DUARTE, 2006; FENNER, *et al.*, 2006; GLAVANI & BAPTISTA, 2003; MARODIN & BAPTISTA, 2001; LIMA; LIMA; DONAZZOLO, 2007; MENDES; MENTS; PICCININI, 2008; PIRIZ, 2013; RITTER, *et al.*, 2002; SCHENKEL, 2001; SCHWAMBACH, 2007; SIMIONATTO, 2004; SOARES, *et al.*, 2004; VENDRUSCOLO & MENTZ, 2006).

1.3.1 *Achyrocline sautreioides* (Lam.) DC.

Planta pertencente à família Asteraceae, conhecida popularmente como “macela” ou “marcela”. Herbácea perene, ereta ou em ramos decumbentes, muito ramificada, nativa de campos e áreas abertas do sul e sudeste do Brasil. No Brasil é usada no tratamento de problemas gástricos, epilepsia, cólicas de origem nervosa, atua ainda como anti-inflamatório, antiespasmódico, diarreia e disenteria (LORENZI & MATOS, 2008). Já teve sua ação estudada frente a bactérias patogênicas apresentando ação antimicrobiana (BOTH *et al.*, 2013; OLIVEIRA, 2012).

1.3.2 *Baccharis trimera* (Less.) DC.

Planta da família Asteraceae, conhecida popularmente como “carqueja”. Caracteriza-se por ser um subarbusto perene, ereto, muito ramificado na base, como ramos e caules verdes com expansões trialadas. Nativa do sul e sudeste do Brasil. Seu uso está relacionado na esterilidade feminina e impotência masculina, problemas hepáticos, disfunções estomacais e intestinais, úlceras, diabetes, angina, malária, garganta, entre outras indicações (LORENZI & MATOS, 2008). Sua ação antimicrobiana tanto na forma de decoto quanto de extrato de maceração hidroetanólica reconstituído já foi estudada por alguns autores que observaram o potencial de inibição e inativação frente a bactérias (AVANCINI; WIEST; MUNDSTOCK, 2000; AVANCINI; WIEST, 2008). Sua ação

também foi estudada em leveduras apresentando, na forma de óleo essencial alguma ação sobre o gênero *Malassezia* (PICOLI, *et al.*, 2007).

1.3.3 *Bidens pilosa* L.

Planta pertencente família Asteraceae, conhecida popularmente como picão-preto. Herbácea ereta, anual, ramificada, com odor característico, nativa de toda América tropical. Cresce espontaneamente em lavouras agrícolas de todo o Brasil sendo considerada planta daninha. É usada popularmente contra angina, diabetes, disenteria, aftosa, hepatite, laringite, verminose, febres, icterícia entre outras indicações (LORENZI & MATOS, 2008). A atividade antimicrobiana já foi estudada tendo a planta apresentado ação antibacteriana (AVANCINI & WIEST, 2008)

1.3.4 *Chaptalia nutans* (L.) Pol

Pertencente à família Asteraceae, conhecida popularmente como “arnica-do-campo”. É uma erva perene, raiz principal curta, raízes laterais longas, caule muito reduzido e folhas rosuladas e tomentosas no dorso. Na medicina popular, as folhas são indicadas internamente como laxante e béquico, e principalmente nos traumatismos, ferimentos e hemorragias em preparações tópica. Estudos farmacológicos têm sido conduzidos com suas folhas atribuindo as mesmas, entre outros potenciais, o de antimicrobiano (EMPINITTI & DUARTE, 2006)

1.3.5 *Cyperus ferox* Vahl

Planta pertencente a família Cyperaceae, sendo conhecida popularmente como “pinheirinho-do-campo e tiririca”. Cresce como planta daninha em plantações, tendo sua indicação etnográfica para a lavagem de feridas (AVANCINI, 2002).

1.3.6 *Cyperus brevifolius* (Rottb.)

Planta pertencente à família Cyperaceae, sendo conhecida popularmente como “Chufa/sulfa”. Cresce como planta daninha em plantações, apresentando indicação etnográfica para “desarranjo, gonorreia ou corrimento em mulheres” (AVANICINI, 2002).

1.3.7 *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch

Pertencente à família Celastraceae, conhecida popularmente como “espinheira-santa”. Apresenta-se como árvore de pequeno porte ou arbusto grande, dotado de copa arredondada e densa, com folhas coreáceas e brilhantes com margens providas de espinhos pouco rígidos. Nativa de regiões de altitude no sul do Brasil. Seu uso está relacionado com problemas estomacais como úlceras, além de ser citado o seu uso e casos de câncer e como antimicrobiano (LORENZI & MATOS, 2008).

1.3.8 *Polygonum punctatum* Elliot

Pertencente à família Polygonaceae, conhecida popularmente como “erva-de-bicho”. Planta herbácea, anual ou perene, de ramos decumbentes e com nós salientes. Nativa da Ásia e naturalizada no sul e sudeste do Brasil (LORENZI & MATOS, 2008).

2 PROBLEMAS DE PESQUISA

2.1 Qual a capacidade de compostos químicos desinfetantes em inativar cepa padrão e isolados de *Candida* spp obtidos em situações-problema de mastite bovina?

2.2 Estudos etnográficos acadêmicos (monografias, dissertações e teses) já realizados no Rio Grande do Sul, recuperando conhecimento popular, permitem selecionar plantas medicinais nativas no sul do Brasil com potencial antimicótico?

2.3 Qual a capacidade das extrações decocto e maceração hidroetanólica de plantas selecionadas em inativar cepa padrão e isolados de *Candida* spp obtidos em situações-problema em mastite bovina?

3 HIPÓTESE

3.1 Os compostos químicos Iodóforo e Quaternário de Amônio (QAC) serão capazes de inativar a dose infectante/densidade populacional inicial da cepa padrão, mas de alguns isolados espera-se apenas a sua redução populacional. O tempo de contato e a concentração influenciarão na ação dos desinfetantes.

3.2 Estudos etnográficos já realizados no Rio Grande do Sul, em trabalhos que informem uso popular de extrações vegetais com finalidade de tratamento de doenças de pele, permitem selecionar plantas nativas no sul do Brasil com potencial antimicótico.

3.3 - Tanto o decocto quanto a maceração hidroetanólica, na proporção 5g:100mL (p:v), das plantas selecionadas apresentam ação sobre a cepa padrão e os isolados de *Candida* spp. Algumas extrações irão inativar as leveduras, e outras apenas reduzir a dose infectante/densidade populacional inicial. Tanto o tempo de contato quanto a densidade populacional irão influenciar a ação.

4- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1 Submeter os desinfetantes ao teste de eficácia (desinfetograma) para verificar a capacidade de reduzirem a dose infectante ou de inativar *Candida* padrão e isolados em situações-problema de mastite bovina.

4.2 Revisar estudos etnográficos realizados no Estado do Rio Grande do Sul, com a finalidade de selecionar plantas, consideradas medicinais, com potencial antimicrobiano, tomando como referência as citações “doenças de pele”.

4.3 Submeter o decocto e a maceração hidro-alcoólica ao teste de eficácia (desinfetograma) para verificar a capacidade das plantas selecionadas em reduzir a dose infectante ou de inativar *Candida* padrão, e assim definir através de triagem qual a planta será testada com os isolados de campo.

5 - FINANCIAMENTO

Edital MCT/CNPq/MEC/CAPES/CT AGRO/CT HIDRO/FAPS/EMBRAPA N ° 22/2010 – Redes Nacionais de Pesquisa em Agrobiodiversidade e Sustentabilidade Agropecuária - REPENSA

Projeto: Rede interinstitucional da cadeia produtiva do leite agroecológico

ARTIGO 1

Eficácia *in vitro* dos desinfetantes iodóforo e composto amônio quaternário sobre cepa de *Candida* padrão e de isoladas de mastite bovina

In vitro efficacy of disinfectants iodophor and quaternary ammonium against standard *Candida* and strains isolated from bovine mastitis

Campos, Felipe Lopes¹; Ferreiro, Laerte²; Spanemberg, Andréia³; Valente, Patricia²
& Avancini, Cesar Augusto Marchionatti²

¹ PPGCV- UFRGS, DDA/SEAPA-RS; ² Professor Associado UFRGS ;³ PPGCV – UFRGS

Resumo

A mastite bovina causada por leveduras, assim como por agentes bacterianos, na sua gestão sanitária necessita de procedimentos adotados no corpo do animal e também sobre os agentes morbígenos quando em vida livre. Relatos sobre a resistência de microrganismos a inúmeros fármacos e desinfetantes convencionais colocam a necessidade de constante monitoramento sobre a atividade desses antimicrobianos. O objetivo deste trabalho foi avaliar atividade desinfetante de dois compostos químicos, o iodóforo (I) e um composto do grupo amônio quaternário (cloreto de cetil trimetilamonio) comumente usados em ambiente de ordenha bovina. O método foi o de diluição, pelo teste de suspensão quantitativa da atividade fungicida e leveduricida de desinfetantes e antissépticos. Os inóculos foram o padrão *Candida albicans* ATCC 14053, 21 cepas de *Candida krusei*, nove de *Candida rugosa* e uma de *Candida albicans* isoladas em leite de vacas com mastite. As concentrações I 100 ppm e QAC 1.000 ppm, com três diluições multiplicadas pelo fator 0,5 foram confrontadas na densidade populacional de 10⁶ UFC/mL, nos tempos de contato de 15, 30 e 60 minutos. Como resultado, observou-se que nas menores concentrações usadas, I 25 ppm e QAC 250 ppm, no menor tempo de contato, estavam inativadas tanto a cepa padrão quanto todos os isolados. Como conclusão, o monitoramento dos dois desinfetantes evidenciou não haver resistência dos inóculos de campo, e a ação sobre a cepa de referência indica serem adequadas barreiras sanitárias para controlar as leveduras em ambientes com situação-problema de mastite bovina.

Palavras-chave: Desinfetante, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida rugosa*, fungicida.

Abstract

Bovine mastitis caused by yeasts, as well as bacterial mastitis, in its health management, needs procedures adopted in animal body and action against free-living moribific agents. Reports of resistance in micorganisms to several drugs and conventional disinfectants showed the need for constant monitoring of the activity of these antimicrobials. The aim of this study was to evaluate disinfecting activity of two chemical compounds, iodophor (I) and quaternary amonium (QAC - cetyl trimethylammonium chloride), commonly used in bovine milking environment. The method used was dilution by the quantitative suspension test for evaluation of fungicidal and yeasticidal activities of Disinfectants and Antiseptics Chemicals. The inocula used were the standard *Candida albicans* ATCC 14053, 21 *Candida krusei* strains, nine strains of *Candida rugosa* and one strain of *Candida albicans* isolated from cow`s milk with mastitis. Three successive dilutions (factor 0.5) of disinfectants at concentrations I 100ppm and QAC 1000 ppm were confronted with *Candida* strains for *contact times of 15, 30 and 60 minutes. The population density of the initial inoculum was 10⁶ UFC/mL. It was observed that at lowest concentrations, I 25 ppm e QAC 250 ppm, and at the lowest time of contact, all tested isolates and the standard strain were inactivated. In conclusion, the monitoring of the two disinfectants demonstrated that inocula do not have resistance and this evidence indicates that they are appropriate sanitary barriers to control the yeast in dairy production environments with problem- situation related to mastitis.*

Key-words: Disinfectant, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida rugosa*, fungicidal.

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina causada por leveduras e fungos filamentosos pode ser considerada epidemiologicamente como enfermidade emergente, sendo os principais gêneros envolvidos *Candida* spp (CRUZ, 1998; JONES, HUNT & KING, 2000) e *Cryptococcosi* spp, além de *Geotrichum* spp, *Pichia* spp e *Trichosporum* spp (SPANABERG et al, 2009). Observou-se um aumento na incidência a partir das décadas de 50 e 60 com o advento da antibioticoterapia antibacteriana (JUNIOR, 2007). Assim como para agentes causais bacterianos, a sua gestão sanitária necessita de procedimentos adotados no corpo do animal, através das terapias com antibióticos, e também a ação sobre os agentes morbígenos quando em vida livre.

Segundo Ladeira (2007), a fonte de infecção dos fungos reside nos utensílios de ordenha, preparações medicamentosas, instrumentos para introdução intramamária, mãos

do ordenhador e na pele que reveste o teto do animal. A infecção da glândula mamária ocorre, geralmente, via canal do teto, principalmente após a ordenha quando o esfíncter deste se encontra relaxado e o agente infeccioso consegue penetrar. Além das práticas no processo de ordenha, a contaminação do ambiente em geral está entre os fatores mais importantes para que aconteça a infecção (TYLER & CULLOR, 2002)

Existe relação direta entre o número de microrganismos presentes na superfície dos tetos, das teteiras e mãos do ordenhador e as taxas de infecções intramamárias, sendo que a adequada higiene (limpeza, antissepsia e desinfecção) do úbere e do ambiente de produção é uma importante medida na prevenção e no controle de enfermidades da glândula mamária. A manipulação de superfícies apresenta-se como fonte de contaminação, tendo a *Candida spp* ampla distribuição e capacidade de sobreviver no ambiente.

Os fungos têm apresentado crescente resistência tanto aos antissépticos quanto aos desinfetantes, sejam por mecanismos intrínsecos promovendo inativação enzimática de agentes químicos ou por mecanismos extrínsecos como a mutação (MCDONNELL & RUSSELL, 1999). O controle químico é uma das formas preconizadas e os desinfetantes são usualmente utilizados, tendo por definição ser um produto que mata todos os microrganismos patogênicos, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas, em objetos e superfícies inanimadas, sendo considerado fungicida o produto letal para todas as formas de fungos (BRASIL, 2007). Conforme Pedrini & Margato (2003) em muitas propriedades de produção animal a escolha do desinfetante ocorre por hábito de uso, facilidade de aplicação ou preço, sendo necessário avaliar a praticidade e limitações de cada desinfetante pois o uso inadequado, assim como diluições impróprias, podem levar a uma seleção natural de cepas resistentes.

Apesar das advertências, a revisão de literatura mostra que o monitoramento da ação dos antimicrobianos desinfetantes tem sido relativamente negligenciado, se comparado com o realizado nos antimicrobianos antibióticos.

Buscando prevenir a ocorrência ou interromper a evolução de mastites, o objetivo foi monitorar possível resistência de fungos à ação dos desinfetantes iodóforo (I) e um composto do grupo amônio quaternário, comumente usados em ambientes de ordenha

bovina, confrontando com levedura padrão e com 31 isoladas em leite oriundos de vacas com mastite clínica ou sub-clínica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Os microrganismos

O experimento foi realizado com cepa de *Candida albicans* ATCC 14053, e isolados de *Candida* spp a partir de 174 amostras leite oriundos de coletas realizadas por médicos veterinários do serviço oficial de sanidade animal do estado do Rio Grande do Sul, assim como de amostras de leites recebidas para diagnóstico no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Após o isolamento, a identificação foi feita no Laboratório de Leveduras do Instituto de Biociências, no Laboratório de Micologia Veterinária da Faculdade de Veterinária, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tomando-se o cuidado para evitar que fossem da mesma fonte, foram selecionados 21 isolados de *Candida krusei*, nove de *Candida rugosa* e um de *Candida albicans*.

Os isolados ficaram armazenados congelados (-20°C) em meio de cultura e glicerol. Para os testes, os isolados foram reativados, transferindo-se 0,2 mL das amostras, para 3 mL de caldo Sabouraud Dextrose e incubados a 34 °C por 24h. Após, retiraram-se alíquotas com alça de platina para esgotamento em Agar Sabouraud Dextrose, e incubação a 34 °C por 24h.

A densidade populacional de confronto dos inóculos foi de 10⁶ UFC/mL, obtida com escala McFarland.

2.2 Desinfetantes

Foram testados dois grupos químicos desinfetantes na forma pura (Delaware®), com laudo técnico. Foram usadas três concentrações, sendo a inicial multiplicada pelo fator 0,5: idóforo (I) 100 ppm, 50 ppm e 25 ppm; composto quaternário de amônio (QAC) - cloreto de cetil trimetilamonio 1000 ppm, 500 ppm e 250 ppm. As concentrações testadas foram escolhidas por referência de uso indicadas em produtos comerciais que utilizam esse

princípio ativo na formulação, bem como por indicações bibliográficas (RUTALA & WEBER, 2008, BRASIL, 2007; BRASIL, 2010b).

2.3 Teste de avaliação da eficiência desinfetante

O método foi o de diluição, pelo teste de suspensão quantitativo da atividade fungicida e leveduricida de desinfetantes e antissépticos (BRITISH STANDARD, 2006).

Tanto a cepa padrão quanto os isolados foram submetidos aos desinfetantes nas três diluições preconizadas nos tempos de contato 15, 30 e 60 minutos. Adicionou-se 1 mL da suspensão a tubos contendo 9 mL da solução dos desinfetantes. Após o tempo de contato, uma alíquota de 1 mL foi retirada e adicionada a 9 mL de caldo Sabouraud com agentes neutralizadores (3% de polisorbato 80, 0,3% de lecitina e 0,1% de histidina), permanecendo por cinco minutos após os quais foram retiradas alíquotas de 0,1 mL, em duplicata, e inoculada por espalhamento de superfície em placa de Petri com Agar Sabouraud Dextrose, incubando-se a 34 °C por 24/48 horas. Após, procedeu-se a leitura das placas visando quantificar o crescimento de colônias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em função da inexistência de variabilidade matemática entre os resultados, seguiu-se apenas a apresentação descritiva dos dados. A *Candida albicans* padrão foi inativada na menor concentração de cada um dos desinfetantes já aos 15 minutos de contato. O Comitê Europeu de padronização indica que a ação leveduricida tem sua eficácia demonstrada a partir da redução de quatro unidades logarítmicas da densidade populacional inicial, o que ocorreu no experimento. Os desinfetantes testados promoveram o mesmo resultado de inativação frente todas as cepas isoladas, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Número de isolados (n=31) de *Candida* spp, com densidade populacional 10^6 UFC/mL, inativados frente a três concentrações dos desinfetantes Iodofór (I) e Composto Quaternário de Amônio (QAC – cloreto de cetil trimetilamônio)

Concentração	Tempo de contato em minutos	I 100 ppm	QAC 1000ppm
100%	15	31	31
	30	31	31
	60	31	31
50%	15	31	31
	30	31	31
	60	31	31
25%	15	31	31
	30	31	31
	60	31	31

Brasil (2010a) relaciona a *Candida albicans* entre os microrganismos para avaliação de desinfetantes de alto nível e de nível intermediário, e o resultado obtido evidencia ser a levedura padrão ATCC 14053 um adequado indicador na avaliação de desinfetantes e antissépticos para serem utilizados como barreira sanitária frente aos isolados de campo.

Coutinho *et al.* (2012) também avaliaram a ação de desinfetantes, dentre eles destes dois grupos químicos, frente a 12 isolados de leite proveniente de vacas com mastite (*Candida tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *Trichosporum* sp). O iodo, na concentração de 5.700 ppm, inativou todos os isolados até 1 min de contato. A amônia quaternária (não informa composto químico), na concentração de 20.000 ppm inativou 8 isolados em 30 segundos de contato e 11 isolados em até 10 min, (tempo de contato máximo), não informando qual a espécie que resistiu. Nota-se que as concentrações que utilizaram foram muito mais elevadas que as deste trabalho.

Mendes *et al.* (2013) encontraram ação fungistática e fungicida do grupo quaternário de amônio sobre leveduras isoladas de animais silvestres, entre elas 8 espécies de *Candida* (*Candida famata*, *C. albicans*, *C. catenulata*, *C. sphaerica*, *C. guilliermondii*,

C. ciferri, *C. intermedia*, *C. globosa*). A concentração mínima de inibição e inativação foram a mesma, de 0,0244 mg/mL, porém o tempo contato observado foi de 48 horas.

Também González (2011), confrontado o quaternário de amônio (cloreto de cetil trimetil amônio) 0,025% (250ppm) com cepa de *Candida guilliermondii*, isolada em mesas de exames e procedimentos em áreas do setor de pequenos animais de hospital veterinário de ensino, observou sua inativação no primeiro minuto de contato.

4 CONCLUSÃO

Tanto o iodóforo quanto o quaternário de amônio promoveram atividade leveduricida sobre a cepa padrão e as isoladas de situação-problema em mastite bovina, não tendo sido observado o fenômeno de resistência. Diante dos resultados nota-se ser a *Candida albicans* ATCC 14053 adequada na avaliação da eficácia de antissépticos e desinfetantes a serem utilizados como barreira sanitária frente espécies de *Candida* ocorrentes em situações-problema de mastite bovina.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução-RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova regulamento técnico para produtos saneantes com ação antimicrobiana harmonizado no âmbito do MERCOSUL através da resolução GMC n.50/06. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 5 mar. 2007, Seção 1, p. 29. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a450e9004ba03d47b973bbaf8fded4db/RDC+14_2_007.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 20 mar. 2009.
- BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC nº 35. Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos, de 16 de agosto de 2010. (a)
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies**. Brasília: ANVISA, 2010. 120 p. (b) Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4ec6a200474592fa9b32df3fbc4c6735/Manual+Limpeza+e+Desinfeccao+WEB.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 jul. 2011.
- BRITISH STANDARD. **The European Standard EN 1040:2005**. Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative - suspension test for the evaluation of fungicidal or yesticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area – test method and requeriments (phase 2, step 1). 2006.

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

COUTINHO, L.C.A., MEDEIROS, E.S., SILVEIRA, N.S.S., SILVA, L.B.G. & MOTA, R.A. Eficácia *in vitro* de desinfetantes utilizados na anti-sepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 32(1):61-65, 2012.

CRUZ, L.C.H. Micologia veterinária. Seropédica-RJ, 1998. 202p. EDITORA?

GONZÁLES, H.N. **Capacidade de inativação de desinfetantes sobre microrganismos isolados de superfícies em áreas críticas de um hospital veterinário de ensino**. Dissertação (Mestrado Acadêmico). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

JONES, T.C, HUNT, R.D. & KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6ª Ed. São Paulo: Manole, 2000, 1415p.

JUNIOR, E.A.W. **Mastite bovina: avaliação microbiológica do leite, com ênfase nas leveduras isoladas de casos de mastite clínica e subclínica, na região do Planalto Médio, RS em 2005 e 2006**. Dissertação (Mestrado Acadêmico). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

LADEIRA, S.R.L. Mastite bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A. & BORGES, J.R. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. Santa Maria: Pallotti, 2007, v.2, p.359-372.

MCDONNELL, G.; RUSSEL, D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 12(1):147-179,1999.

MENDES, J.F.; FREITAS, C.H.; SANTOS, P.R.; TERRA, A.P.; NASCENTE, P.S. & MELLO, J.R.B. atividade desinfetante do quaternário de amônia e do pinho sobre leveduras isoladas de animais silvestres. **XV EMPOS**, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS/Brasil, 2013.

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

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

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. **Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities**. Chapel Hill: Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2008. 158 p.

Disponível em: <http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/disinfection_nov_2008.pdf>.

Acesso em: 20 mar. 2009.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E.M.C.; SANTÚRIO, J.M. & FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, 39(1):282-290, 2009.

RETIRAR STANISZEWSKA, M., ROZBICKA, B., RAJNISZ, A., BOCIAN, E., WASIŃSKA, E., JAKIMIAK, B., RÖHM-RODOWALD, E., KURZAŃKOWSKI, W. & TYSK. Susceptibility of *Candida* spp. Clinical isolates to antimycotics and disinfectants. **Central European Journal of Biology** 5(6): 821-826, 2010.

TYLER, J.W. & CULLOR, J.S. Sanidade e distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B.P. Medicina interna de grandes animais. Barueri-SP: Manole, 2006.p.1019-1037.

ARTIGO 2

Triagem da ação antimicrobiana/desinfetante do decocto e do extrato hidroalcoólico hidratado de plantas selecionadas, frente *Candida albicans* padrão

Screening for antimicrobial and disinfectant activity of decoction and hydrated hydroethanolic extract of plants front standard *Candida albicans*

Campos, Felipe Lopes¹; Ethur, Eduardo Miranda² & Avancini, Cesar Augusto Marchionatti³

¹ PPGCV-UFRGS, DDA/SEAPA-RS; ² Professor Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas – UNIVATES; ³ Professor Associado do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - UFRGS

Resumo

Relatos sobre a resistência de microrganismos a antibióticos e desinfetantes convencionais colocam a necessidade de constante monitoramento sobre a atividade desses antimicrobianos, bem como a possibilidade de encontrar novas soluções ou compostos com essa propriedade constitui-se um grande desafio. Sobre esse último aspecto, o reconhecimento de que o conhecimento gerado de modo tradicional, e mantido popularmente, pode ser fonte da descoberta de recursos para controle de microrganismos relacionados com doenças infecciosas, tem despertado o interesse pelo desenvolvimento de pesquisas com extrações vegetais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade leveduricida desinfetante em extrações de plantas baseado em investigações etnográficas sobre plantas nativas no sul do Brasil selecionadas por uso popular para tratar feridas. Pelo método quantitativo de diluição e técnica de suspensão, foi realizada a triagem da atividade de oito plantas nas formas decocto e extrato hidroetanólico (EH) hidratados ao volume inicial, proporção 5 g : 100 mL (p:v), frente as densidade populacionais 10^5 , 10^4 e 10^3 UFC.mL⁻¹ da *Candida albicans* ATCC 14053, nos tempo de contato de uma e 24 horas. O decocto de nenhuma das plantas promoveu a atividade, o mesmo ocorrendo com o EH de *Bacharis trimera* e *Chaptalia nutans*. O EH de *Achyrocline satureioides* inativou as três densidades populacionais na primeira hora de contato, a *Bidens pilosa* e a *Cyperus ferox* na leitura das 24 h, tendo a *Cyperus brevifolius* inativado as duas menores densidades populacionais e a *Polygonum punctatum* a menor densidade também na leitura das 24 h. A

Maytenus ilicifolia apenas reduziu a menor densidade populacional do inóculo. Concluiu-se que das 8 plantas selecionadas, seis promoveram ação de inativação ou redução na densidade populacional do inóculo padrão.

Palavras-chave: Decocto, extrato hidroetanólico, *Achyrocline satueioides*, plantas medicinais

Abstract

Reports of resistance in micorganisms to several drugs and conventional disinfectants showed the need for constant monitoring of the activity of these antimicrobials. As well as the possibility of discovering new compounds with disinfectant properties is a major challenge. On this last point, the recognition that the traditional and popular knowledge can be a source of discovery of resources for control of microorganisms associated with infectious diseases has aroused interest in the development of research in plant extractions. The aim of this study was to evaluate the yeasticidal activity of extractions of plants selected based on ethnographic research on native medicinal plants in southern Brazil. The method used was dilution by the quantitative suspension test for performing screening for activity of eight plants in hydroethanolic extract (HE) and decoction forms hydrated to the original volume, proportion of the plant was 5 g: 100 mL of solvent, against *Candida albicans* ATCC 14053 population densities of 10^5 , 10^4 and 10^3 CFU.mL⁻¹, in a contact time of one hour and 24 hour. None of the plants decoction showed yeasticidal activity. The same result was obtained for HE of *Bacharis trimera* and *Chaptalia nutanas*. HE of *Achyrocline satueioides* inactivated the three population densities in the first hour of contact. While the HE of *Bidens pilosa* e a *Cyperus ferox* promoted the inactivation in 24 h of contact. In 24h of contact time, *Cyperus brevifolius* inactivated the two lowest populations densities and *Polygonun punctatum* inactivated the lowest population density. *Maytenus ilicifolia* only reduced the lowest population density of inoculum. In conclusion, of the eight medicinal plants of popular use for wounds treatment, six plants promoted the inactivation or reduction in population density of the standard inoculum.

Key-words: Decoction, hydroethanolic extrac, *Achyrocline satueioides*, medicinal plants

1 INTRODUÇÃO

A motivação para o desenvolvimento deste estudo refer-se ao fato de que a mastite bovina causada por leveduras e fungos filamentosos pode ser considerada epidemiologicamente como enfermidade emergente, sendo os principais gêneros envolvidos *Candida* spp e *Cryptococcus* spp, além de *Geotrichum* spp, *Pichia* spp e

Trichosporum spp (CRUZ, 1998; JONES, HUNT & KING, 2000; SPANABERG, et al, 2009). Observou-se um aumento na incidência a partir das décadas de 50 e 60 com o advento da antibioticoterapia antibacteriana (JUNIOR, 2007). Assim como para agentes causais bacterianos, a sua gestão sanitária necessita de procedimentos adotados no corpo do animal, através das terapias com antibióticos, e também a ação sobre os agentes morbígenos quando em vida livre.

No entanto, a implantação de programas sanitários frequentemente enfrenta limitações como custo ou mesmo resistências de agentes causais aos produtos comerciais (CHAPMANN, 1998; O.I.E., 2003). Também os sistemas tecnológicos de criação animal referenciados nos modelos agroecológico e orgânico sofrem limitações com a carência de investigações científicas que dê segurança aos sanitaristas para que insumos veterinários considerados sustentáveis sejam usados em substituição ou em complementaridade aos produtos convencionais (CAMPOS *et al.*, 2013).

O Brasil possui uma flora medicinal particularmente rica, o que fomenta muitos estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos. A utilização de plantas medicinais tem despertado um interesse crescente por diversos segmentos da sociedade, desde seu uso por comunidades através da medicina popular com seus “curandeiros”, assim como nos meios acadêmicos com profissionais da saúde e pesquisadores de uma forma geral (COSTA, *et al.*, 2009). Neste segundo grupo há um interesse científico de avaliar a possibilidade de substâncias bioativas capazes de promover resultados terapêuticos satisfatórios, avaliando contudo o potencial toxicológico capaz de promover possíveis danos ao indivíduo (MENTZ; LUTZEMBERGER; SCHENKEL, 1997).

De acordo com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada pelo Ministério da Saúde, o Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta que, associada uma rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento associado ao uso de plantas medicinais, tem o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2007)

A atividade biológica de plantas medicinais tem sido objeto de intensa investigação científica. Plantas superiores e aromáticas são amplamente utilizadas na medicina popular,

uma vez que apresentam um amplo espectro de atividade e inibição comprovada contra bactérias e fungos. A maioria dessas propriedades é conferida por produtos do metabolismo secundário como terpenóides e compostos fenólicos, que também na forma pura exibem atividade (DUARTE et al., 2004). Os flavonóides são descritos principalmente pela sua ação antiinflamatória (SALDANHA, et al., 2013). Ainda, exibem uma grande variedade de efeitos biológicos como: antibacterianos, antialérgicos, vasodilatores, e inibem tanto a agregação plaquetária como à permeabilidade e fragilidade capilar (OLIVEIRA, FERRERIA & TOMA., 2010). Taninos ajudam no tratamento da hipertensão arterial, queimaduras, bactericida, fungicida (SILVA et al., 2010). As saponinas estão ligadas a atividade fitoprotetora contra agentes antimicrobianos, assim como insetos (WINA, 2005). Os alcaloides teriam função mais relacionada a síntese de proteínas e proteção contra insetos.

Os objetivos deste estudo foram selecionar, partindo de informações contidas em investigações etnográficas, plantas com potencial atividade antilevedura, e avaliar a atividade antimicrobiana confrontado as formas decocto e extrato hidroalcoólico hidratados com cepa padrão de *Candida albicans*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção das plantas

A seleção de espécies vegetais com potencial antimicrobiano/biocida antifúngico foi realizada através do banco de dados já existente no Grupo de Pesquisa/CNPq: Medicina Veterinária Preventiva/Saúde Pública, da UFRGS, baseado em pesquisas qualitativas em Etnomedicina Veterinária. Outra fonte foram as pesquisas etnográficas e etnobotânicas realizadas em instituições de pesquisa no estado do Rio Grande do Sul, tais como trabalhos de conclusão de curso (TCC) de graduação e especialização, dissertações e teses, além de artigos publicados em periódicos. Nesta etapa foram selecionadas as plantas cuja descrição de indicação pudesse ter alguma relação com seu potencial antimicrobiano, com citações de uso como: “feridas, problemas na pele, micose, antibiótico, infecção”

2.2 Colheita e Identificação das Plantas

As plantas escolhidas foram adquiridas de produtores agroecológicos (cultivo em sistema de permacultura) e elaboradas exsiccatas (orientando-se sua confecção conforme Ming, 1996). Realizada a identificação e taxonomia, foram depositadas no Herbário do Instituto de Biociências da UFRGS/Departamento de Botânica, recebendo número do ICN.

2.3 Triagem da atividade antimicrobiana

A levedura teste foi *Candida albicans* ATCC 14053. As formas galênicas de decocto e extrato de maceração hidroalcolica, na proporção planta : volume de 5 g : 100 mL, reconstituídos por hidratação ao volume inicial (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1959; LIBERALLI, 1972). O método foi o de diluição, pelo teste de suspensão quantitativa da atividade fungicida e leveduricida de desinfetantes e antissépticos (BRITISH STANDARD, 2006).

O decocto foi preparado tendo como referência a técnica da Farmacopéia Brasileira (1959), com modificações (Avancini, 2002). A decocção foi processada em frasco Erlenmayer, com oclusão da abertura, cocção em fogo brando por 15 minutos contados a partir do início da fervura, repondo-se (água destilada estéril) assepticamente o volume inicial evaporado durante o processo. A maceração hidroetanolica (etílica a 70° GL) foi armazenada por 30 dias. A evaporação do álcool foi procedida à temperatura de 60 °C, sob vácuo, em aparelho evaporador rotativo, repondo-se o volume inicial com água destilada estéril

As amostras de levedura, após cultivo de 24 horas em meio ASD a 34 °C foram suspensas em salina a 0,85% estéril, formando a partir da escala 0,5 da escala de McFarland, um inóculo de 1 a 5 x 10⁶ UFC/ml.

A partir do inóculo inicial foram realizadas diluições em escala logarítmica para inoculação em meio ASD e confirmação da UFC/ml através do cultivo em placa. Um (1)

mL do inóculo inicial e de duas diluições logarítmicas sucessivas (10^5 e 10^4 UFC/ml UFC/mL) foram confrontadas a 9 mL do decocto e do extrato reconstituído da maceração hidroetanólica. Após os tempos estipulados de uma e 24 horas, 1 mL da solução foi incorporado a 9 mL de caldo Sabouraud com agentes neutralizadores (3% de polisorbato 80, 0,3% de lecitina e 0,1 % de histidina) por cinco minutos. Depois, para leitura quantitativa de unidades formadoras de colônia viáveis, procederam-se três diluições em base decimal em 9 ml de Caldo Sabouraud e inoculação de 0,1 mL de cada diluição, em duplicata, em placas de Petri contendo meio ASD. A incubação ocorreu a 34 °C, por 24 a 72 horas .

Paralelamente a estas etapas, alíquotas do decoto e do extrato hidratado hidroalcolico foram inoculados em placas com meio ASD para controle de contaminação negativa, assim como a suspensão de leveduras para controle de positivo de crescimento.

2.4 Avaliação fitoquímica

A análise fitoquímica do extrato hidratado da maceração hidroalcolica das plantas foi realizado conforme BRASIL (2010) e SIMÕES *et al.*, (2004). Adequação foi necessária tendo em vista que a técnica referenciada utiliza a planta para análise e em nosso trabalho utilizou-se o extrato hidratado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de plantas

Após a pesquisa dos artigos, monografias, dissertações e teses, foram escolhidas para a etapa de triagem, as plantas que pareceram ter maior relação com o potencial antifúngico segundo critérios estabelecidos como indicativos etnográficos de infecções e feridas em pele, lavagem, ou mesmo a utilização da citação “micose”. Para os indicativos: ferida, doença de pele e infecção que apresentam grande representatividade nas citações optou-se por usar as plantas com maior quantidade de citações ou que tivessem um indicativo cuja relevância fosse relacionada ao uso para fungos. Exceção foi *Cyperus*

brevifolius, que tendo indicação de “lavagem (genitais) em mulheres” (AVANCINI, 2002) poderia nos indicar uma ação frente a quadros de candidíase e, possivelmente por *Candida albicans*. Foram selecionadas as plantas

3.3.1 - *Achyrocline satureioides* DC. - Asteraceae (ICN 192145). Denominação popular: "macela" ou "marcela"; indicação de uso: feridas; parte usada: inflorescências (AVANCINI, 2002; BATTIST e GARLET, 2013; CASAGRANDE, 2009; CEOLIN, 2009; BALDAUF, *et al.*, 2009; GARLET, 2000; KOCH, 2000; LIMA, *et al.*, 2003; POSSAMAI, 2000; SEBOLD, 2003; SIMÕES 1989; SOARES, *et al.*, 2004; REGNET; HEFLER, 2013; SCHWAMBACH, 2007; SOUZA, 2003; VENDRUSCOLO, 2004).

3.1.2- *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae (ICN 192147). Denominação popular: "carqueja "; indicação de uso: feridas, pele; parte usada: aéreas.(AVANCINI, 2002; GARLET, 2013; BALDAUF, *et al.*, 2009; CASAGRANDE, 2009; CEOLIN, 2009; BALDAUF, *et al.*, 2009; GARLET, 2000; LIMA, *et al.*, 2003; POSSAMAI, 2000; SEBOLD, 2003; SIMÕES 1989;; SOARES, *et al.*, 2004; VENDRUSCOLO, 2004).

3.1.3- *Bidens pilosa* L. Asteraceae (ICN 176250). Denominação popular: "picão-preto"; indicação de uso: feridas, /micose; parte usada: aéreas.(AVANCINI, 2002; BATTIST; GARLET, 2013; CASAGRANDE, 2009; CEOLIN, 2009; BALDAUF, *et al.*, 2009; GARLET, 2000; LIMA, *et al.*, 2003; SEBOLD, 2003; SOARES, *et al.*, 2004; SOUZA, 2003).

3.1.4- *Chaptalia nutans* (L.) Pol. Asteraceae (ICN 192146). Denominação popular: "língua-de-vaca"; indicação de uso: dermatose, pele; parte usada: folhas.(AVANCINI, 2002; CASAGRANDE, 2009; BALDAUF, *et al.*, 2009; GARLET, 2000; LIMA, *et al.*, 2003; SEBOLD, 2003; SOARES, *et al.*, 2004; SCHWAMBACH, 2007).

3.1.5- *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk Cyperaceae (ICN 192145). Denominação popular: "sulfa"; indicação de uso: lavagem em corrimento de mulheres; parte usada: aéreas.(AVANCINI, 2002; SEBOLD, 2003)

3.1.6 - *Cyperus ferox* Vahl Cyperaceae (ICN 192151). Denominação popular: "pinheirinho"; indicação de uso: feridas de pele; parte usada: aéreas.(AVANCINI, 2002; SEBOLD, 2003)

3.1.7 - *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch Celastraceae. Denominação popular: "espinheira santa"; indicação de uso: feridas, afecções pele; parte usada: folhas. (AVANCINI, 2002; CASAGRANDE, 2009; CEOLIN, 2009; KOCH, 2000; LIMA, *et al.*, 2003; SIMÕES 1989; SOARES, *et al.*, 2004; VENDRUSCOLO, 2004).

3.1.8 - *Polygonum punctatum* Elliot Polygonaceae (ICN 192148). Denominação popular: "Erva-de-bicho"; indicação de uso: feridas, séptica; parte usada: aéreas.(BATTIST; GARLET, 2013; CASAGRANDE, 2009; BALDAUF, *et al.*, 2009; GARLET, 2000; POSSAMAI, 2000; SEBOLD, 2003; SIMÕES 1989; SOARES, *et al.*, 2004; VENDRUSCOLO, 2004).

3.2 Testes de Triagem

A forma decoto de todas as plantas não promoveu redução logarítmica frente às densidades populacionais em nenhum dos tempos de contato, como pode ser observado na Tabela 1. Os resultados para a forma extrato reconstituído de maceração hidroetanólica também podem ser vistos nessa Tabela.

Tabela 1. Triagem da capacidade de redução da densidade populacional inicial ou de inativação do decocto e do extrato hidroetanólico reidratados de plantas, frente *Candida albicans* ATCC 14053, avaliadas pelo teste de suspensão quantitativo.

Plantas	TC (h)	Decoto			Extrato		
		DP em UFC/mL			DP em UFC/mL		
		10^5	10^4	10^3	10^5	10^4	10^3
1	1	$2,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	2×10^3	< 1	< 1	< 1
	24	8×10^5	1×10^4	1×10^3	< 1	< 1	< 1
2	1	$1,4 \times 10^5$	2×10^4	$1,1 \times 10^3$	$6,3 \times 10^5$	8×10^4	1×10^3
	24	$1,7 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$	$1,7 \times 10^5$	1×10^4	1×10^3
3	1	$1,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	3×10^3	$6,8 \times 10^5$	4*	1*
	24	$1,2 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$	$2,7 \times 10^3$	< 1	< 1	< 1
4	1	$1,3 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	$8,6 \times 10^4$	10^3	$3,5 \times 10^3$
	24	$2,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	$9,3 \times 10^3$	1×10^4	1×10^3	$9,5 \times 10^3$
5	1	$2,8 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$	2×10^3	1×10^5	1×10^4	1×10^3
	24	2×10^5	$2,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	3×10^4	< 1	< 1
6	1	$1,4 \times 10^5$	2×10^4	1×10^3	$1,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	1*
	24	$1,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$	1×10^3	< 1	< 1	< 1
7	1	$9,4 \times 10^5$	8×10^4	3×10^3	$1,2 \times 10^5$	2×10^4	1*
	24	$1,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$	3*
8	1	$1,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	1×10^3	$9,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	1*
	24	$1,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	1×10^5	1×10^4	< 1

DP: Densidade Populacional; TC: Tempo de contato; 1: *Achyrocline satureioides*; 2: *Baccharis trimera*; 3: *Bidens pilosa*; 4: *Chaptalia nutans*; 5: *Cyperus brevifolius*; 6: *Cyperus ferox*; 7: *Maytenus ilicifolia*; 8: *Polygonum punctatum*; * = colônia/0,1 mL ; < 1 = inativação

A avaliação fitoquímica qualitativa demonstrou que todas as oito plantas apresentaram compostos fenólicos. Os taninos e taninos condensados só não foram encontrados na *Maytenus ilicifolia*, que foi a única que apresentou saponinas, assim como *Baccharis trimera* foi a única a apresentar cumarinas, e a *Bidens pilosa*, antraquinonas. Os flavonóis foram positivos apenas na *Achyrocline satureioides* e *Polygonum punctatum*.

A atividade antifúngica de extratos e decoctos também despertou interesse de pesquisadores como Schuch *et al.*, (2008) ao estudarem a ação de cinco plantas (*Baccharis trimera*, *Bidens pilosa*, *Eucalyptus* spp, *Polygonum punctatum* e *Tagets minuta*) frente a dermatófitos de interesse humano e veterinário. Encontrando ação antifúngica em todas as plantas na forma de extrato hidroetanólico, enquanto na forma de decoto apenas duas plantas apresentaram a ação antimicrobiana frente aos fungos estudados. Em nosso trabalho tanto o decoto quanto a EH foram confeccionados com metade da concentração utilizada por Schuch *et al.*, (2008) e ao trabalhar com leveduras não obtivemos ação antimicrobiana com a decocção da planta, no entanto com a EH na concentração 5g:100mL a ação desinfetante pode ser observada tanto com inativação quanto com redução populacional das doses infectantes.

Conforme Vasconcellos *et al.* (2009), a *Bidens pilosa* apresenta indicativo etnográfico para lavagem em mulheres, o que também foi apontado por Avancini (2002) sobre os relatos da ação de *Cyperus brevifolium*, o que vai ao encontro dos resultados obtidos em nosso experimento onde tivemos diminuição da densidade populacional e inativação de *Candida albicans* ATCC 14053 quando confrontada com o EH, sendo no entanto a ação da *B. pilosa* já observada na primeira hora de contato.

4 CONCLUSÃO

Concluiu-se que das 8 plantas selecionadas, seis promoveram ação de inativação ou redução na densidade populacional do inóculo padrão.

O decocto de nenhuma das plantas promoveu a atividade, o mesmo ocorrendo com o EH de *Bacharis trimera* e *Chaptalia nutans*. O EH de *Achyrocline satureioides* inativou as três densidades populacionais na primeira hora de contato, a *Bidens pilosa* e a *Cyperus ferox* na leitura das 24 h, tendo a *Cyperus brevifolius* inativado as duas menores densidades populacionais e a *Polygonum punctatum* a menor densidade também na leitura das 24 h. A *Maytenus ilicifolia* apenas reduziu a menor densidade populacional do inóculo.

Suporte financeiro:

Editais MCT/CNPq/MEC/CAPES/CT AGRO/CT HIDRO/FAPS/EMBRAPA N° 22/2010 – Redes Nacionais de Pesquisa em Agrobiodiversidade e Sustentabilidade Agropecuária - REPENSA. Projeto: Rede interinstitucional da cadeia produtiva do leite agroecológico

REFERÊNCIAS

AVANCINI, César A. M. **Saneamento Aplicado em Saúde e Produção Animal: Etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum* cham. E schlecht-Hypericaceae (guttiferae) - (escadinha/ sinapismo) para uso como desinfetante e antisséptico**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, na especialidade de Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

AVANCINI, C.A.M. & WIEST, J.M. Etnomedicina veterinária, etnonosotaxia e etnoterapêutica de doenças de pele como referência para seleção e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 10(1):21-28, 2008.

BALDAUF, F.C.; KUBO, R.R.; SILVA, F. & IRGANG, B.E. “Ferveu, queimou o ser da erva”: conhecimentos de especialistas locais sobre plantas medicinais na região Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 11(3):282-291, 2009.

BATTISTI, C.; GARLET, T.M.B.; ESSI, L.; HORBACH, R.K.; ANDRADE, A. & BADKE, M.R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. 11(3): 338-348, 2013.

BRASIL. **Decreto nº 5.813**, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova regulamento técnico para produtos saneantes com ação antimicrobiana harmonizado no âmbito do MERCOSUL através da resolução GMC n.50/06. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 5 mar. 2007, Seção 1, p. 29. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a450e9004ba03d47b973bbaf8fded4db/RDC+14_2_007.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 20 mar. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies**. Brasília: ANVISA, 2010. 120 p.

Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4ec6a200474592fa9b32df3fbc4c6735/Manual+Limpeza+e+Desinfeccao+WEB.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRITISH STANDARD. The European Standard EN 1040:2005 has. **Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative - suspension test for the evaluation of fungicidal or yesticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area – test method and requeriments (phase 2, step 1)**. 2006.

CAMPOS, F.L.; BOTH, J.M.C.;MACIEL,M.J. & AVANCINI, C.A.M.. Atividade desinfetante in vitro de extrações de *achyrocline satureioides* dc. asteraceae (macela) sobre *candida albicans* padrão. III Simpósio de Sustentabilidade & Ciência Animal, Pirassununga, 21-22 de agosto. **Anais**. 2013. Disponível em: <http://www.sisca.com.br/anais.php> . Acesso em 10/04/2014

CEOLIN, T. Conhecimento sobre plantas medicinais entre agricultores de Base ecológica da região do sul do rio grande do sul. 2009. 108f. Dissertação - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

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

COMPANY, Z.T. **Os Salvadores das garras da morte: medicamentos populares, medicina humoral em Bom Jesus/RS (1898-1927)**. Dissertação (Mestre em História). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006.

CRUZ, L.C.H. Micologia veterinária. Seropédica-RJ, 1998. 202p.

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

FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.ed.,São Paulo: Siqueira, 1959.

GARLET, T.M.B. **Levantamento das plantas medicinais utilizadas no município de Cruz Alta, RS, Brasil**. Dissertação(Mestrado em Botânica) Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2000

GALVANI, F.R. & BAPTISTA, L.R.M. flora do Parque Estadual do Espinilho – Barra do Quaraí /RS. **Revista da FZVA Uruguaiana**. 10(1):42-62, 2003.

JUNIOR, E.A.W. **Mastite bovina: avaliação microbiológica do leite, com ênfase nas leveduras isoladas de casos de mastite clínica e subclínica, na região do Planalto Médio, RS em 2005 e 2006**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

KOCH, V. **Estudo etnobotânico das plantas medicinais na cultura italo-brasileira no Rio Grande do Sul um modelo para o cultivo comercial na agricultura familiar.**

Dissertação (Mestrado em fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

LADEIRA, S.R.L. Mastite bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A. & BORGES, J.R. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. Santa Maria: Pallotti, 2007, v.2, p.359-372.

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

LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**. 2ª Edição. Nova Odesa-SP, 2008, 544p.

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

MENTZ, L.A., LUTZEMBERGER, L.C., SCHENKEL, E.P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'Avila (1910). **Caderno de Farmácia**, 13(1):25-48, 1997.

MING, L. C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. **Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. p. 69-86.

OLIVERIA, C.; FERRERIA, J.A. & TOMA, M.A. Análise fitoquímica preliminar do extrato etanólico obtido a partir do rizoma da *typha domingensis pers*. **Revista Ceciliana**. 2(2): 17-19, 2010.

POSSAMAI, R.M. **Levantamento etnobotânico das plantas de uso medicinal em Mariana Pimentel, RS**. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

REGNET, R.A.; HEFLER, S.M. levantamento etnobotânico e etnofarmacológico de plantas utilizadas na medicina popular no município do Rio Grande, RS, Brasil: etapa comunidade Ilha do Leonídeo. XXII Congresso de Iniciação científica da Universidade Federal de Pelotas, 18-22 de novembro. **Anais**. 2003. Disponível em: <http://www2.ufpel.edu.br/cic/2013/?sec=anais>. Acessado em 15/01/2014.

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

SALDANHA, A.A.; CARMO, L.F.; SIQUEIRA, J.M.; CASTRO, A.H.F.; MATOS, N.A., KLEIN, A. & SOARES, A.C. Análise fitoquímica preliminar e avaliação do possível efeito antiinflamatório da fração enriquecida em flavonóides de *Byrsonima verbascifolia* (malpighiaceae). **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**. 2(2):89-91, 2013.

SCHUCH, L.F.D.; WIEST, J.M.; GARCIA, E.N.; PRESTES, L.S.; SCHRAMM, R.C.; COIMBRA, H. & MEIRELES, M.C.A. Atividade antifúngica de extratos de plantas utilizados por agricultores familiares como antimicrobiano. **Acta Scientiae Veterinariae**, 36(3): 267-271, 2008.

SCHWAMBACH, K.H. **Utilização de plantas medicinais e medicamentos no autocuidado no município de Teutônia**. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SEBOLD, D.F. **Levantamento etnobotânico de plantas de uso medicinal no município de Campo Bom, Rio Grande do Sul, Brasil**. (Dissertação de mestrado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A. & CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**. 6(2):1-17,2010.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1989. 174 p.

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

SOUZA, G.C. **Extrativismo em área de reserva da Mata Atlântica do Rio Grande do Sul: um estudo etnobiológico em Maquiné**. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E.M.C.; SANTÚRIO, J.M. & FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, 39(1):282-290, 2009.

TYLER, J.W. & CULLOR, J.S. Sanidade e distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B.P. Medicina interna de grandes animais. Barueri-SP: Manole, 2006.p.1019-1037.

VASCONCELLOS, C; KECK, R.M.; CEOLIN, T.; BARBIERI, RL.; BORGES, A.M.; MUNIZ, L.C. & COSTA, N.R. Plantas medicinais utilizadas na saúde da mulher no Brasil. **Horizonte Enfermagem**. 22(1): 23-33, 2011.

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

VENDRUSCOLO, G.S. **Estudo etnobotânico das plantas utilizada como medicinais por moradores no bairro de Ponta Grossa, Porto Alegre, RS.** Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

ARTIGO 3

Atividade antimicrobiana/desinfetante de extrato hidratado de maceração hidroetanólica de *Achyrocline satureioides* DC. - Asteracea (“macela”), sobre *Candida albicans* padrão e leveduras isoladas em situações-problema de mastite bovina

Disinfectant and antimicrobial activity of hydrated hydroethanolic extract of *Achyrocline satureioides* (lam.) dc. (asteraceae) ("macela") against standard *Candida albicans* and yeasts isolated from bovine mastitis

CAMPOS, Felipe Lopes¹; Ferreira, Laerte², Valente, Patricia³, Da SILVA, Bárbara Parraga⁴;
ETHUR, Eduardo Miranda⁵ & AVANICNI, César Augusto Marchionatti²

¹ PPGCV-UFRGS, DDA/SEAPA-RS; ² Professor Associado, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva –UFRGS; ³ Professor Associado, Departamento de Microbiologia – UFRGS; ⁴ Discente de iniciação científica – Centro Universitário UNIVATES; ⁵ Professor Adjunto, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas - UNIVATES

Resumo

A mastite bovina causada por leveduras, assim como por agentes bacterianos, na sua gestão sanitária necessita de procedimentos adotados no corpo do animal e também a ação sobre os agentes morbígenos quando em vida livre. Relatos sobre a resistência de microrganismos a antibióticos e desinfetantes convencionais, o custo desses fármacos, bem como a necessidade de validação de insumos veterinários considerados sustentáveis para que possam ser usados em substituição ou em complementaridade aos produtos convencionais nos sistemas de produção animal agroecológicos e orgânicos, motivaram essa pesquisa. O extrato hidroetanólico hidratado (p:v de 5g 100 mL⁻¹) de *Achyrocline satureioides* confrontou cepa de *Candida albicans* ATCC 14053 e isolados em situações-problema de mastite bovina: 21 de *Candida krusei*, nove de *Candida rugosa* e um de *Candia albicans*, em três densidades populacionais (10⁵, 10⁴ e 10³ UFC mL⁻¹). O método foi o de diluição, pelo teste de suspensão quantitativa da atividade fungicida e leveduricida de desinfetantes e antissépticos, nos tempos de contato de 15 e 30 minutos e de uma até 12 horas. Tomando como referência a densidade populacional 10⁵ UFC mL⁻¹, aos 30 min de contato, da cepa padrão restou apenas 1 UFC e a uma hora, nenhuma. O isolado desta espécie estava inativado na leitura das três

horas. Dos 21 isolados de *C. krusei* apenas um não estava inativado em meia hora de contato, o que aconteceu na 1 hora. Das *C. rugosa* um inativado à uma hora, seis às quatro horas e dois precisaram de mais tempo, 9 e 10 h respectivamente. Todos os inóculos foram inativados pelo extrato hidratado. As evidências mostram que, além da densidade populacional de confronto, características intrínsecas das espécies de *Candida* spp e também de cada isolado individualmente interferiram no tempo necessário para que a ação fosse promovida.

Palavras-chave: Macela, *Achyrocline satureioides*, maceração hidroalcoólica, *Candida albicans*

Abstract

Bovine mastitis caused by yeasts, as well as bacterial mastitis, in its health management, needs procedures adopted in animal body and action against free-living morbid agents. Reports of resistance in microorganisms to antibiotics and conventional disinfectants, the cost of these drugs and the demand for validation of veterinary inputs considered sustainable to be used to replace or complement the conventional products in organic and agroecological livestock production systems motivated this research. The hydroethanolic extract of *Achyrocline satureioides* (5 g 100 mL⁻¹) was confronted with *Candida albicans* ATCC and *Candida* spp strains isolated from bovine mastitis cases (21 isolates of *Candida krusei*, nine isolates of *Candida rugosa* and one isolate of *Candida albicans*) in three population densities (10⁵, 10⁴ e 10³ UFC mL⁻¹). The method used was dilution by the quantitative suspension test for fungicidal and yeastocidal activity of chemical disinfectants and antiseptics, in a contact time of 15 and 30 minutes and of 1 hour until 12 hour. As the population density of the initial inoculum was 10⁵ UFC mL⁻¹, after 30 min of contact, remained just 1 UFC of standard strain and after 1 h of contact, no colony was observed. The *Candida* isolates were inactivated after 3 h of contact. Of 21 isolates of *C. krusei* just one was not inactivated in 30 minutes of contact. This inactivation occurred after 1 h. Of nine isolates of *C. rugosa*, one was inactivated in 1h, six in 4 h and two of them needed more time of contact, 9 h and 10 h, respectively. All inocula were inactivated to hydrated extract. Evidences show that besides of confronted population density, intrinsic characteristics of *Candida* spp and also of each isolate individually interfered in the required time for the action to be promoted.

Introdução

A mastite bovina causada por leveduras e fungos filamentosos pode ser considerada epidemiologicamente como enfermidade emergente, sendo os principais gêneros envolvidos *Candida* spp e *Cryptococcus* spp, além de *Geotrichum* spp, *Pichia* spp e *Trichosporum* spp (CRUZ, 1998; JONES, HUNT & KING, 2000; SPANABERG, et al, 2009). Observou-se um aumento na incidência a partir das décadas de 50 e 60 com o advento da antibioticoterapia antibacteriana (JUNIOR, 2007). Assim como para agentes causais bacterianos, a sua gestão sanitária necessita de procedimentos adotados no corpo do animal, através das terapias com antibióticos, e também a ação sobre os agentes morbígenos quando em vida livre.

No entanto, a implantação de programas sanitários frequentemente enfrenta limitações como custo ou mesmo resistências de agentes causais aos produtos comerciais (CHAPMANN, 1998). Também os sistemas tecnológicos de criação animal referenciados nos modelos agroecológico e orgânico sofrem limitações com a carência de investigações científicas que deem segurança aos sanitaristas para que insumos veterinários considerados sustentáveis sejam usados em substituição ou em complementaridade aos produtos convencionais (CAMPOS et al., 2013).

A *Achyrocline. saturoioides* ("macela") é uma planta nativa no Rio Grande do Sul (LORENZI & MATOS, 2008), tradicionalmente considerada medicinal, sendo relatada por investigações científicas com ação anti-inflamatória, antiespasmódica, analgésica e sedativa dos extratos das inflorescências, das folhas e caules. Tais estudos mostraram também que os extratos testados não apresentaram toxicidade excessiva (SIMÕES et al., 1989). A planta foi selecionada para, nessa investigação, avaliar sua atividade antimicrobiana baseada em pesquisa etnográfica - etnomedicina veterinária - realizado por, Avancini (2002), Avancini e Wiest (2008) tendo teste de triagem (*screaming*) evidenciado sua atividade frente bactérias de referência e isolados de campo (BOTH et al., 2011; SPEROTTO et al., 2012; OLIVEIRA, 2012)

O objetivo deste trabalho foi o de verificar quantitativamente a atividade bioativa antimicrobiana/desinfetante da solução extrato hidroalcoólico hidratado de *A. saturoioides* sobre *Candida albicans* padrão e leveduras isoladas em situação-problema de mastite bovina.

Material e métodos

O experimento foi realizado com cepa de *Candida albicans* ATCC 14053, e isolados de *Candida* spp a partir de 174 amostras leites oriundos de coletas realizadas por médicos veterinários do serviço oficial de sanidade animal do estado do Rio Grande do sul, assim como de amostras de

leites recebidas para diagnóstico no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Após o isolamento, a identificação foi feita no Laboratório de Leveduras do Instituto de Biociências e no Laboratório de Micologia Veterinária da Faculdade de Veterinária, ambos da UFRGS. Dos isolamentos foram selecionados 21 *Candida krusei*, nove *Candida rugosa* e uma *Candida albicans*, garantindo-se o critério de serem as espécies isoladas de leite de propriedades diferentes.

Os isolados ficaram armazenados congelados (-20 °C) em meio de cultura e glicerol. Foram reativados para cada teste em caldo Sabouraud Dextrose e incubados a 34 °C por 24h. Após, retiraram-se alíquotas para esgotamento em Agar Sabouraud Dextrose (ASD) e novamente incubados a 34 °C por 24h quando então foram suspensas em salina a 0,85 % estéril, formando a partir da escala 0,5 da escala de McFarland, um inóculo de 1 a 5×10^6 UFCmL⁻¹ que foi submetido a mais duas diluições logarítmicas.

A planta foi adquirida de produtor agroecológico (cultivo em sistema de permacultura), e elaborada exsiccata (orientando-se sua confecção conforme Ming, 1996). Realizada a identificação e taxonomia, foi depositada no Herbário do Instituto de Biociências da UFRGS/Departamento de Botânica como *Achyrocline satureioides* DC. - Asteraceae - ICN 192145. A parte usada foram as inflorescências.

A maceração hidroalcoólica (etífica a 70° GL) foi preparada na proporção (p : v) 5 g : 100 mL e armazenada por 30 dias. A evaporação do álcool (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1959; LIBERALLI, 1972) foi procedida à temperatura de 60 °C, sob baixa pressão em aparelho evaporador rotativo a vácuo, repondo-se o volume inicial com água destilada estéril, formando o extrato hidroalcoólico hidratado (EH).

O método foi o de diluição, pelo teste de suspensão quantitativa da atividade fungicida e leveduricida de desinfetantes e antissépticos (BRITISH STANDARD, 2006) confrontando os inóculos nos tempos de contato de 15 e 30 minutos, e de uma até 12 horas. Para a *Candida* padrão, procedeu-se paralelamente testes com 50% da concentração do extrato.

Um (1) mL do inóculo na densidade populacional inicial e de duas diluições logarítmicas sucessivas foram confrontadas com 9 mL do extrato hidratado. Após os tempos de contato estipulados, 1 mL da solução foi acrescentado a 9 mL de solução neutralizante (3% de polisorbato 80, 0,3% de lecitina e 0,1% de histidina) por cinco minutos. Para a observação quantitativa foram realizadas três diluições em base decimal em 9 mL de Caldo Sabouraud, inoculando 0,1 mL de cada

diluição, em duplicata, em ASD, para contagem de UFCmL⁻¹. Com a cepa padrão de *Candida albicans* foi realizado paralelamente teste com o extrato hidratado na proporção 2,5 g : 100 mL.

A análise fitoquímica qualitativa do extrato hidratado foi realizado (laboratório de química do Centro Universitário UNIVATES) conforme BRASIL (2010) e Simões, et al., (2004), com alterações, tendo em vista que as referências preconizam a utilização da planta de forma que foram necessárias adaptações para avaliação do extrato.

Resultado e discussão

A escolha do método de suspensão quantitativo do CEN - Comitê Europeu de Padronização para avaliar a atividade antimicrobiana do EH da *A. saturoioides*, deu-se em função da sua capacidade de proporcionar um maior número de informações sobre a sua atividade, não apenas desinfetante, mas qualquer atividade antimicrobiana.

A ação do extrato hidroetanólico hidratado *Achyrocline saturoioides* (5 g : 100 mL⁻¹ e 2,5 g : 100 mL⁻¹) sobre a cepa padrão de *Candida albicans* pode ser observado na Tabela 1. A menor das densidades populacionais foi inativada aos 15 minutos de contato quando confrontada com as duas concentrações. Já a DP de 10⁵ apresentou redução de duas unidades logarítmicas aos 15 minutos de contato sendo totalmente inativado aos 60 minutos na proporção 5 g 100 mL⁻¹ ao passo que a metade desta concentração promoveu redução de uma unidade logarítmica aos 15 minutos, sendo a DP 10⁵ inativada após quatro horas de contato. Com a DP 10⁴ foi observada redução logarítmica nos primeiros 15 minutos em ambas as concentrações sendo três unidades na maior concentração e uma na menor, no entanto, os tempos de inativação desta DP diferiram em uma hora e trinta minutos.

Tabela 1 – Unidades formadoras de colônia viáveis (UFC) ou inativação total de *Candida albicans* padrão promovido pelo extrato hidroetanólico hidratado *Achyrocline satureioides* (5g 100 mL⁻¹ e 2,5g 100 mL⁻¹), usando teste de suspensão quantitativo.

Concentração	DP	Tempo de Contato						
		15 min	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
5 g 100 mL ⁻¹	10 ⁵	10 ³	10 ²	< 1	-	-	-	-
	10 ⁴	10	< 1	-	-	-	-	-
	10 ³	< 1	-	-	-	-	-	-
2,5 g 100 mL ⁻¹	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ³	10 ³	10 ²	< 1	-
	10 ⁴	10 ³	10 ³	10 ²	< 1	-	-	-
	10 ³	< 1	-	-	-	-	-	-

DP: Densidade Populacional de confronto (UFC mL⁻¹), < 1=inativação

Os resultados da ação da macela sobre a cepa padrão e os isolados “de campo” podem ser observados nas Tabelas 2,3 e 4. Tanto a *Candida albicans* padrão quanto o isolado da mesma espécie apresentaram redução da densidade populacional (DP) nos primeiros 15 minutos, sendo o isolado de campo inativado neste tempo na DP 10³ UFCmL⁻¹. Ainda assim, a cepa padrão em uma hora já apresentava inativação de todas as DP, ao passo para *C. albicans* isolada a totalidade de inativação se deu em uma hora com a DP 10⁴ e de três horas na 10⁵ UFCmL⁻¹.

Os 21 isolados de *C. krusei* apresentaram a inativação de todas as DP no tempo máximo de uma hora de contato, ressaltando que na DP 10³ esse tempo foi de 15 minutos e na DP 10⁴, neste mesmo tempo, 20 isolados já tinham diminuído quatro unidades logarítmicas. A redução de *C. krusei* apesar de ter utilizado o tempo de uma hora de contato com o EH para inativar os isolados, teve em sua maior DP diminuição de 2 unidades logarítmicas em 18 isolados nos primeiros 15 minutos

Tabela 2 –Unidades formadoras de colônia viáveis (UFC) ou inativação total de *Candida albicans* padrão e isolado de mastite bovina promovido pelo extrato hidroetanólico hidratado de *Achyrocline satureioides* (5g100 mL⁻¹), usando teste de suspensão quantitativa.

Cepa	DP UFCmL ⁻¹	Tempo de contato e UFC viáveis				
		15 min	30 min	1 h	2 h	3 h
ATCC 14053	10 ⁵	10 ³	10 ²	< 1		
	10 ⁴	12	< 1	< 1		
	10 ³	< 1	< 1			
<i>Candida albicans</i> (n=1)	10 ⁵	10 ³	10 ³	10 ³	11	< 1
	10 ⁴	3	4	< 1		
	10 ³	< 1				

DP: Densidade Populacional de confronto (UFCmL⁻¹); < 1 = inativação.

Tabela 3 Número de isolados de *Candida krusei* (N=21) com redução de unidades logarítmicas ou inativados pelo extrato hidroetanólico hidratado de *Achyrocline satureioides* (5 g 100 mL⁻¹), usando teste de suspensão quantitativo.

DP	Redução logarítmica	Tempo de Contato		
		15 min	30 min	1h
10 ⁵	Nenhuma	-	-	-
	1	-	-	-
	2	18	14	-
	3	-	-	-
	4	-	-	-
	5	3	7	21
10 ⁴	Nenhuma	-	-	-
	1	1	1	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	20	20	21
10 ³	Nenhuma	-	-	-
	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	21	-	-

DP: Densidade Populacional de confronto (UFCmL⁻¹)

Tabela 4 –Número de isolados de *Candida rugosa* (N=9) com redução de unidades logarítmicas ou inativados pelo extrato hidroetanólico hidratado de *Achyrocline satureioides* (5 g 100 mL⁻¹), usando teste de suspensão quantitativo.

DP UFCmL ⁻¹	Redução logarítma	Tempo de Contato											
		15 min	30 min	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h
10 ⁵	Nenhuma	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	4	9	9	6	2	2	1	1	1	-	-	-
	2	-	-	-	3	5	-	1	1	1	2	1	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inativados	-	-	-	-	2	7	7	7	7	7	7	8
10 ⁴	Nenhuma	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	8	8	8	6	2	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inativados	-	-	-	2	7	9	-	-	-	-	-	-
10 ³	Nenhuma	5	5	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inativados	4	4	8	8	9	-	-	-	-	-	-	-

DP: Densidade Populacional de confronto (UFC/mL)

O screening fitoquímico do extrato hidratado de maceração hidroetanólica de *Achyrocline satureioides* demonstrou a presença de compostos fenólicos, taninos, taninos condensados e flavonóides. Tais compostos são comumente encontrados na macela sendo os flavonóides descritos principalmente pela sua ação antiinflamatória (SALDANHA, et al., 2013) exibindo uma grande variedade de efeitos biológicos como: antibacterianos, antialérgicos, vasodiladores, e inibindo tanto a agregação plaquetária como à permeabilidade e fragilidade capilar (OLIVEIRA, et al., 2010). Taninos que ajudam no tratamento da hipertensão arterial, queimaduras, bactericida, fungicida (SILVA, et al., 2010). A avaliação fitoquímica e a identificação pelo Herbário do Instituto de Biociências da UFRGS, foram importantes para conferir a identidade e qualidade da amostra vegetal e do extrato.

Conclusão

O extrato hidratado obtido da maceração hidroalcoólica de *Achyrocline satureioides*, nas condições empregadas neste experimento, promoveu ação antimicrobiana de redução logarítmica da densidade populacional e de inativação total dos inóculos *Candida albicans* padrão, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. rugosa* isoladas de situações-problema de mastite bovina. As evidências mostram que, além da densidade populacional de confronto, características intrínsecas das espécies de *Candida* e também de cada isolado individualmente interferiram no tempo necessário para que a ação fosse promovida.

Suporte financeiro:

Edital MCT/CNPq/MEC/CAPES/CT AGRO/CT HIDRO/FAPS/EMBRAPA N ° 22/2010 – Redes Nacionais de Pesquisa em Agrobiodiversidade e Sustentabilidade Agropecuária - REPENSA. Projeto: Rede interinstitucional da cadeia produtiva do leite agroecológico

REFERÊNCIAS

AVANCINI, César A. M. *Saneamento Aplicado em Saúde e Produção Animal: Etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *hypericum caprifoliatum* cham. E schlecht- Hypericaceae (guttiferae) - (escadinha/ sinapismo) para*

uso como desinfetante e antisséptico. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, na especialidade de Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

AVANCINI, C.A.M. ; WIEST, J.M. Etnomedicina veterinária, etnonosotaxia e etnoterapêutica de doenças de pele como referência para seleção e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v.10, p.21-28, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies*. Brasília: ANVISA, 2010. 120 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4ec6a200474592fa9b32df3fbc4c6735/Manual+Limpeza+e+Desinfeccao+WEB.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRITISH STANDARD. The European Standard EN 1040:2005 has. *Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative - suspension test for the evaluation of fungicidal or yesticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area – test method and requeriments (phase 2, step 1)*. 2006.

CAMPOS, F.L.; BOTH, J.M.C.; MACIEL, M.J. ; AVANCINI, C.A.M.. atividade desinfetante in vitro de extrações de *achyrocline satureioides* dc. asteraceae (macela) sobre *candida albicans* padrão. III Simpósio de Sustentabilidade & Ciência Animal, Pirassununga, 21-22 de agosto. *Anais*. 2013. Disponível em: <http://www.sisca.com.br/anais.php> . Acesso em 10/04/2014

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

CRUZ, L.C.H. Micologia veterinária. Seropédica-RJ, 1998. 202p.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.ed., São Paulo: Siqueira, 1959.

JONES, T.C, HUNT, R.D. & KING, N.W. *Patologia Veterinária*. 6ª Ed. São Paulo: Manole, 2000, 1415p.

JUNIOR, E.A.W. *Mastite bovina: avaliação microbiológica do leite, com ênfase nas leveduras isoladas de casos de mastite clínica e subclínica, na região do Planalto Médio, RS em 2005 e 2006*. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

LADEIRA, S.R.L. Mastite bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R. *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Santa Maria: Pallotti, 2007, v.2, p.359-372.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil Nativas e Exóticas*. 2ª Edição. Nova Odesa-SP, 2008, 544p.

MING, L. C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. *Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: UNESP, 1996. p. 69-86.

OLIVERIA, C.; FERRERIA, J.A.; TOMA, M.A. Análise fitoquímica preliminar do extrato etanólico obtido a partir do rizoma da *Typha domingensis pers*. *Revista Ceciliana*. v.2(2), p.17-19, 2010.

OLIVERIA, E.A. *Atividade antimicrobiana “in vitro” do decocto de achyrocline satureioides (lam.) d.c. (asteraceae) frente à cepa de referência de interesse em medicina veterinária – staphylococcus aureus atcc 25.923*. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Medicina Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SALDANHA, A.A.; CARMO, L.F.; SIQUEIRA, J.M.; CASTRO, A.H.F.; MATOS, N.A., KLEIN, A.; SOARES, A.C. Análise fitoquímica preliminar e avaliação do possível efeito antiinflamatório da fração enriquecida em flavonóides de *Byrsonima verbascifolia* (malpighiaceae). *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports*. v.2(2), p.89-91, 2013.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*. v.6(2), p.1-17,2010.

SIMÕES, C. M. O. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1989. 174 p.

SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS Editora/ Editora da UFSC. p. 230-239.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E.M.C.; SANTÚRIO, J.M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. *Ciência Rural*. v.39(1), p.282-290, 2009.

SPEROTTO V. R.; MURARI, A. L.; SILVA, D. A. R. DA.; POSSENTI, C. G. R.; WIEST, J. M.; AVANCINI, C. A. M. Atividade do decocto de *Achyrocline satureioides* D.C. (Lam.) - Asteraceae (“macela”) sobre bactérias padrões e isoladas em mastite bovina. *Acta Scientiae Veterinariae*. v.40(3), p.1-7.2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista os casos de mastite de origem micótica e sendo a higiene inadequada uma das portas de entrada das leveduras, associada a práticas de desinfecção ineficientes do ambiente, a atenção nas possíveis fontes de contaminação se faz necessária, e no que tange ao processo de desinfecção, nosso trabalho demonstrou que a atividade leveduricida apresentada pelos antimicrobianos: iodofór e composto quaternário de amônio, nos permite dizer que os dois desinfetantes são adequados para o controle desses agentes no ambiente.

A triagem de plantas consideradas medicinais no Rio Grande do Sul sobre cepa padrão de *Candida albicans*, nos forneceu a possibilidade de avaliar qual apresentou ação desinfetante mais expressiva, e fomentou a necessidade do desenvolvimento de outros experimentos tendo em vista que embora a *Achyrocline satureoides* tenha apresentado ação desinfetante mais acentuada as demais plantas apresentaram reduções populacionais e devem ser avaliadas como possíveis alternativas como agentes antimicrobianos.

Os resultados apresentados neste estudo, quanto à atividade leveduricida da *Achyrocline satureioides*, sobre a cepa padrão de *Candida albicans* e dos isolados de campo, ressaltam a importância da ação desinfetante do extrato hidroetanólico hidratado e sugerem a continuidade de estudos científicos, buscando qualificar o uso desta planta medicinal como barreira sanitária alternativa ou complementar.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. (Ed.). **Zoonoses y enfermedades communes al hombre y a los animales**. 2ª Ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986.989p.

AVANCINI, César A. M. **Saneamento Aplicado em Saúde e Produção Animal: Etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de hipericum caprifoliatum cham. E schlecht-Hypericaceae (guttiferae) - (escadinha/ sinapismo) para uso como desinfetante e antisséptico**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, na especialidade de Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

AVANCINI, C.A.M. & WIEST, J.M. Etnomedicina veterinária, etnonosotaxia e etnoterapêutica de doenças de pele como referência para seleção e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 10(1):21-28, 2008.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M., MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, Carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 52(3), 2000.

BALDAUF, F.C.; KUBO, R.R.; SILVA, F. & IRGANG, B.E. “Ferveu, queimou o ser da erva”: conhecimentos de especialistas locais sobre plantas medicinais na região Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.11 n.3, p282-291, 2009.

BATTISTI, C.; GARLET, T.M.B.; ESSI, L.; HORBACH, R.K.; ANDRADE, A. & BADKE, M.R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. 11(3): 338-348, 2013.

BOTH, J.M.C.; OLIVEIRA, E.A.; MACIEL, M.J.; CAMPOS, F.L.; DEBRES, T. & AVANCINI, C.A.M.. recursos naturais renováveis como insumo sanitário para produção animal agroecológica: atividade de extrações de *Achyrocline satureioides* dc. – asteraceae (“macela”) sobre *staphylococcus aureus* padrão e cepa meticilina resistente (mrsa). III Simpósio de Sustentabilidade & Ciência Animal, Pirassununga, 21-22 de agosto. **Anais**. 2013. Disponível em: <http://www.sisca.com.br/anais.php> . Acesso em 10/04/2014

BRASIL. **Decreto nº 5.813**, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova regulamento técnico para produtos saneantes com ação antimicrobiana harmonizado no âmbito do MERCOSUL através da resolução GMC n.50/06. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 5 mar. 2007, Seção 1, p. 29. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a450e9004ba03d47b973bbaf8fded4db/RDC+14_2_007.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 20 mar. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies**. Brasília: ANVISA, 2010. 120 p. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4ec6a200474592fa9b32df3fbc4c6735/Manual+Limpeza+e+Desinfeccao+WEB.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRITISH STANDARD. The European Standard EN 1040:2005 has. **Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative - suspension test for the evaluation of fungicidal or yesticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area – test method and requeriments (phase 2, step 1)**. 2006.

CAMPOS, F.L.; BOTH, J.M.C.;MACIEL,M.J. & AVANCINI, C.A.M.. atividade desinfetante in vitro de extrações de *achyrocline satureioides* dc. asteraceae (macela) sobre *candida albicans* padrão. III Simpósio de Sustentabilidade & Ciência Animal, Pirassununga, 21-22 de agosto. **Anais**. 2013. Disponível em:
<http://www.sisca.com.br/anais.php> . Acesso em 10/04/2014

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

CEOLIN, T. Conhecimento sobre plantas medicinais entre agricultores de Base ecológica da região do sul do rio grande do sul. 2009. 108f. Dissertação - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

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

COMPANY, Z.T. **Os Salvadores das garras da morte: medicamentos populares, medicina humoral em Bom Jesus/RS (1898-1927)**. Dissertação (Mestre em História). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006.

COUTINHO, L.C.A., MEDEIROS, E.S., SILVEIRA, N.S.S., SILVA, L.B.G. & MOTA, R.A. Eficácia *in vitro* de desinfetantes utilizados na anti-sepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 32(1):61-65, 2012.

COUTINHO, L.C.A., MEDEIROS, E.S., SILVEIRA, N.S.S., SILVA, L.B.G. & MOTA, R.A. Eficácia *in vitro* de desinfetantes utilizados na anti-sepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 32(1):61-65, 2012.

CRUZ, L.C.H. Micologia veterinária. Seropédica-RJ, 1998. 202p.

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

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.ed., São Paulo: Siqueira, 1959.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Andrei Editora, 1977.

GALVANI, F.R. & BAPTISTA, L.R.M. flora do Parque Estadual do Espinilho – Barra do Quaraí /RS. **Revista da FZVA Uruguaiana**. 10(1):42-62, 2003.

GARLET, T.M.B. **Levantamento das plantas medicinais utilizadas no município de Cruz Alta, RS, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Botânica) Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2000.

GELMAN, A. C.; CLARK, E. G.; OMRAM, A. R. A. Prevenção da doença transmissível. *In*: LEAVELL, H. R.; CLARK, E. G. **Medicina preventiva**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1978. Parte II.5, p.133-181.

GONZÁLES, H.N. **Capacidade de inativação de desinfetantes sobre microrganismos isolados de superfícies em áreas críticas de um hospital veterinário de ensino**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

JONES, T.C, HUNT, R.D. & KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6ª Ed. São Paulo: Manole, 2000, 1415p.

JUNIOR, E.A.W. **Mastite bovina: avaliação microbiológica do leite, com ênfase nas leveduras isoladas de casos de mastite clínica e subclínica, na região do Planalto Médio, RS em 2005 e 2006**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

KOCH, V. **Estudo etnobotânico das plantas medicinais na cultura italo-brasileira no Rio Grande do Sul um modelo para o cultivo comercial na agricultura familiar**.

Dissertação (Mestrado em fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

LADEIRA, S.R.L. Mastite bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A. & BORGES, J.R. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. Santa Maria: Pallotti, 2007, v.2, p.359-372.

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

LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil Nativas e Exóticas. 2ª Edição. Nova Odesa-SP, 2008, 544p.

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

MCDONNELL, G.; RUSSEL, D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, 12(1):147-179,1999.

MENDES, J.F.; FREITAS, C.H.; SANTOS, P.R.; TERRA, A.P.; NASCENTE, P.S. & MELLO, J.R.B. atividade desinfetante do quaternário de amônia e do pinho sobre leveduras isoladas de animais silvestres. XV EMPOS, Pelotas, 2013.

MENTZ, L.A., LUTZEMBERGER, L.C., SCHENKEL, E.P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'Avila (1910). **Caderno de Farmácia**, 13(1):25-48, 1997.

MING, L. C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. **Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. p. 69-86.

NASCIMENTO, H. M.; DELGADO, D. A.; BARBARIC, I. V. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 11-13, jun. 2010.

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

OLIVERIA, C.; FERRERIA, J.A. & TOMA, M.A. Análise fitoquímica preliminar do extrato etanólico obtido a partir do rizoma da *typha domingensis pers*. **Revista Ceciliana**. 2(2): 17-19, 2010.

OLIVEIRA, E. A.; BOTH, J. M. C.; AVANCINI, C. A. M. **Atividade antimicrobiana "in vitro" do decocto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) frente à cepa de**

referência (*Staphylococcus aureus* ATCC 25.923) de interesse em medicina veterinária.

In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 24., 2012, Porto Alegre. Pôster. Disponível em:

<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/64600/Poster_22205.pdf?sequence=2>. Acesso em: 5 nov. 2012.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional**. Ginebra: 2002 – 2005.

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

POSSAMAI, R.M. **Levantamento etnobotânico das plantas de uso medicinal em Mariana Pimentel, RS**. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

REGNET, R.A.; HEFLER, S.M. levantamento etnobotânico e etnofarmacológico de plantas utilizadas na medicina popular no município do Rio Grande, RS, Brasil: etapa comunidade Ilha do Leonídeo. XXII Congresso de Iniciação científica da Universidade Federal de Pelotas, 18-22 de novembro. **Anais**. 2003. Disponível em: <http://www2.ufpel.edu.br/cic/2013/?sec=anais>. Acessado em 15/01/2014.

RESOLUÇÃO-RDC N-14, DE 28 DE FEVEREIRO DE 2007 . Aprova Regulamento Técnico para Produtos com Ação Antimicrobiana, harmonizando no âmbito do Mercosul. DOU Suplemento ao N 43, Brasília - DF, segunda-feira, 5 de março de 2007, p. 2.

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

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. **Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities**. Chapel Hill: Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2008. 158 p. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/disinfection_nov_2008.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2009.

SALDANHA, A.A.; CARMO, L.F.; SIQUEIRA, J.M.; CASTRO, A.H.F.; MATOS, N.A., KLEIN, A. & SOARES, A.C. Análise fitoquímica preliminar e avaliação do possível

efeito antiinflamatório da fração enriquecida em flavonóides de *Byrsonima verbascifolia* (malpighiaceae). **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**. 2(2):89-91, 2013.

SCHUCH, L.F.D.; WIEST, J.M.; GARCIA, E.N.; PRESTES, L.S.; SCHRAMM, R.C.; COIMBRA, H. & MEIRELES, M.C.A. Atividade antifúngica de extratos de plantas utilizados por agricultores familiares como antimicrobiano. **Acta Scientiae Veterinariae**, 36(3): 267-271, 2008.

SCHWAMBACH, K.H. **Utilização de plantas medicinais e medicamentos no autocuidado no município de Teutônia**. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SEBOLD, D.F. **Levantamento etnobotânico de plantas de uso medicinal no município de Campo Bom, Rio Grande do Sul, Brasil**. (Dissertação de mestrado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

SIDRIM, J.J.C. & CAFÉ, V.S. Controle de população microbiana. In: SIDRIM, J.J.C & ROCHA, M.R.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 28-33.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A. & CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**. 6(2):1-17,2010.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1989. 174 p.

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

SOUZA, G.C. **Extrativismo em área de reserva da Mata Atlântica do Rio Grande do Sul: um estudo etnobiológico em Maquiné**. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E.M.C.; SANTÚRIO, J.M. & FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, 39(1):282-290, 2009.

SPEROTTO V. R.; MURARI, A. L.; SILVA, D. A. R. DA.; POSSENTI, C. G. R.; WIEST, J. M.; AVANCINI, C. A. M. Atividade do decocto de *Achyrocline satureioides* D.C. (Lam.) - Asteraceae (“macela”) sobre bactérias padrões e isoladas em mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae** 40(3): 1-7.2012.

STANISZEWSKA, M., ROZBICKA, B., RAJNISZ, A., BOCIAN, E., WASIŃSKA, E., JAKIMIAK, B., RÖHM-RODOWALD, E., KURZAŃKOWSKI, W. & TYSK. Susceptibility of *Candida* spp. Clinical isolates. **Cent. Eur. J. Biol.** 5(6): 821-826, 2010. to antimycotics and disinfectants

TYLER, J.W. & CULLOR, J.S. Sanidade e distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B.P. Medicina interna de grandes animais. Barueri-SP: Manole, 2006.p.1019-1037.

VASCONCELLOS, C; KECK, R.M.; CEOLIN, T.; BARBIERI, RL.; BORGES, A.M.; MUNIZ, L.C. & COSTA, N.R. Plantas medicinais utilizadas na saúde da mulher no Brasil. **Horizonte Enfermagem.** 22(1): 23-33, 2011.

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

VENDRUSCOLO, G.S. **Estudo etnobotânico das plantas utilizada como medicinais por moradores no bairro de Ponta Grossa, Porto Alegre, RS.** Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

ANEXO - Screening fitoquímico

Planta: *Chaptalia nutans*

Data: 09/12/13

Responsável: Bárbara Parraga da Silva

	Característica confirmatórias	Positivo	Negativo
Compostos fenólicos	Desenvolvimento da coloração verde ou azul escura	X	
	Aparecimento ou intensificação da cor amarela ou laranja.	X	
Taninos	Taninos → Turvação ou precipitação de gelatina	X	
	Taninos hidrolisáveis → desenvolvimento de coloração azulada		X
	Taninos condensados → desenvolvimento de coloração verde	X	
Flavonóides	Flavonas → desenvolvimento de coloração laranja		X
	Flavanonas → desenvolvimento de coloração violácea		X
	Flavonóis → desenvolvimento de cor vermelha		X
Cumarinas	Cumarinas voláteis → fluorescência azul e amarela		X
Quinonas	Antraquinonas → desenvolvimento de cor vermelha		X
	Naftoquinóides → desenvolvimento de cor violácea		X
	Benzoquinóides → desenvolvimento de cor azul		X
	Quinonas glicosídicas → desenvolvimento de coloração vermelha na fase aquosa		X
Saponinas	Desenvolvimento de espuma com altura superior a 1 cm e persistência da mesma após repouso de 15 minutos e adição de ácido clorídrico 10%		X
Alcalóides	Aparecimento de um precipitado		X

Screening fitoquímico

Planta: *Maytenus ilicifolia*

Data: 09/12/13

Responsável: Bárbara Parraga da Silva

	Característica confirmatórias	Positivo	Negativo
Compostos fenólicos	Desenvolvimento da coloração verde ou azul escura	X	
	Aparecimento ou intensificação da cor amarela ou laranja.	X	
Taninos	Taninos → Turvação ou precipitação de gelatina		X
	Taninos hidrolisáveis → desenvolvimento de coloração azulada		X
	Taninos condensados → desenvolvimento de coloração verde		X
Flavonóides	Flavonas → desenvolvimento de coloração laranja	X	
	Flavanonas → desenvolvimento de coloração violácea		X
	Flavonóis → desenvolvimento de cor vermelha		X
Cumarinas	Cumarinas voláteis → fluorescência azul e amarela		X
Quinonas	Antraquinonas → desenvolvimento de cor vermelha		X
	Naftoquinóides → desenvolvimento de cor violácea		X
	Benzoquinóides → desenvolvimento de cor azul		X
	Quinonas glicosídicas → desenvolvimento de coloração vermelha na fase aquosa		X
Saponinas	Desenvolvimento de espuma com altura superior a 1 cm e persistência da mesma após repouso de 15 minutos e adição de ácido clorídrico 10%	X	
Alcalóides	Aparecimento de um precipitado		X

Screening fitoquímico

Planta: *Cyperus brevifolius*

Data: 09/12/13

Responsável: Bárbara Parraga da Silva

	Característica confirmatórias	Positivo	Negativo
Compostos fenólicos	Desenvolvimento da coloração verde ou azul escura	X	
	Aparecimento ou intensificação da cor amarela ou laranja.	X	
Taninos	Taninos → Turvação ou precipitação de gelatina	X	
	Taninos hidrolisáveis → desenvolvimento de coloração azulada		X
	Taninos condensados → desenvolvimento de coloração verde	X	
Flavonóides	Flavonas → desenvolvimento de coloração laranja	X	
	Flavanonas → desenvolvimento de coloração violácea		X
	Flavonóis → desenvolvimento de cor vermelha		X
Cumarinas	Cumarinas voláteis → fluorescência azul e amarela		X
Quinonas	Antraquinonas → desenvolvimento de cor vermelha		X
	Naftoquinóides → desenvolvimento de cor violácea		X
	Benzoquinóides → desenvolvimento de cor azul		X
	Quinonas glicosídicas → desenvolvimento de coloração vermelha na fase aquosa		X
Saponinas	Desenvolvimento de espuma com altura superior a 1 cm e persistência da mesma após repouso de 15 minutos e adição de ácido clorídrico 10%		X
Alcalóides	Aparecimento de um precipitado		X

Screening fitoquímico

Planta: *Achyrocline satureioides*

Data: 09/12/13

Responsável: Bárbara Parraga da Silva

	Característica confirmatórias	Positivo	Negativo
Compostos fenólicos	Desenvolvimento da coloração verde ou azul escura	X	
	Aparecimento ou intensificação da cor amarela ou laranja.	X	
Taninos	Taninos → Turvação ou precipitação de gelatina	X	
	Taninos hidrolisáveis → desenvolvimento de coloração azulada		X
	Taninos condensados → desenvolvimento de coloração verde	X	
Flavonóides	Flavonas → desenvolvimento de coloração laranja		X
	Flavanonas → desenvolvimento de coloração violácea		X
	Flavonóis → desenvolvimento de cor vermelha	X	
Cumarinas	Cumarinas voláteis → fluorescência azul e amarela		X
Quinonas	Antraquinonas → desenvolvimento de cor vermelha		X
	Naftoquinóides → desenvolvimento de cor violácea		X
	Benzoquinóides → desenvolvimento de cor azul		X
	Quinonas glicosídicas → desenvolvimento de coloração vermelha na fase aquosa		X
Saponinas	Desenvolvimento de espuma com altura superior a 1 cm e persistência da mesma após repouso de 15 minutos e adição de ácido clorídrico 10%		X
Alcalóides	Aparecimento de um precipitado		X

Screening fitoquímico

Planta: *Cyperus ferox*

Data: 09/12/13

Responsável:

Bárbara Parraga da Silva

	Característica confirmatórias	Positivo	Negativo
Compostos fenólicos	Desenvolvimento da coloração verde ou azul escura	X	
	Aparecimento ou intensificação da cor amarela ou laranja.	X	
Taninos	Taninos → Turvação ou precipitação de gelatina	X	
	Taninos hidrolisáveis → desenvolvimento de coloração azulada		X
	Taninos condensados → desenvolvimento de coloração verde	X	
Flavonóides	Flavonas → desenvolvimento de coloração laranja	X	
	Flavanonas → desenvolvimento de coloração violácea		X
	Flavonóis → desenvolvimento de cor vermelha		X
Cumarinas	Cumarinas voláteis → fluorescência azul e amarela		X
Quinonas	Antraquinonas → desenvolvimento de cor vermelha		X
	Naftoquinóides → desenvolvimento de cor violácea		X
	Benzoquinóides → desenvolvimento de cor azul		X
	Quinonas glicosídicas → desenvolvimento de coloração vermelha na fase aquosa		X
Saponinas	Desenvolvimento de espuma com altura superior a 1 cm e persistência da mesma após repouso de 15 minutos e adição de ácido clorídrico 10%		X
Alcalóides	Aparecimento de um precipitado		X

Screening fitoquímico

Planta: *Polygonum punctatum*

Data: 09/12/13

Responsável: Bárbara Parraga da Silva

	Característica confirmatórias	Positivo	Negativo
Compostos fenólicos	Desenvolvimento da coloração verde ou azul escura	X	
	Aparecimento ou intensificação da cor amarela ou laranja.	X	
Taninos	Taninos → Turvação ou precipitação de gelatina	X	
	Taninos hidrolisáveis → desenvolvimento de coloração azulada		X
	Taninos condensados → desenvolvimento de coloração verde	X	
Flavonóides	Flavonas → desenvolvimento de coloração laranja		X
	Flavanonas → desenvolvimento de coloração violácea		X
	Flavonóis → desenvolvimento de cor vermelha	X	
Cumarinas	Cumarinas voláteis → fluorescência azul e amarela		X
Quinonas	Antraquinonas → desenvolvimento de cor vermelha		X
	Naftoquinóides → desenvolvimento de cor violácea		X
	Benzoquinóides → desenvolvimento de cor azul		X
	Quinonas glicosídicas → desenvolvimento de coloração vermelha na fase aquosa		X
Saponinas	Desenvolvimento de espuma com altura superior a 1 cm e persistência da mesma após repouso de 15 minutos e adição de ácido clorídrico 10%		X
Alcalóides	Aparecimento de um precipitado	X	

Screening fitoquímico

Planta: *Maytenus ilicifolia*

Data: 09/12/13

Responsável: Bárbara Parraga da Silva

	Característica confirmatórias	Positivo	Negativo
Compostos fenólicos	Desenvolvimento da coloração verde ou azul escura	X	
	Aparecimento ou intensificação da cor amarela ou laranja.	X	
Taninos	Taninos → Turvação ou precipitação de gelatina	X	
	Taninos hidrolisáveis → desenvolvimento de coloração azulada		X
	Taninos condensados → desenvolvimento de coloração verde	X	
Flavonóides	Flavonas → desenvolvimento de coloração laranja	X	
	Flavanonas → desenvolvimento de coloração violácea		X
	Flavonóis → desenvolvimento de cor vermelha		X
Cumarinas	Cumarinas voláteis → fluorescência azul e amarela	X	
Quinonas	Antraquinonas → desenvolvimento de cor vermelha		X
	Naftoquinóides → desenvolvimento de cor violácea		X
	Benzoquinóides → desenvolvimento de cor azul		X
	Quinonas glicosídicas → desenvolvimento de coloração vermelha na fase aquosa		X
Saponinas	Desenvolvimento de espuma com altura superior a 1 cm e persistência da mesma após repouso de 15 minutos e adição de ácido clorídrico 10%		X
Alcalóides	Aparecimento de um precipitado	X	

Sreening fitoquímico

Planta: *Bidens pilosa*

Data: 09/12/13

Responsável: Bárbara Parraga da Silva

	Característica confirmatórias	Positivo	Negativo
Compostos fenólicos	Desenvolvimento da coloração verde ou azul escura	X	
	Aparecimento ou intensificação da cor amarela ou laranja.	X	
Taninos	Taninos → Turvação ou precipitação de gelatina	X	
	Taninos hidrolisáveis → desenvolvimento de coloração azulada		X
	Taninos condensados → desenvolvimento de coloração verde	X	
Flavonóides	Flavonas → desenvolvimento de coloração laranja	X	
	Flavanonas → desenvolvimento de coloração violácea		X
	Flavonóis → desenvolvimento de cor vermelha		X
Cumarinas	Cumarinas voláteis → fluorescência azul e amarela		X
Quinonas	Antraquinonas → desenvolvimento de cor vermelha	X	
	Naftoquinóides → desenvolvimento de cor violácea		X
	Benzoquinóides → desenvolvimento de cor azul		X
	Quinonas glicosídicas → desenvolvimento de coloração vermelha na fase aquosa		X
Saponinas	Desenvolvimento de espuma com altura superior a 1 cm e persistência da mesma após repouso de 15 minutos e adição de ácido clorídrico 10%		X
Alcalóides	Aparecimento de um precipitado		X



IMPORTADORA QUÍMICA DELAWARE LTDA.

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Documento: N° 43570/11

Data Emissão: 08/09/2011

Ordem de Fracionamento: 3639

Insumo	QUARTENÁRIO DE AMÔNIO 50%		
Nome Químico	Cloreto de Cetil Trimetilamônio		
Origem	BRASIL	Procedência	BRASIL
Lote Interno	1861/11	CAS	8030-78-2
Fabricante	DEGANI-VADUZ	Lote Fabricante	081601
Data Fabricação	16/08/2011	Data Validade	15/08/2012

Análises Físico-Químicas

Testes	Especificações	Resultados
*Aspecto (a 25 °C)	Líquido incolor a levemente amarelado, odor característico.	De acordo
*pH (Solução aquosa a 10 %)	5,0 a 8,0	5,79
*Densidade (20 °C)	0,85 a 0,95 g / mL	0,894 g / mL
Princípio Ativo (Catiônico)	49,0 % a 51,0 %	50,3 %

Farmacêutica Responsável
CRF-RS 12356

CONTROLE DE QUALIDADE

RUA MORRETES, 376 - FONE/FAX: (51) 3341.0812 - CEP 91030-300 - SANTA MARIA GORETTI - PORTO ALEGRE - RS - BRASIL
E-mail: vendas@delaware.com.br



IMPORTADORA QUÍMICA DELAWARE LTDA.

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Documento: N° 43737/11

Data Emissão: 04/10/2011

Ordem de Fracionamento: 3797

Insumo		IODOFOR CONCENTRADO	2090
Origem	BRASIL	Procedência	BRASIL
Lote Interno	2028/11	Lote Fabricante	4508
Data Fabricação	01/09/2011	Data Validade	01/09/2013

Análises Físico-Químicas

Testes	Especificações	Resultados
Aspecto	Líquido viscoso de cor marrom escuro.	De acordo
pH (Solução Aquosa a 10 %)	2,0 a 4,0	2,18
Teor de Iodo ativo	Mínimo 19,0 %	20,51 %

Os resultados presentes neste Certificado de Análise tem seus valores restritos a este lote.

Referência Bibliográfica: Conforme literatura do fornecedor.

Conservação: Em recipientes herméticos, ao abrigo da luz, calor e umidade.

*Cópia do Certificado de Análise original do fornecedor.

Resultado APROVADO

M. Brandalise

Mariana Brandalise
Farmacêutica Responsável
CRF-RS 12356

CONTROLE DE QUALIDADE

RUA MORRETES, 376 - FONE/FAX: (51) 3341.0812 - CEP 91030-300 - SANTA MARIA GORETTI - PORTO ALEGRE - RS - BRASIL
E-mail: vendas@delaware.com.br

Porto Alegre, 25 de abril de 2014

FELIPE LOPES CAMPOS