

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA**

JHÔNATAN SPERANDIO

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO ÓLEO ESSENCIAL DE CHINCHILHO (*Tagetes
minuta* L.) NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA**

FLORIANÓPOLIS - SC

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA**

JHÔNATAN SPERANDIO

AVALIAÇÃO *in vitro* DO ÓLEO ESSENCIAL DE CHINCHILHO (*Tagetes minuta* L.) NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência para obtenção do Diploma de Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Shirley Kuhnen

Coorientadores (as): Dr.^a Luciana Honorato

Dr.^a Beatriz Veleirinho

**FLORIANÓPOLIS - SC
2016**

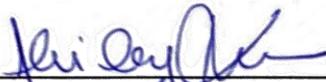
Jhônatan Sperandio

AVALIAÇÃO *in vitro* DO ÓLEO ESSENCIAL DE CHINCHILHO (*Tagetes minuta* L.) NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA

Esta Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso foi julgada aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 17 de novembro de 2016.

Banca Examinadora:



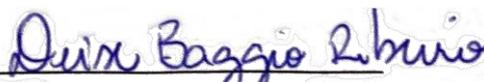
Prof.^a Shirley Kuhnen, Dr.^a
Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina



Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho, Dr.
Professor

Universidade Federal de Santa Catarina



Deise Baggio, Dr.^a
Professora

Universidade Federal de Santa Catarina

Sperandio, Jhônatan

AVALIAÇÃO in vitro DO ÓLEO ESSENCIAL DE CHINCHILHO
(Tagetes minuta L.) NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA /
Jhônatan Sperandio ; orientador, Shirley Kuhnen ;
coorientadora, Luciana Honorato, coorientadora, Beatriz
Veleirinho. - Florianópolis, SC, 2016.

55 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agrárias. Graduação em Zootecnia.

Inclui referências

1. Zootecnia. 2. atividade antimicrobiana. 3. linhagem
MAC-T. 4. produtos naturais. 5. mastite. I. Kuhnen,
Shirley . II. Honorato, Luciana. III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Graduação em Zootecnia. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo o suporte fornecido.

Agradeço a minha orientadora Dr.^a Shirley Kuhnen que tive o imenso prazer de trabalhar durante toda minha graduação, muito obrigado por todo o apoio, por confiar no meu trabalho e por todo conhecimento compartilhado durante os mais de 5 anos que trabalhamos juntos.

Agradeço as minhas coorientadoras Dr.^a Luciana Honorato e Dr.^a Beatriz Veleirinho, que não mediram esforços em ajudar com análises e metodologias, auxílio fundamental para a execução deste trabalho.

Aos meus eternos amigos da graduação Aline, Bruna e Ingrid que sempre estiveram presentes por mim.

Agradeço a todos os membros do LABIMA, Samira, Gabriela, Lauro, Isadora, Drúcila, Andrey, Dário pelas conversas diárias e por terem participado da realização de mais um estudo executado no laboratório.

Agradeço aos membros do laboratório de Biologia Celular, Ana, Thais, Simone e Helô, que muito me auxiliaram durante os experimentos.

Agradeço a todos que de forma indireta ou direta contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A mastite é a doença mais comum em propriedades leiteiras, acarretando em importantes prejuízos econômicos. A inflamação da glândula mamária é causada principalmente por bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo uma doença de difícil tratamento. O uso de produtos naturais no combate à mastite reduz o impacto negativo do uso de antibióticos. Com isso, no presente trabalho avaliamos a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. contra *S. aureus* e *E. coli* e a citotoxicidade sobre células epiteliais mamárias bovina da linhagem MAC-T. A análise qualitativa do óleo por GC-MS revelou cis-tagetona (24,24%), dihidrotagetona (16,65%), 1,3,6-octatrieno-3,7-Dimetil-E (13,61%), trans-ocimenona (13,52%) e cis-ocimenona (10,06%) como compostos majoritários. A atividade antimicrobiana determinada pela técnica de microdiluição em caldo, revelou a concentração inibitória mínima (CIM) de 1 mg/mL para a cepa padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) e 5 isolados de leite mastítico, além de uma cepa multirresistente (ATCC 33592) e 3 mg/mL para a cepa padrão de *Escherichia coli* (ATCC 8739) e dois isolados de leite mastítico. No entanto, forte efeito citotóxico do óleo sobre as células da linhagem MAC-T foi encontrado. Concentrações a partir de 10 µg/mL do óleo essencial resultaram em mais de 90% de morte das células, estando o IC50 de 26,24 µg/mL muito abaixo da concentração com atividade antimicrobiana. Portanto, os resultados encontrados sugerem que apesar da atividade antimicrobiana contra os principais agentes causadores da mastite bovina, incluindo uma cepa multirresistente, a utilização do óleo de *T. minuta* como medicamento intramamário não é recomendada devido a sua elevada citotoxicidade. Deste modo, seu uso pode ser indicado para a região externa ao úbere ou para limpeza dos utensílios utilizados no manejo da ordenha.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, linhagem MAC-T, produtos naturais

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Concentração inibitória mínima (mg/mL) (média +/- desvio padrão) do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre *Staphylococcus aureus*.....43
- FIGURA 2. Efeito do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* após adição do corante resazurina (100µg/mL).....44
- FIGURA 3. Concentração inibitória mínima (mg/mL) (média +/- desvio padrão) do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre *Escherichia coli*.....45
- FIGURA 4. Efeito do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre o crescimento de *Escherichia coli* ATCC (à esquerda) e de campo (à direita) após adição do corante resazurina (100µg/mL).....45
- FIGURA 5. Concentração inibitória mínima (mg/mL) (média +/- desvio padrão) do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 33592 multiresistente.....46
- FIGURA 6. Efeito do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 33592 multiresistente após adição do corante resazurina (100µg/mL).....46
- FIGURA 7. Citotoxicidade (µg/mL) (média +/- desvio padrão) do óleo essencial de *Tagetes minuta* em células epiteliais da glândula mamária MAC-T.....47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição do óleo de <i>T. minuta</i>	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - American Type Culture Collection

CBM - Concentração bacteriana mínima

CCS - Contagem de células somáticas

CIM - Concentração inibitória mínima

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FIBL - Forschungsinstitut für biologischen Landbau (Instituto de Pesquisa Sobre Agricultura Orgânica)

g - Gramas

GC - Cromatografia gasosa

GC-MS - Cromatografia gasosa de massa

IC50 – Concentração inibitória de 50%

IFOAM - International Federation of Organic Agriculture Movements

IN46 - Instrução Normativa 46

L – Litros

M⁺ - Massa

m - Metros

mg - Miligramas

Min - Minutos

mL - Mililitros

mm - Milímetros

mM - Milimolar

MTT - brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil

nL - Nanolitros

nm - nanômetros

°C - Graus Celsius

PBS - Phosphate-buffered saline

Rt – Retention time (tempo de retenção)

SFB - Soro fetal bovino

UFC - Unidade formadora de colônias

uL = Microlitros

µg - Microgramas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	Glândula Mamária.....	15
3.2	Mastite.....	16
3.3	Impactos Econômicos da Mastite.....	18
3.4	Tratamento dos Animais	19
3.5	Produção Orgânica	21
3.6	<i>Tagetes minuta</i> L.	23
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
5	Avaliação <i>in vitro</i> do óleo essencial de chinchilho (<i>Tagetes minuta</i> L.) no tratamento da mastite bovina	35

1 INTRODUÇÃO

A eficiência da produção de leite é a principal missão da bovinocultura leiteira. Portanto, a saúde do animal, sobretudo da glândula mamária, é essencial para garantir alta produção de leite aliada à rentabilidade da propriedade bem como a segurança e a qualidade do alimento e de seus derivados. Contudo, em algumas regiões do Brasil têm sido encontradas prevalências médias de 17,45% de mastite clínica e 72,56% de mastite subclínica, a qual pode reduzir até 50% da produção de leite (RIET-CORREA et al., 2001). A mastite é a inflamação da glândula mamária, comumente causada por bactérias, e que se caracteriza por diversas alterações do tecido glandular, afetando as características do leite. Esta enfermidade pode ser classificada em clínica ou subclínica, conforme sua apresentação (SMITH, 2009).

A mastite subclínica diferencia-se da mastite clínica por não apresentar sintomas visíveis e diminuir significativamente a produção e a qualidade do leite em termos microscópicos. Estima-se que para cada caso de mastite clínica na propriedade, existam 14 casos de mastite subclínica (RIET-CORREA et al., 2001). Entre os principais agentes etiológicos da mastite subclínica destacam-se alguns cocos gram-positivos, como *Staphylococcus aureus*. Já para a mastite clínica, as amostras estão comumente contaminadas com *Escherichia coli*, diferenciando-se da subclínica principalmente por apresentar alterações no leite que, muitas vezes, são evidentes, observando-se sangue ou aglomerados de caseína, ou aspecto aquoso (RADOSTITS, 2010).

O tratamento da mastite subclínica é feito comumente através de antibióticos no período de secagem da vaca, uma vez que não há a exigência de se descartar o leite nesses casos. Por outro lado, na mastite clínica, o leite deve ser descartado e os animais imediatamente tratados com antibióticos (RADOSTITS, 2010; DIVERS & PEEK, 2008; FONSECA & SANTOS, 2000). No entanto, o uso sem observação do período de carência dos mesmos, tem acarretado na presença de resíduos no leite que chega ao consumidor (VIEIRA et al., 2012; NERO et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2001). A preocupação da população com a presença desses resíduos nos alimentos e com a ocorrência de resistência bacteriana, são hoje, desafios para os produtores de leite.

Mercados competitivos para um leite de alta qualidade, assim como a demanda por produtos orgânicos, abrem novos caminhos para uma produção sustentável deste alimento. Com isso, estudos que buscam novos agentes antimicrobianos de origem natural tem ganhado cada vez mais espaço. Neste sentido, Zhu et al. (2016) e Fiordalisi et al. (2016) estudaram o efeito do óleo de canela-da-China e extratos da própolis, respectivamente, contra bactérias causadoras da mastite bovina. Os resultados obtidos se mostraram promissores para a utilização desses produtos naturais no combate à mastite bovina.

O extrato hidroalcólico de *Tagetes minuta*, planta nativa da América do Sul, popularmente conhecida como chinchilho também tem sido sugerida no combate e prevenção da mastite bovina (SCHIAVON, 2011; SCHUCH et al., 2008). A elevada atividade antibacteriana tanto do extrato da parte aérea como do óleo essencial, incluindo atividades frente a bactérias gram-negativas, está relatada na literatura (VIEIRA et al., 2011; SCHUCH et al., 2008; WIEST et al., 2009; SENATORE et al., 2004; SOUZA et al., 2000). No entanto, nenhum dos estudos realizados com *T. minuta* incluiu a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato ou do óleo essencial ao tecido da glândula mamária, visando a aplicação intramamária.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* o uso do óleo de *Tagetes minuta* L. no controle da mastite bovina.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar quimicamente o óleo essencial de *T. minuta*.
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial de *T. minuta* contra os principais agentes etiológicos causadores de mastite bovina.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do óleo essencial de *T. minuta* em linhagem de células epiteliais mamária bovina da linhagem MAC-T.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Glândula Mamária

As glândulas mamárias são glândulas sudoríparas modificadas, originárias no ectoderma embrionário, com o objetivo de produzir leite para a nutrição da progênie. O úbere bovino é composto por quatro glândulas que trabalham de maneira independente. As células produtoras de leite são as chamadas células epiteliais mamárias que formam um epitélio simples, variando de colunar a cuboide e se encontram arranjadas em formato de um alvéolo com um lúmen central, sendo revestidas por células mioepiteliais (FRANDSON et al., 2005).

Os nutrientes necessários para a produção do leite chegam à glândula mamária pelo sistema circulatório e são transportados para as células epiteliais, as quais sintetizam os principais componentes para a formação do leite, tais como caseína, lactose e gordura. Estes componentes são secretados diretamente no lúmen alveolar, onde são combinados com outros constituintes. Parte do leite sintetizado escoam a partir do alvéolo, através de uma série de ductos progressivos, até ser armazenado em cisternas na glândula e no teto. Entretanto, grande parte do leite permanece no alvéolo até que a ejeção do mesmo ocorra (SMITH, 2009).

Quando o teto é manipulado na hora da ordenha, um reflexo neuro-hormonal, desencadeado por receptores na pele do teto e estímulos associados à rotina de ordenha (alimento, presença do terneiro, ruídos), faz com que a glândula pituitária libere ocitocina na corrente sanguínea. O leite apenas é ejetado quando as células mioepiteliais que envolvem o alvéolo se contraem em resposta à ocitocina (SMITH, 2009; FRANDSON et al., 2005).

Uma série de mecanismos de defesa são ativados na glândula mamária para protegê-la contra possíveis infecções. Esses mecanismos podem ser tanto físicos, quanto químicos, celulares e humorais e atuam resistindo a invasão microbiana, inibindo o crescimento e destruindo os agentes patológicos, neutralizando toxinas e reduzindo o

dano causado no tecido durante a inflamação. O canal do teto é um exemplo de barreira física, pois é composto por células musculares que impedem a invasão microbiana, com a formação de queratina entre uma ordenha e outra. Práticas de manejo e o estado fisiológico da vaca influenciam na resistência à mastite. Por exemplo, a integridade do canal do teto é comprometida por até 2 h depois da ordenha, tempo necessário para as fibras elásticas que envolvem o canal possam voltar ao seu estado normal. Caso haja a invasão, leucócitos e as próprias células da glândula mamária são a próxima linha de defesa. Leite de vacas saudáveis possuem uma baixa concentração de células somáticas (<100.000/mL), majoritariamente macrófagos. Contudo, quando há presença de microrganismos patológicos, macrófagos e células epiteliais liberam citocinas e quimiocinas, que são sinais bioquímicos de gatilho para migração dos neutrófilos. Durante infecções agudas, o número de neutrófilos pode exceder 1 milhão/mL. Outros tipos celulares também podem ser encontrados em menor número, tais como macrófagos, linfócitos e células epiteliais, sendo o número total denominado de Contagem de Células somáticas (CCS) (SMITH, 2009).

3.2 Mastite

A mastite é uma resposta inflamatória que ocorre na glândula mamária, responsável por mudanças físico-químicas no leite, como a presença de coágulos, alteração nas características organolépticas e alta contagem de leucócitos (RADOSTITS, 2010). O processo inflamatório é normalmente ocasionado por bactérias, leveduras, fungos e algas, havendo mais de 130 agentes etiológicos descritos na literatura (WATTS, 1998). Estes agentes são classificados em organismos contagiosos e organismos causadores de mastites ambientais (SMITH, 2009). Os organismos contagiosos são aqueles transmitidos de vacas que apresentam glândulas mamárias infectadas para vacas saudáveis. A transmissão normalmente ocorre no momento da ordenha, ocasionado por insumos utilizados durante a prática, como toalhas e teteiras mal higienizadas, ou até mesmo pela mão do ordenhador. Estão incluídos entre os organismos contagiosos

Staphylococcus aureus, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Mycoplasma sp.*

Os organismos classificados como ambientais são aqueles presentes no ambiente onde está a vaca, como o solo, a água, o esterco, a cama, etc. A presença destes organismos está fortemente correlacionada com as práticas de manejo dos animais. Fazem parte deste grupo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia sp.*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.*, outras bactérias gram-negativas, fungos, leveduras, *Prototheca sp.*, *A. pyogenes* e *Corynebacterium bovis* (DIVERS & PEEK, 2008). Prestes et al. (2003) destacam ainda alguns fatores predisponentes que podem causar ou facilitar o surgimento da mastite, entre eles o estágio de lactação do animal, a seleção genética, a ocorrência de traumatismos (ferimentos no úbere causado por agentes do meio e que podem favorecer a entrada de microrganismos no canal do teto), leite residual, a alimentação mal equilibrada, a idade avançada do animal, a falta de higiene nas instalações, a ordenha mal feita, a conformação do úbere ou dos tetos, entre outros.

De acordo com a natureza do estímulo e a capacidade de reação do animal, a mastite pode ser também classificada em subclínica ou clínica. A mastite subclínica é acompanhada de um aumento na contagem de células somáticas (CCS), o que prejudica a produção e a qualidade do leite. Em muitos casos, o aumento de CCS é devido a grande quantidade de neutrófilos que migram para o local, em resposta ao processo inflamatório do tecido glandular (RADOSTITS et al., 2010). Contudo, em casos de mastite subclínica não há sinais visíveis da manifestação da doença. A duração e os efeitos desse tipo de inflamação dependem do agente etiológico causador e da resposta imunológica do animal (SMITH, 2009). O aumento na concentração de cloro e sódio e redução da quantidade de caseína, gordura, sólidos totais e lactose do leite são outras mudanças consideráveis causadas pela mastite subclínica. Estima-se que para cada caso de mastite clínica devam existir entre 15 e 40 casos de mastite subclínica no plantel (BRITO et al., 2007). Já a mastite clínica é caracterizada por sinais visíveis da doença. As manifestações podem ser consideradas como subagudas, agudas ou superagudas (RIET-CORREA et al., 2001). Nas manifestações subagudas, o leite apresenta uma viscosidade aquosa e coloração anormal, além de grumos provenientes de material

inflamatório. Em casos agudos, a glândula mamária afetada é visivelmente identificada por apresentar sinais de inflamação, tais como inchaço, coloração avermelhada, aumento da temperatura local e rigidez no úbere. Na mastite clínica superaguda, as mudanças na glândula mamária podem ser acompanhadas por algumas enfermidades sistêmicas, as quais podem incluir diminuição na ingestão de alimento ou na produção de leite, diarreia (que pode conter sangue ou muco), letargia, fraqueza, taquipnéia, entre outros (AUAD, 2010; SMITH, 2009).

3.3 Impactos Econômicos da Mastite

A mastite é considerada uma das mais complexas e custosas doenças da produção leiteira, devido à sua alta prevalência e aos prejuízos que promove (KIM & HEALD, 1999; KOSSAIBATI & ESSLEMONT, 1997). Em termos econômicos, Blowey & Edmondson (1999) afirmam que a mastite pode afetar os custos da granja de forma direta, pelo descarte do leite da vaca doente e com os gastos envolvidos no tratamento (medicamentos). Indiretamente a mastite, pode provocar redução na produção do leite. Essa redução na produtividade pode ser pela presença de mastite subclínica no rebanho, por penalizações no preço do produto, pela alta contagem de células somáticas, aumento de mão de obra para o tratamento, cuidado dos animais portadores da doença, aumento na porcentagem de reposição do plantel e mortes. Estudando um rebanho de 230 vacas puras da raça Holandesa, em lactação e alojadas em *free-stall*, Carneiro et al. (2004) descobriram que as perdas em cada caso de mastite clínica foram de R\$ 228,29 por vaca ao ano. Considerando os gastos com perda de leite (US\$ 115,00), estágio da mortalidade (US\$ 14,00) e custos associados a tratamento (US\$ 50,00), Bar et al. (2008) estimaram um custo de US\$ 179,00 por caso de mastite ao ano. Tais resultados evidenciam a importância da doença na lucratividade da propriedade e, conseqüentemente, acabam justificando os esforços para o tratamento.

3.4 Tratamento dos Animais

O tratamento de vacas com mastite varia de acordo com a fase do ciclo de lactação que a vaca se encontra (animais em lactação ou vacas secas), podendo ser realizado de três maneiras diferentes: (a) tratamento intramamário, que consiste na aplicação do medicamento no interior do úbere via ducto do teto; (b) tratamento parietal, utilizando injeções para a aplicação; e (c) terapia oral, administrando o fármaco de forma líquida pela boca do animal (BLOWEY & EDMONDSON, 1999). A mastite clínica deve ser tratada imediatamente, de forma intramamária, durante, no mínimo, três dias. Já os animais com mastite subclínica podem ser tratados durante a lactação ou no período de secagem.

De acordo com Riet-Correa et al. (2001) infecções subclínicas causadas por *Staphylococcus aureus* são controladas mais facilmente, quando tratadas durante a secagem da vaca, que é um período ausente de lactação, para otimização da produção de leite na próxima lactação (FONSECA & SANTOS, 2000). Em contrapartida, infecções por *Streptococcus agalactiae* apresentam boa chance de cura quando o tratamento é realizado ainda no período de lactação. Dessa forma, a identificação do agente etiológico é uma medida importante para auxiliar na orientação de tratamento. Smith (2009) afirma que desenvolver protocolos para o tratamento da mastite é um grande desafio para a propriedade por conta da severidade dos sinais clínicos da doença, do tipo de agente causador, da produção de leite da vaca, dos históricos de mastite, do tempo de carência do remédio, da genética do animal, do preço de substituição do animal, entre outros. Por se tratar de uma doença comumente causada por bactérias, a classe medicamentosa mais recorrida para o tratamento da mastite é o antibiótico (SMITH, 2009; DIVERS & PEEK, 2008; BLOWEY & EDMONDSON, 1999).

No entanto, o uso frequente de antibióticos no tratamento da mastite é um problema de saúde pública. Há uma grande preocupação com seu uso indiscriminado e com a resistência das bactérias ao medicamento que podem se perpetuar ao longo da cadeia produtiva do leite até a mesa do consumidor (WHITE & MCDERMOTT, 2001). Avaliando a resistência bacteriana frente à antibióticos, Medeiros et al. (2009) estudaram

o efeito de diversos medicamentos contra 291 isolados de *Staphylococcus spp.* e descobriram que 181 deles eram multiresistentes aos fármacos. Os demais (110) foram sensíveis a todos os antibióticos ou resistentes a apenas um deles. Já PRIBUL et al. (2011) investigaram a resistência antimicrobiana e a sensibilidade a bacteriocinas produzidas por linhagens de *Lactobacillus spp.* de 30 isolados de *S. aureus* causadores de mastite, dos quais 29 produzem beta-lactamase. Oito isolados se apresentaram multiresistentes a pelo menos 4 antibióticos, enfatizando o alerta para tal perigo.

Em relação a presença de resíduos de antibiótico no leite que chega ao consumidor, Vieira et al. (2012) encontraram resíduos em 19% de 79 amostras de leite pasteurizado tipo B, coletadas em estabelecimentos comerciais no Estado do Paraná. Entre os antibióticos encontrados, 40% das amostras estavam contaminadas com cloranfenicol, 20% com tetraciclina, 6,7% com gentamicina, 20% com estreptomicina e 13,3% com β -lactâmicos. Nero et al. (2006) analisaram 210 amostras de leite cru de propriedades leiteiras de quatro estados do Brasil. Os autores concluíram que 11,4% das amostras analisadas apresentavam resíduos de antibióticos. Nascimento et al. (2001) avaliaram 96 amostras de leite de 6 marcas na cidade de Piracicaba, São Paulo, e descobriram que todas as amostras continham resíduos de antibiótico. Lederer (1991) e Woodward (1991) relatam que pessoas testadas que consumiram leite desenvolveram reações de hipersensibilidade (asmática, cutânea e digestiva). Contudo, tais indivíduos apresentaram resposta alérgica positiva à penicilina e negativa ao leite, demonstrando, portanto, a presença da penicilina no leite final. Conclui-se que, embora haja uma legislação regulamentando a presença de tais resíduos, não há rigor por parte dos produtores em cumpri-la, tampouco uma fiscalização eficiente por parte de órgãos competentes.

Em contraponto a esse cenário, a produção de alimentos orgânicos vem crescendo em todo o mundo, inclusive no Brasil, e tem como objetivo atender uma fração crescente da população que se preocupa com a origem do produto que está na sua mesa (SAHOTA, 2011).

3.5 Produção Orgânica

A produção orgânica de alimentos é “aquela em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente” (BRASIL, 2003).

No Brasil, a Instrução Normativa Nº 46/2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011) regulamenta a produção de alimentos orgânicos. Para a criação de animais, a IN46/2011 destaca que a alimentação deve ser estritamente orgânica (15% apenas de origem convencional), devendo ser utilizado ao máximo o sistema de pastagem para herbívoros. Além disso, recomenda-se a adoção de tratamentos homeopáticos e fitoterápicos, em substituição aos alopáticos, quando os animais apresentarem doenças, visando qualidade química do alimento; adoção de raças adaptadas às condições ambientais do local de criação; promoção do bem estar animal aliado a saúde, em todo o processo produtivo, através de instalações adequadas e higiênicas; proteção, conservação e o uso racional dos recursos naturais, regenerando áreas degradadas pelo incremento da biodiversidade animal e vegetal; buscar a sustentabilidade do meio, procurando não depender de insumos externos à produção, entre outros (SOARES, 2012).

Segundo o relatório realizado pelo Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FIBL) e pela International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM) de 2010 (FIBL/IFOAM, 2010), o Brasil encontra-se entre os maiores produtores de alimentos orgânicos do mundo. O censo agropecuário de 2006 registrou em torno de 90.500 estabelecimentos de produtores orgânicos, certificados ou não, representando 1,8% do

total de estabelecimentos do país, com destaque a pecuária e criação de outros animais (IBGE, 2006). No Brasil, atualmente, são produzidos em torno de 6,8 milhões de litros de leite orgânico ao ano, o equivalente a 0,02% da produção anual do alimento (28 bilhões de litros em 2010) (Soares et al., 2011). Sanches & Soares (2012) destacam que o manejo sanitário, sobretudo da mastite, é um grande entrave à produção orgânica leiteira, uma vez que o leite de vacas medicadas deve ser descartado durante duas vezes o período de tempo de carência do medicamento, de acordo com a IN46/2011.

Desse modo, alguns esforços tem sido feitos buscando nas plantas medicinais novos agentes antimicrobianos para o tratamento da mastite bovina. Dentre eles, destacam-se o estudo da atividade antibacteriana do óleo de *Cinnamom cassia* (canela da China) contra patógenos causadores de mastite, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus xylosum* e *Escherichia coli*. Neste caso, a concentração inibitória mínima (CIM) variou com o agente etiológico. Enquanto a CIM do óleo contra *S. hyicus* foi 0,00625% (v/v), para *E. coli* foi de 0,025% (v/v) e para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. xylosum* foi 0,0125% (Zhu et al., 2016). Um outro trabalho, demonstrou que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) também possui atividade contra patógenos causadores de mastite bovina, incluindo as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*. Neste estudo, o óleo teve maior efeito sobre *S. agalactiae* e *B. cereus* do que sobre *S. aureus* e *E. coli* (Aiemsard et al., 2011). Já Fiordalisi et al. (2016) encontraram que a redução do crescimento de *Staphylococcus aureus* pelos extratos de própolis varia com a origem geográfica de produção. Tais resultados evidenciam que a utilização de extratos naturais no tratamento da mastite bovina é viável e promissora, principalmente em produções de leite agroecológicas e orgânicas.

Dentre diversas outras plantas já estudadas, o chinchilho (*Tagetes minuta* L.), nativa da América do Sul, possui características que podem destacar a espécie como fonte de compostos com potencial para o tratamento da mastite.

3.6 *Tagetes minuta* L.

A planta *Tagetes minuta* L. é nativa da América do Sul e popularmente conhecida como chinchilho (HOLM et al., 1997). Pertence a família *Asteraceae*, a qual inclui o maior número de plantas vasculares, com mais de 23.000 espécies (CORNELIUS & WYCLIFFE, 2016), Subfamília *Asteroideae*, Tribo *Helenieae*, Gênero *Tagetes*, Espécie *Tagetes minuta* L. (KISSMANN & GROTH, 1992). É uma planta pouco ramificada, podendo chegar até 2 metros de altura, e que se multiplica apenas por sementes. Suas flores são constituídas por pequenos capítulos amarelos que se reúnem em panículas axilares e terminais. Suas folhas são compostas, contendo de 3 a 9 folíolos glandulosos (LORENZI, 2008). É conhecida principalmente pelo forte odor proveniente do óleo produzido nas glândulas das suas folhas.

Em termos de composição química, vários estudos têm mostrado que os terpenos presentes no óleo essencial de *T. minuta* variam em quantidade e qualidade, conforme o estágio de crescimento da planta na hora do corte (MOGHADDAM et al., 2007; THAPPA et al., 1992), a localização geográfica, os nutrientes presentes no solo (SINGH et al., 2003; CHALCHAT et al., 1995; GRAVEN et al., 1991), a parte da planta colhida (CHAMORRO et al., 2008), o clima da região, a intensidade de luz solar, o método de colheita e o método de extração do óleo (WANZALA, 2009; CHALCHAT et al., 1995).

Meshkatalasadat et al. (2010), por exemplo, analisaram o óleo essencial da *T. minuta* cultivada em Khoramabad, no Irã, e verificaram que os principais componentes eram limoneno (13,0%), piperitenona (12,2%), terpinoleno- α (11,0%), piperitona (6%), (E) tagetona (5,7%) e (Z)-ocimenona (5,1%). Já no óleo de *T. minuta* cultivado na Arábia Saudita, os principais compostos encontrados foram tagetona (11,52%), 5-octin-4-1, 2,7-dimetil (11,52%), propanedinitrila, dicitclohexil- (10,45%) e 2-pineno-4-1 (8,03%) (EL-Deeb et al., 2004). Gil et al. (2000) encontraram, em amostras da Argentina, maiores quantidades de dihidrotagetona, a-felandrena, limoneno, o-cimeno, b-ocimeno, tagetona e tagetenona. Na Índia, o óleo apresentou maiores quantidades de ocimena (54,97%) e dihidrotagetona (32,58%) (Singh et al., 2003), enquanto Chalchat et al. (1995) encontraram maiores teores de (Z)-tagetona, (Z)- β -ocimena, dihidrotagetona, (Z)- e (E)-

ocimenona no óleo extraído de plantas provenientes de Ruanda e da França. Na Quênia, a análise de óleo mostrou maiores quantidades de cis-ocimeno (43,78%), dihidrotagetona (16,71%), piperitenona (10,15%), trans-tagetona (8,67%), 3,9-epoxi-p-meta-1,8(10) dieno (6,47%), β -ocimeno (3,25%), e cis-tagetona (1,95%) (Wanzala & Ogoma, 2013). Em Madagascar, Wanzala & Ogoma (2013) encontraram majoritariamente a presença de limoneno (3,6–11%), (Z)- β -ocimeno (1,0–17,1%), (E)- β -ocimeno (0,5–14,6%), p-cimeno (0,3–20,4%), β -cariofilena (1,1– 12,7%), (Z)-tagetenona (26,7%), (E)-tagetenona (31,3%), α -murolena (36,5%) e verbenona (1,4–15,4%). Garcia et al. (2012) encontraram, em amostras de óleo proveniente da região Centro-Oeste do Brasil, maiores teores de dihidrotagetona (54,21%), limoneno (6,96%), tagetona (6,73%) e β -Ocimeno (5,11%). Em conjunto, todos esses estudos demonstram que a composição química do óleo de *T. minuta* varia tanto com fatores intrínsecos quanto externos, os quais refletem em demandas fisiológicas diferentes que podem estar associadas com o crescimento, reprodução e defesa da planta (HERMS & MATTSON, 1992).

Os extratos hidroalcoólico e o óleo da *T. minuta* vêm sendo estudados por suas propriedades medicinais (LORENZI, 2008), cosméticas (CORNELIUS & WYCLIFFE, 2016), inseticidas (IRERI et al., 2010; FURTADO et al., 2005; CESTARI et al., 2004; KÉÏTA et al., 2000), larvicidas (LIMA et al., 2009; SCRAMIM et al., 1990), repelentes (GILLIJ et al., 2008), antiparasitárias (FURTADO et al., 2010; RUFFINENGO et al., 2007; SIMS et al., 2000), nematocidas (JUNGES et al., 2009; MATSUMOTO et al., 2002) antioxidantes, anti-inflamatórias (KARIMIAN et al., 2014; HOLM et al., 1997) e antimicrobianas (VIEIRA et al., 2011; SCHUCH et al., 2008; WIEST et al., 2009; SENATORE et al., 2004; SOUZA et al., 2000).

Senatore et al. (2004) avaliaram o efeito antibacteriano de amostras de óleo essencial de *T. minuta* originárias de diferentes regiões (Egito, África do Sul e Reino Unido) contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. O óleo do Reino Unido possuía maiores teores de dihidrotagetona enquanto os óleos da África do Sul e Egito possuíam maiores quantidades de cis- β -ocimeno. Os autores observaram que a CIM do óleo do Reino Unido variou entre 6,25–25 $\mu\text{g/mL}$ contra bactérias gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*), e foi mais efetivo do que as amostras das outras regiões. Já a CIM do óleo do Reino Unido contra as bactérias

gram-negativas (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi* Ty2) variou entre 25–50 µg/mL, demonstrando, portanto, menor efeito do óleo sobre a redução do crescimento dessas espécies, porém ainda com atividade superior aos outros óleos testados. Em relação ao estudo do extrato hidroalcolico, Schiavon (2011) encontrou resultados promissores para sua utilização em manejos agroecológicos de produção de leite como fitoterápico utilizado em pós-dipping.

Desse modo, considerando o potencial de *T. minuta* no tratamento da mastite bovina, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano do seu óleo essencial contra diferentes bactérias causadoras de mastite bovina, assim como a citotoxicidade sobre células epiteliais da glândula mamária bovina. Os resultados encontrados estão apresentados na forma de artigo científico, segundo as normas do periódico Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIEMSSAAED, J. et al. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Res Vet Sci.**, v. 91, n. 3, p. 31-37, dec. 2011.

AUAD, A. M. **Manual de bovinocultura de leite**. Brasília, DF: LK, Belo Horizonte: SENAR-AR/MG, Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 2010, 607 p.

BAR, D. et al. The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. **Journal of Dairy Science**, Champaign-IL, v. 91, n. 6, p. 2205-2214, 2008.

BLOWEY, R. W.; EDMONDSON, P. **Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche**: guía ilustrada y práctica. Zaragoza (ES): Acribia, 26 cm ix, 208 p.

BRADLEY, A. Bovine mastitis: An evolving disease. **Vet. J**, n.164, p. 116–128, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.46, de 06 de outubro de 2011. Estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, bem como as listas de Substâncias Permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, na forma desta Instrução Normativa e dos seus Anexos I a VII. **Diário Oficial da União**, Brasília 07 de outubro de 2011. Seção 1.

BRASIL. **Lei n.10.831**, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica. Diário Oficial da União: Brasília, DF, 23 dez. 2003. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.831.htm>. Acesso em: 05 mai. 2016.

BRITO, L. G. et al. **Cartilha para o produtor de leite de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2007, 40p. (Embrapa Rondônia. Documentos, 116).

CARNEIRO, A. V. et al. **Mastite clinica: prevalência e custo de tratamento em rebanho leiteiro**. 2004. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/sites/default/files/mastite_clinica_prevalencia_e_custo_de_tratamento_em_rebanho_leiteiro.pdf>. Acesso em: 01 jan. 2016.

CESTARI, I. M. et al. Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, nov, 2004.

CHALCHAT, J. C.; GARRY, R. P.; MUHAYIMANA, A. Essential oil of *Tagetes minuta* from Rwanda and France: chemical composition according to harvesting, location, growth stage and part of plant extracted. **J. Essent. Oil Res.** n. 7, p. 375–386, 1995.

CHAMORRO, E. R. et al. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. **Journal of the Argentine Chemical Society**, v. 96, n. 1-2, p. 80-86, 2008.

CORNELIUS, W. W.; WYCLIFFE, W. *Tagetes (Tagetes minuta) Oils*. In: Preedy, V.R. (Ed.), **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. Academic Press, p. 791–802, 2016.

DIVERS, T. J.; PEEK, S. F. **Diseases of dairy cattle**. Saunders Elsevier. 2.ed. 2008.

EL-DEEB, K. S. Chemical Composition of the Essential Oil of *Tagetes Minuta* Growing in Saudi Arabia. **Saudi Pharmaceutical Journal**. Vol. 12, No. 1. Pag. 51 – 53. Jan, 2004

FIBL/IFOAM. Research Institute of Organic Agriculture/International Federation of Organic Agriculture Movements. **The World of Organic Agriculture**. Alemanha, 2010.

FIORDALISI, S. et al. The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. **Journal of Dairy Science**. 99:1–11, nov. 2015.

FONSECA, L. F. L. & SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo. Lemos Editorial, p.39-141, 2000.

FRANDSON, R.D. et al. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 454p.

FURTADO, F. N. et al. Atividade carrapaticida do óleo essencial de *Tagetes minuta*. **Revista Saúde**. 2010. Disponível em: <<http://revistas.ung.br/index.php/saude/article/view/688/777>>. Acesso em: 03 mar. 2016.

GARCIA, M. V. et al. Chemical identification of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its acaricidal effect on ticks. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 21, n. 4, p. 405-411, out, 2012.

GIL, A.; GHERSA, G. M.; LEICACH, S. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. **Biochem. Syst. Ecol.** n. 28, p. 261–274, 2000.

GILLIJ, Y. G.; GLEISER, R. M.; ZYGADLO, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2507-2515, 2008.

GRAVEN, E. H. et al. Effect of Soil Type and Nutrient Status on the Yield and Composition of Tagetes Oil (*Tagetes minuta* L.). **Journal of Essential Oil Research**, 5. ed., v. 3, p. 303-307, 1990.

HERMS, D. A.; MATTSON, W. J. The dilemma of plants: to grow or defend. **Q. Rev. Biol.**, v. 67, p. 284-335, 1992.

HOLM, L. D. J. et al. *Tagetes minuta* L. Asteraceae (Compositae) Aster Family. World Weeds: Natural Histories and Distribution. **John Wiley & Sons, Inc.**, New York, p. 822–827, 1997.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006**. Disponível em: < http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2016.

IRERI, L. N. et al. The potential of the extracts of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae), *Acalypha fruticosa* Forssk (Euphorbiaceae) and *Tarhonanthus camphoratus* L. (Compositae) against *Phlebotomus duboscqi* Neveu Lemaire (Diptera: Psychodidae), the vector for *Leishmania major* Yakimoff and Schokhor. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 47, n. 3, p. 168-174, 2010.

JUNGES, E. et al. Efeito do Extrato Aquoso e do Óleo Essencial de *Tagetes minuta* Aplicados ao solo sobre a Penetração de J2 de *Meloidogyne incognita* em Tomateiros. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, pag. 1027-1030, 2009.

KARIMIAN, P.; KAVOOSI, G.; Amirghofran Z. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. V. 4, n. 3, pag. 219-227, 2014.

KÉÏTA, S. M. et al. Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 4, p. 355-364, 2000.

KIM, T.; HEALD, C.W. Inducing inference rules for the classification of bovine mastitis. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 23, p. 27-42, 1999.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. **Ludwigshaven: BASF**, v.2, p. 355-6, 1992.

KOSSAIBATI, M. A.; ESSLEMONT, R. J. The cost of production diseases in dairy herds in England. **The Veterinary Journal**, v. 154, p. 41-51, 1997.

LEDERER, J. **Enciclopédia moderna de higiene alimentar**: intoxicações alimentares. São Paulo : Manole, p. 205-215, 1991.

LIMA, W. P. et al. Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae) em camundongos swiss e avaliação da toxicidade e do efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 638-641, 2009.

LORENZI, H. Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas. **Nova Odessa**, SP. 2ª Ed. 2008.

MATSUMOTO, M. N. et al. Mulching with *Pennisetum purpureum* and other cultural practices for management of *Meloidogyne javanica* on tomato under greenhouse conditions. **Nematologia Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 101-104, 2002.

MEDEIROS, E. S. et al. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus spp.* isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 7, jul. 2009.

MESHKATALSADAT, H. M. et al. Chemical characterization of volatile components of *Tagetes minuta* L. cultivated in south west of Iran by nano scale injection. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**. v. 5, n. 1, 2010.

MOGHADDAM, M.; OMIDBIAGI, R; SEFIDKON, F. Changes in Content and Chemical Composition of *Tagetes minuta* Oil at Various Harvest Times. **Journal of Essential Oil Research**, 1.ed., v. 19, p. 18-20, 2005.

NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 119-124, mai./ago. 2001.

NERO, L. A. et al. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 391-393, abr./jun. 2007.

PALOMINO, J. C. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 9, n. 1, p. 48-59, 2003.

PRIBUL, B. R. et al . Resistência bacteriana e ação das bacteriocinas de *Lactobacillus* spp em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 63, n. 3, jun. 2011.

RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.**10. ed. 2010.

RIET-CORREA, F. **Doenças de ruminantes e equinos.** 2. ed. São Paulo: Varela, 2001.

RUFFINENGO, S. et al. Essential oils toxicity related to *Varroa destructor* and *Apis mellifera* under laboratory conditions. **Zootecnia Tropical**, v. 25, n. 1. p. 63-69, 2007.

SAHOTA, A. **Global Organic Food & Drink Market**. 2011. Disponível em: <www.organicmonitor.com>. Acesso em: 01 jan. 2016.

SANCHES, C. R.; SOARES, J. P. G. Certificação da produção orgânica de leite. In: Soares, J. P. G. (Edit.). **Curso cadeia produtiva do leite orgânico** [recurso eletrônico]. Brasília,DF: Embrapa, 2012.

SCHIAVON, D. B. A. **Aplicação de um fitoterápico a base de *Tagetes minuta* na anti-sepsia de tetos de vacas pós-ordenha**. 2011. 39 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

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

SCRAMIN, S. et al. Utilização de extratos vegetais no controle de dois nematóides fitopatogênicos—*Meloidogyne incognita* e *Tylenchulus semipenetrans*. **EMBRAPA-CNPDA**, Documentos 16, p. 46, 1990.

SENATORE, F. et al. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (*Asteraceae*) essential oil with different chemical composition. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, n. 6, p. 574–578, 2004.

SIMS, B.; DIJKMAN, J.; ZAMBRANA, L. **Logros del proyecto de mejoramiento de traccion animal 1997-2000**. Cochabamba, Bolívia. II Seminário–Tallerde PROMETA, UMSS. p. 13-38, 2000.

SINGH, A. et al. Essential Oil Quality and Yield with Respect to Harvest Index in *Tagetes minuta* Cultivated in Sub Tropical Plains of North India. **Journal of Essential Oil Research**, 4. ed., v. 18, p. 362-365, 2003.

SINGH, V.; SINGH, B.; KAUL, V. K. Domestication of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) as a potential economic crop in western Himalaya and north Indian plains. **Econ. Bot.**, n. 57, p. 535–544, 2003.

SMITH, B. P. **Large animal internal medicine**. 4.ed. 2009.

SOARES, J. P. G. **Sistemas orgânicos de produção animal**. Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia – Seropédica. 12p. 2012.

SOARES, J. P. G. et al. Produção orgânica de leite: Desafios e perspectivas. In: Marcondes, M.I. et al.,(Org.). **Anais do III Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira e I Simpósio Internacional de Bovinocultura Leiteira**. 1. ed. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, v. 1 , p. 13-43, 2011.

SOUZA, C. A. S.; AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L.- *Compositae* (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 1-9, 2000.

THAPPA, R. K; et al. Changes in Chemical Composition of *Tagetes minuta* Oil at Various Stages of Flowering and Fruiting. **Journal of Essential Oil Research**, 5. ed., v. 5, p. 375-379, 1992.

VIEIRA, L. R. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Blainvillea biaristata* DC. *Tagetes minuta* L. e *Gochnatia oligocephala* (Gardner) Cabrera. **III Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco – PLAMEVASF**. Petrolina, PE. 2011. Disponível em: <http://www.plamevasf.com/uploads/7/8/9/0/7890742/___resumo.444-114-2011114.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2016.

VIEIRA, T. S. W. J. et al. Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 791-796, 2012.

WANZALA, W. Ethnobotanicals for Management of the Brown Ear Tick, *Rhipicephalus appendiculatus* in Western Kenya. Wageningen University and Research Centre, Wageningen. **Printed by Ponsen & Looijen**, Wageningen, The Netherlands, 231p. 2009.

WANZALA, W.; OGOMA, S. B. Chemical composition and mosquito repellency of essential oil of *Tagetes minuta* from the southern slopes of Mount Elgon in western Kenya. **J. Essent. Oil Bear. Plants**, v. 16, p. 216–332, 2013.

WANZALA, W. et al. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against Selected Plant Pathogenic Bacteria. **International Journal of Microbiology**, v. 2016, p. 9, 2016.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 1. ed., v. 16, p. 41-66, 1998.

WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F. Emergence and transfer of antibiotic resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 84 (Suppl.), p. E151-E155, 2001.

WIEST, J. M. et al. Inibição e inativação in vitro de *Salmonella spp.* com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 119- 127, 2009.

WOODWARD, K. N. Hypersensitivity in humans and exposure to veterinary drugs. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 33, n. 2, p. 168-172, 1991.

ZHU, H. et al. Bactericidal effects of *Cinnamon cassia* oil against bovine mastitis bacterial pathogens. **Food Control.**, v. 66, p. 291-299, ago. 2016.

5 Avaliação *in vitro* do óleo essencial de chinchilho (*Tagetes minuta* L.) no tratamento da mastite bovina

SPERANDIO, J.¹; VELEIRINHO, B.¹; HONORATO, L.A.¹; CAMPESTRINI, L.H.¹;
MACHADO FILHO, L.C.P.¹; KUHNEN, S.¹

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, CEP: 88040-900, Florianópolis – SC *Autor para correspondência: shirley.kuhnen@ufsc.br

RESUMO: A mastite é a doença mais comum em propriedades leiteiras, acarretando em importantes prejuízos econômicos. A inflamação da glândula mamária é causada principalmente por bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo uma doença de difícil tratamento. O uso de produtos naturais no combate à mastite reduz o impacto negativo do uso de antibióticos. Com isso, no presente trabalho avaliamos a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. contra *S. aureus* e *E. coli* e a citotoxicidade sobre células epiteliais mamárias bovina da linhagem MAC-T. A análise qualitativa do óleo por GC-MS revelou cis-tagetona (24,24%), dihidrotagetona (16,65%), 1,3,6-octatrieno-3,7-Dimetil-E (13,61%), trans-ocimenona (13,52%) e cis-ocimenona (10,06%) como compostos majoritários. A atividade antimicrobiana determinada pela técnica de microdiluição em caldo, revelou a concentração inibitória mínima (CIM) de 1 mg/mL para a cepa padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) e 5 isolados de leite mastítico, além de uma cepa multirresistente (ATCC 33592) e 3 mg/mL para a cepa padrão de *Escherichia coli* (ATCC 8739) e dois isolados de leite mastítico. No entanto, forte efeito citotóxico do óleo sobre as células da linhagem MAC-T foi encontrado. Concentrações a partir de 10 µg/mL do óleo essencial resultaram em mais de 90% de morte das células, estando o IC50 de 26,24 µg/mL muito abaixo da concentração com atividade antimicrobiana. Portanto, os resultados encontrados sugerem que apesar da atividade antimicrobiana contra os principais agentes causadores da mastite bovina, incluindo uma cepa multirresistente, a utilização do óleo de *T. minuta* como medicamento intramamário não é recomendada devido a sua elevada citotoxicidade. Deste modo, seu uso pode ser indicado para a região externa ao úbere ou para limpeza dos utensílios utilizados no manejo da ordenha.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, linhagem MAC-T, produtos naturais

ABSTRACT: The *in vitro* Effects of Southern Cone Marigold (*Tagetes minuta* L.) Essential Oil on Etiological Agents of Bovine Mastitis

Mastitis is the most common disease in dairy farms which can lead to economic problems. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* are the major etiological agents found. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of *Tagetes minuta* L. essential oil against *S. aureus* and *E. coli*, and its cytotoxicity to the bovine mammary epithelial cells (MAC-T line). The qualitative analysis of the oil by GC-MS identified cis-tagetone (24.24%), dihydrotagetone (16.65%), 1,3,6-Octatriene 3,7-Dimethyl-E (13.61%); trans-ocimenone (13.52%) and cis-ocimenone (10.06%) as major compounds. Antimicrobial activity was determined by broth microdilution technique. It revealed the minimum inhibitory concentration (MIC) of 1 mg/mL for the standard strain of *S. aureus* (ATCC 25923) and five bacterias isolated from mastitic milk, including multiresistant strain (ATCC 33592); and 3 mg/ml for the standard strain of *E. coli* (ATCC 8739) and two bacterias isolated from mastitic milk. However, strong citotoxic effect on the cells of the MAC-T strain was found. Concentrations from 10 µg/mL of the essential oil resulted in over 90% of death of cells. The IC₅₀ of 26.24 µg/mL concentration was found, but it is far below compared with antimicrobial activity. Therefore, the results suggest that although the antimicrobial activity was identified against the main agents of bovine mastitis, including multidrug-resistant strains, the use of *T. minuta* oil as intramammary drug is not recommended due to its high cytotoxicity. Thus, its use may be suggested for the outer region of the udder or to cleaning tools used in the milking time.

Key words: antimicrobial activity, MAC-T line, natural products.

INTRODUÇÃO

A mastite é a inflamação do parênquima da glândula mamária, sendo caracterizada por variadas mudanças físicas e químicas no leite, além de alterações histológicas. Tal infecção é causada comumente por bactérias, além de fungos e algas (Watts, 1998).

Os agentes etiológicos podem ser classificados em organismos contagiosos e organismos causadores de mastite ambiental. Os organismos contagiosos são aqueles transmitidos por vacas que apresentam glândulas mamárias infectadas para vacas sadias. Dentre tais organismos, a bactéria *Staphylococcus aureus* é a de maior ocorrência (Smith, 2009). Os organismos classificados como ambientais são aqueles presentes no ambiente onde está a vaca, como o solo, a água, o esterco, a cama, etc. Neste grupo, a bactéria mais patogênica é a *Escherichia coli* (Divers & Peek, 2008).

Por se tratar de uma doença comumente causada por bactérias, a classe medicamentosa mais utilizada para o tratamento da mastite é a dos antibióticos (Smith, 2009; Divers & Peek, 2008; Bradley, 2002; Blowey & Edmondson, 1999). No entanto, o uso extensivo de antibióticos no tratamento da mastite tornou-se um problema de saúde pública. Há uma grande preocupação no seu uso indiscriminado e na resistência das bactérias aos medicamentos que podem se perpetuar ao longo da cadeia produtiva do leite até à mesa do consumidor (White & Mcdermott, 2001).

Avaliando a resistência bacteriana frente à antibióticos, Medeiros et al. (2009) encontraram que dos 291 isolados de *Staphylococcus spp.*, 181 eram multirresistentes aos diferentes fármacos estudados. Já Vieira et al. (2012) encontraram resíduos de antibióticos em 19% de 79 amostras de leite pasteurizado tipo B coletadas em estabelecimentos comerciais no Estado do Paraná. Portanto, embora haja uma legislação regulamentando a presença de tais resíduos, não há rigor por parte dos produtores em cumprí-la e, tampouco, uma fiscalização eficiente por parte de órgãos fiscalizadores. Em contraponto a esse cenário, a produção de alimentos orgânicos vem crescendo em todo o mundo, inclusive no Brasil, e tem como objetivo atender uma fração da população que se preocupa com a origem do produto que está na sua mesa (Sahota, 2011).

No Brasil, atualmente, são produzidos em torno de 6,8 milhões de litros de leite orgânico ao ano, o equivalente a 0,02% da produção anual do alimento (28 bilhões de litros em 2010)

(Soares et al., 2011). Sanches & Soares (2012) destacam que o manejo sanitário, sobretudo da mastite, é um grande entrave à produção orgânica leiteira, uma vez que o leite de vacas medicadas deve ser descartado durante duas vezes o período de tempo de carência do medicamento (BRASIL, 2011). Com isso, alguns trabalhos têm se proposto a investigar o uso de plantas medicinais, incluindo seus óleos essenciais, para o tratamento da mastite bovina. Dentre eles, destacam-se o estudo da atividade antibacteriana do óleo de canela-da-china (*Cinnamon cassia*) e de capim-limão (*Cymbopogon citrates*) contra patógenos causadores de mastite (Zhu et al., 2016; Aiemsaard et al., 2011).

A planta medicinal *Tagetes minuta* é nativa da América do Sul e popularmente conhecida como chinchilho (Holm et al., 1997). É uma planta pouco ramificada, podendo chegar até 2 metros de altura, e que se multiplica apenas por sementes. Suas flores são constituídas por pequenos capítulos amarelos que se reúnem em panículas axilares e terminais. Suas folhas são compostas, contendo de 3 a 9 folíolos glandulosos. É conhecida pelo forte odor proveniente do óleo produzido por glândulas presentes nas folhas (Lorenzi, 2008).

Os extratos e o óleo da *T. minuta* vêm sendo estudados por suas propriedades medicinais (Lorenzi, 2008), cosméticas (Cornelius & Wycliffe, 2016), inseticida (Ileri et al., 2010; Cestari et al., 2004; Kéïta et al., 2000), larvicida (Lima et al., 2009; Scramim et al., 1990; Furtado et al., 2005), repelente (Gillij et al., 2008), antiparasitária (Furtado et al., 2010; Ruffinengo et al., 2007; Sims et al., 2000), nematicida (Junges et al., 2009; Matsumoto et al., 2002), antioxidante, anti-inflamatória (Karimian et al., 2014; Holm et al., 1997) e antimicrobiana (Vieira et al., 2011; Schuch et al., 2008; Wiest et al., 2009; Senatore et al., 2004; Souza et al., 2000). Apesar do seu potencial como antimicrobiano, nenhum dos estudos realizados com *T. minuta* incluiu a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato ou do óleo essencial ao tecido da glândula mamária, visando o seu uso intramamário. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. frente a duas principais bactérias causadoras de mastite bovina, *i.e.*, *S. aureus* e *E. coli*, assim como a citotoxicidade sobre células epiteliais da glândula mamária bovina da linhagem MAC-T.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do óleo de *Tagetes minuta* L.

Sementes de *Tagetes minuta* L. foram adquiridas comercialmente e as mudas obtidas transferidas para o solo da Fazenda Experimental da Ressacada, da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, SC). As plantas não apresentaram ataques por insetos, tendo sido realizado apenas o manejo preventivo com a pulverização de óleo de neen (3 vezes) e aplicação de biofertilizante (6 vezes) a base de urina de vaca ao longo da permanência das plantas no campo. A coleta foi realizada em dezembro de 2015, cerca de 8 meses após o transplante das mudas e estavam em floração. Logo após a coleta, as plantas foram pesadas e acondicionadas em estufa de ventilação forçada, por um período de 24 h e depois armazenadas em freezer - 80°C para posterior extração do óleo.

A extração do óleo essencial foi feita por hidrodestilação, em aparelho Clevenger, conforme metodologia descrita por Mechkovski & Akerele (1992), pelo período de 2 h. Foram utilizadas cerca de 70 gramas de matéria seca da parte aérea da planta e 1000 mL de água em um balão volumétrico. O rendimento de óleo foi determinado pela graduação da bureta do aparelho Clevenger, levando em consideração o peso da planta no balão de extração e a quantidade de óleo obtida. O óleo foi armazenado à -20°C até a realização das análises pretendidas.

Determinação dos compostos químicos do óleo essencial

A determinação da composição química do óleo extraído de *T. minuta* foi realizada por cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu – Japão modelo GCMS-QP2010) de acordo com a metodologia descrita por EL-Deeb et al. (2004). Para isso, foi utilizada uma coluna capilar de sílica RTX[®]-5MS (Restek – Japão; 30 m x 0.25 mm) e hélio como gás de arraste em um fluxo de 25 mL/min. A temperatura utilizada variou de 60 a 200°C, com um aumento de 10°C/min. A injeção foi realizada em modo split: 1:50, contendo 200 uL da amostra (200 uL + 400 uL de hexano). A identificação dos compostos foi realizada considerando os resultados obtidos em bibliotecas de massa (software GCMSolution).

Avaliação da atividade antimicrobiana

Os ensaios antimicrobianos foram realizados utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo (modificado de Sperotto et al., 2012), com as cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e 5 isolados de campo provenientes de leite mastítico, 1 cepa de *S. aureus* ATCC 33592 multiresistente; *Escherichia coli* ATCC 8739 e dois isolados de campo de *E. coli*. Os isolados bacterianos foram semeados por plaquemanto em superfície, em placas de Petri, com meio Agar Muller Hinton e as placas incubadas à $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. A densidade populacional inicial dos inóculos foi padronizada utilizando-se o controle de turbidez da escala McFarland de 0,5, o qual equivale a uma suspensão contendo de 10^7 a 10^8 UFC/mL. Nos testes, foi utilizada a diluição de 10^5 UFC/mL do inóculo em solução salina (0,9%).

Os testes antimicrobianos foram realizados de acordo com a metodologia descrita na Norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) para determinação da concentração mínima inibitória (CIM). O óleo essencial foi preparado por emulsificação, com etanol (8%), em diferentes concentrações que variaram de 30 a 0,01 mg/mL. Para a realização do ensaio, em cada poço de uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 100 μL da emulsão, 100 μL de caldo Muller Hinton e 10 μL do inóculo (10^5 UFC/mL). A placa foi acondicionada à $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por cerca de 18 a 24 h. Em todos os ensaios, incluiu-se os controles negativo que consistiram do (a) inóculo + meio Muller Hinton e (b) as diferentes concentrações da emulsão + caldo Muller Hinton. O caldo sem bactéria foi utilizado como controle estéril. Após o período de incubação, as absorbâncias foram determinadas a 600 nm em um leitor de microplacas (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc) e a porcentagem de redução do crescimento bacteriano calculada conforme a equação:

$$\text{ICM (\%)} = [1 - (A_c/A_0)] \times 100$$

onde: ICM representa a inibição do crescimento microbiano, A_c representa a absorbância da concentração de óleo testada subtraída do valor da absorbância da mesma concentração do óleo sem a adição do inóculo e A_0 representa a média das absorbâncias do controle de crescimento microbiano (sem óleo) (Gudiña et al., 2010). O resultado quantifica a porcentagem de células microbianas que foram inibidas pela ação do óleo essencial. Estabeleceu-se que a concentração que apresentasse um percentual de inibição superior a 80% seria considerada

a concentração inibitória mínima (CIM). Para uma confirmação visual, após a leitura dos valores de absorbância, utilizou-se o revelador resazurina (100 µg/mL). Foram adicionados 50 µL do revelador em cada um dos poços das microplacas. No decorrer de 30 min para *S. aureus* e 2 h para *E. coli*, foi realizada a leitura que consistiu na avaliação das cores azul, representando ausência de crescimento bacteriano e rosa, representando a presença de crescimento bacteriano. Este processo ocorre através de uma reação de redução da resazurina em resarufina (Palomino et al., 2002).

Avaliação da citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado sobre células epiteliais da glândula mamária bovina da linhagem MAC-T para verificar a concentração inibitória de 50% de crescimento celular (IC50). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) e suplementadas com 20% de soro fetal bovino (SFB), 4 mM de L-glutamina, 4,5 g/L de glicose, 1 mM piruvato de sódio, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 5 µg/mL de insulina e 1 µg/mL de hidrocortisona. O meio foi trocado a cada 48 h e as células mantidas em cultura à 37°C, e atmosfera modificada a 5% CO₂. Quando as células atingiam confluência, foram tratadas com 0,25% de tripsina, lavadas com PBS e contadas em câmara de Neubauer. Os testes foram executados em microplacas de 96 poços e foi utilizado a concentração de 10.000 células por poço. A citotoxicidade do óleo sobre as MAC-T foi realizada pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), com modificações. Para isso, ao meio de cultura contendo as células aderentes, foram acrescentadas diferentes concentrações do óleo essencial (0,1 a 1000 µg/mL) emulsificados em DMSO (dimetilsulfóxido; 0,5%) e DMEM (100µL/poço). Após 24 h de incubação à 37°C em atmosfera modificada contendo 5% CO₂, os poços foram lavados duas vezes com PBS (100 µL/poço) e o MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado e incubado por mais 2 h. As microplacas foram cobertas por papel filme, uma vez que o óleo demonstrou alta volatilidade e fácil contaminação dos diferentes tratamentos. Neste ensaio, quantificou-se quanto do MTT presente no meio foi metabolizado à formazan (cristais de cor azul) (Reuter, 2008). Assim, a quantidade de formazan foi medida por espectrofotometria em leitor de microplacas à 546 nm (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc) e considerada diretamente proporcional ao número de células viáveis. O controle (*i.e.* meio fresco contendo 0,5% de DMSO) foi considerado como 100% de células viáveis. Os experimentos foram realizados em

triplicata. O cálculo do IC50 foi feito através do programa Prism 5 (Graph Phad, San Diego, CA).

Análise estatística

Para os ensaios antimicrobianos, a variável % de inibição foi analisada através do procedimento MIXED do SAS (versão 9.2). Para análise de *E. coli* o modelo incluiu o efeito fixo do isolado (1 grau de liberdade = GL), concentração (7 GL) e sua interação (7 GL). Para *S. aureus*, os efeitos fixos de isolado (4 GL) e concentração (7 GL). Comparações pareadas foram determinadas através do LSMEANS. Foram utilizadas as médias de dois experimentos independentes, com cinco réplicas cada. Na análise da cepa de *S. aureus* multiresistente foram testadas 8 concentrações (7GL) e realizada uma repetição do experimento. Para o teste de citotoxicidade, os dados foram analisados por ANOVA com $P < 0,01$ através do programa Prism 5 (Graph Phad, San Diego, CA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição química do óleo de *T. minuta* em estudo está mostrada na Tabela 1. Os componentes majoritários foram cis-tagetona (24,24%), dihidrotagetona (16,65%), 1,3,6-octatrieno-3,7-dimetil-E (13,61%), trans-ocimenona (13,52%) e cis-ocimenona (10,06%). Tais resultados são diferentes dos encontrados por Garcia et al. (2012) que verificaram em amostras provenientes da região Centro-Oeste do Brasil maiores teores de dihidrotagetona (54,21%), limoneno (6,96%), tagetona (6,73%) e β -Ocimeno (5,11%). Por outro lado, Gil et al. (2000) encontraram, em amostras da Argentina, maiores quantidades de dihidrotagetona, a-felandrena, limoneno, o-cimeno, b-ocimeno, tagetona e tagetenona. Estes resultados demonstram, portanto, que a composição química do óleo varia muito com o local do cultivo. Em relação ao rendimento do óleo essencial das amostras em estudo, encontrou-se 1,57%. Singh et al. (2006) encontraram resultados similares quando avaliaram o rendimento do óleo em plantas de *T. minuta* cultivadas em região subtropical do norte da Índia.

A Figura 1 mostra os resultados encontrados nos ensaios antimicrobianos. A concentração inibitória mínima (CIM) para *S. aureus* foi de 1 mg/mL, tendo sido confirmada na revelação da placa com o corante resazurina (Figura 2). Este valor está acima do encontrado por Senatore et al. (2004), que testaram o óleo essencial de *T. minuta* proveniente de diferentes Países para esta mesma espécie de bactéria. Os valores de CIM encontrados pelos autores foram de 25, 50 e 100 µg/mL, para amostras do Reino Unido, Egito e África do Sul, respectivamente. Enquanto o óleo do Reino Unido apresentava maiores teores de dihidrotagetona (34,3%), cis-tagetona (23%) e trans-tagetona (17,1%), os óleos essenciais originários do Egito e África do Sul possuíam maiores teores de cis-β-ocimenona (50,9 e 32,2%, respectivamente). Já Shizari et al. (2014), avaliando a atividade do óleo de *T. minuta* cultivado no Irã, verificaram que a CIM para *S. aureus* foi de 67 ± 8 µg/mL, resultado também muito inferior ao encontrado no presente estudo. O óleo testado possuía maiores teores de dihidrotagetona (33,9%), E-ocimenona (19,9%) e tagetona (16,1%).

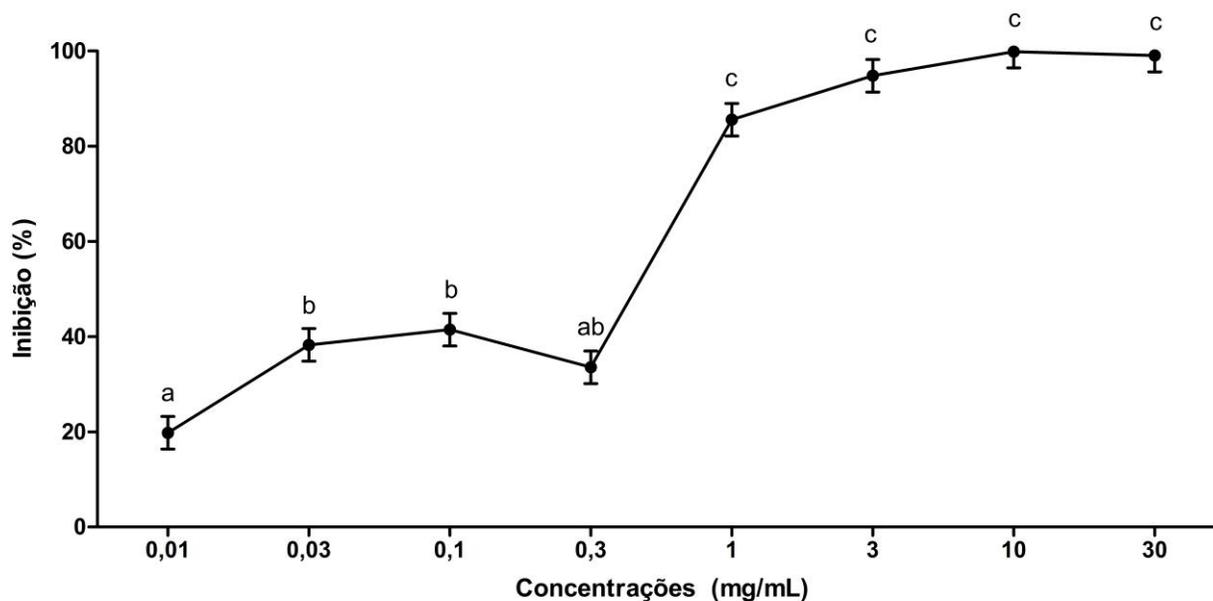


FIGURA 1. Concentração inibitória mínima (mg/mL) (média +/- desvio padrão) do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre *Staphylococcus aureus*. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre as concentrações ($P < 0,01$).

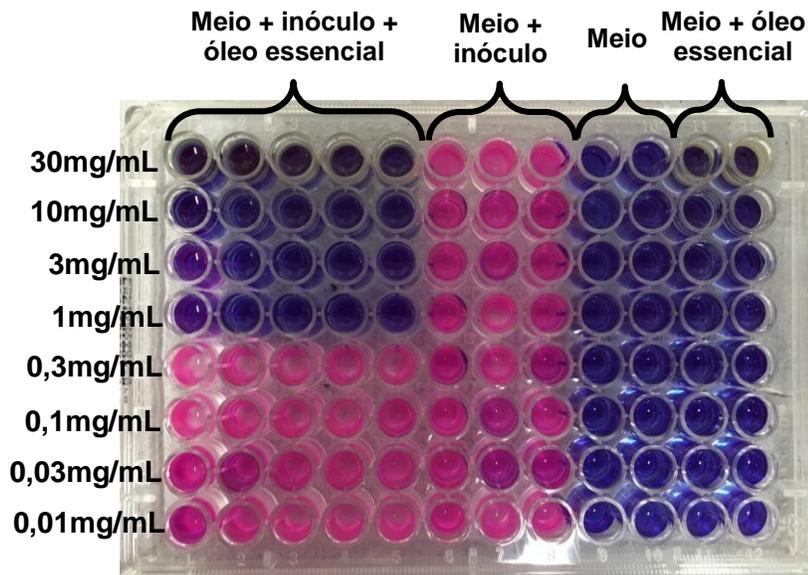


FIGURA 2. Efeito do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* após adição do corante resazurina (100 $\mu\text{g/mL}$). A presença de cor azul representa ausência de crescimento bacteriano e de cor rosa presença de crescimento bacteriano.

Para *E. coli*, foi observada diferença entre a CIM encontrada para a cepa padrão ATCC 8739 (1 mg/mL) e para o isolado de campo (3 mg/mL) (Figura 3). Os resultados encontrados através da leitura espectrofotométrica foram confirmados com a revelação das placas com resazurina (Figura 4). Tais diferenças podem ser, em parte, explicadas pela diversidade genética entre elas, acarretando em resistência distinta. Um isolado de campo é naturalmente mais agressivo quando comparada a uma cepa de referência. Contudo, tais resultados de CIM se diferenciam dos encontrados também por Senatore et al. (2004). Esses autores encontraram uma CIM de 100 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli*. Da mesma forma, Shizari et al. (2014) encontraram 90% de inibição destas bactérias com $165 \pm 9 \mu\text{g/mL}$ de óleo, valor muito inferior ao encontrado no presente estudo. Estes valores superiores de CIM, do presente estudo, podem ser decorrentes da variação existente da composição química do óleo. Os diversos estudos que avaliaram o óleo essencial da *Tagetes minuta* por GC-MS indicaram que os terpenos presentes variam em quantidade e qualidade, de acordo com o estágio de crescimento da planta na hora do corte (Moghaddam et al., 2007; Thappa et al., 1993), a localização geográfica, os nutrientes presentes no solo (Singh et al., 2003; Chalchat et al., 1995; Graven et al., 1991), a parte da planta colhida (Chamorro et al., 2008), o clima da região,

a intensidade de luz solar, o método de colheita e o método utilizado para extração do óleo (Wanzala, 2009; Chalchat et al., 1995).

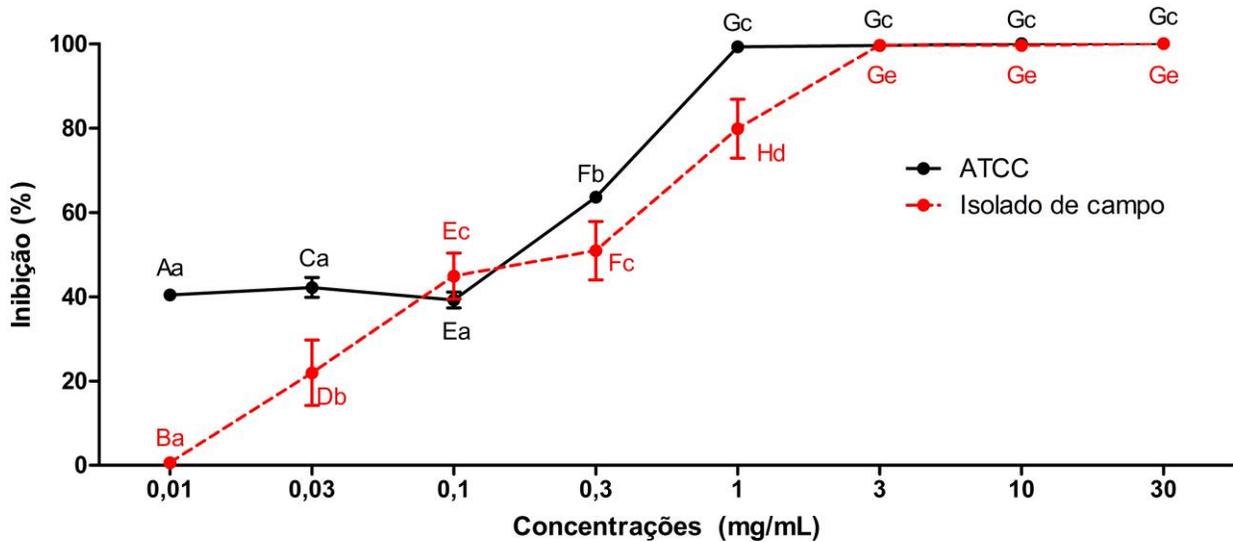


FIGURA 3. Concentração inibitória mínima (mg/mL) (média +/- desvio padrão) do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre *Escherichia coli*. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre as concentrações e letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre as bactérias ($P < 0,001$).

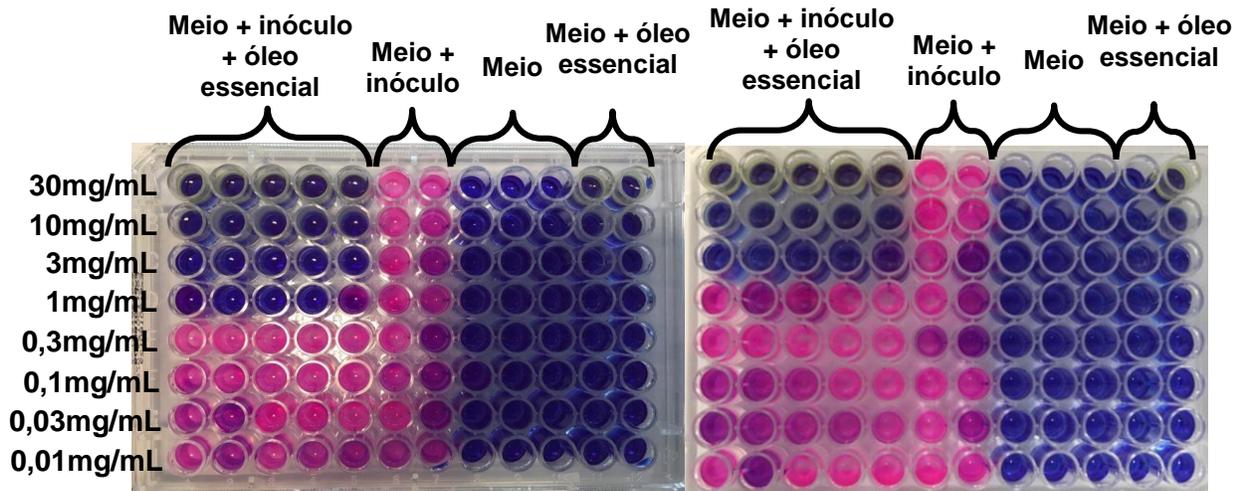


FIGURA 4. Efeito do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre o crescimento de *Escherichia coli* ATCC (à esquerda) e de campo (à direita) após adição do corante resazurina (100 $\mu\text{g/mL}$). A presença de cor azul representa ausência de crescimento bacteriano e de cor rosa presença de crescimento bacteriano.

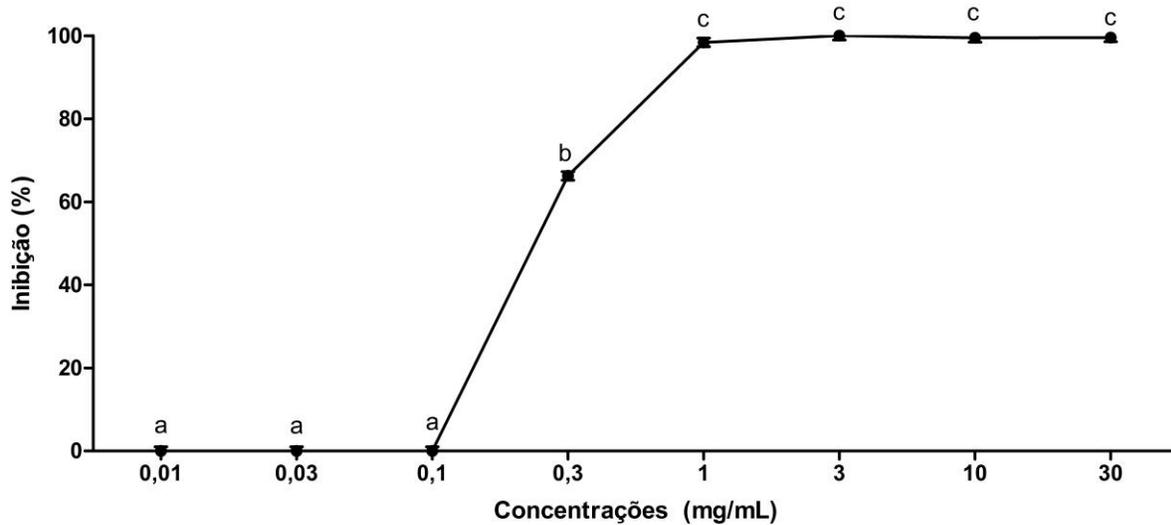


FIGURA 5. Concentração inibitória mínima (mg/mL) (média +/- desvio padrão) do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 33592 multiresistente. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre as concentrações ($P < 0,01$).

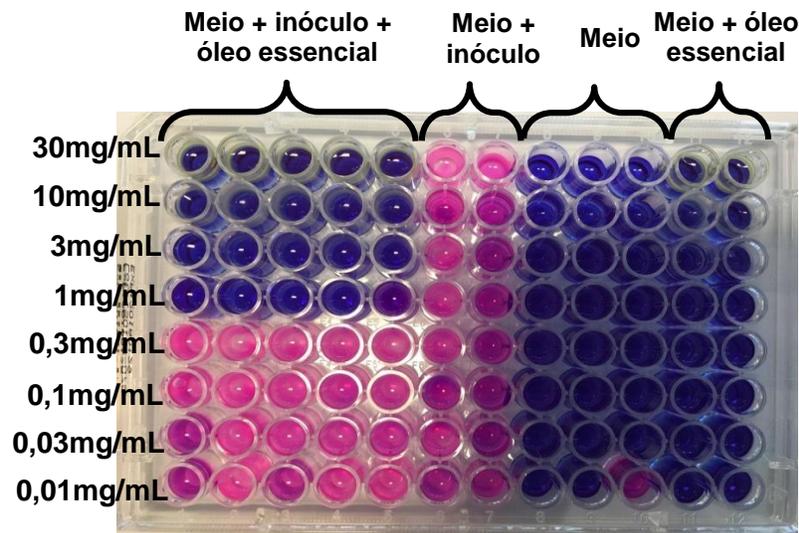


FIGURA 6. Efeito do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC multiresistente após adição do corante resazurina ($100 \mu\text{g/mL}$). A presença de cor azul representa ausência de crescimento bacteriano e de cor rosa presença de crescimento bacteriano.

No teste com a cepa multirresistente de *S. aureus* ATCC 33592, a CIM encontrada foi de 1 mg/mL (Figura 5), de maneira similar a cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e os isolados de campo (Figura 1). Esse resultado gera uma expectativa promissora quanto ao

desenvolvimento de um produto que possa ser usado em alguns casos de resistência, embora o seu mecanismo de ação precisará ser investigado.

Quanto ao efeito do óleo essencial sobre as células epiteliais da glândula mamária, verificou-se forte citotoxicidade com uma inibição de mais de 90% do crescimento celular a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7). O valor encontrado de IC50 do óleo sobre esse tipo celular foi de apenas 26,24 $\mu\text{g/mL}$. Em outros tipos celulares (células KB e HepG2), as concentrações do óleo de *Tagetes* que reduziram significativamente a viabilidade celular foram 50–200 $\mu\text{g/mL}$ (Shizari et al. 2014). Por outro lado, Karimian et al. (2014) encontraram atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *T. minuta*, originário do Irã, utilizando macrófagos como modelo na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Os principais componentes do óleo de *T. minuta* estudado pelos autores eram dihidrotagetona (33.86%), E-ocimenona (19.92%), tagetona (16.15%), cis- β -ocimenona (7.94%) e Z-ocimenona (5.27%). Neste estudo, o óleo reduziu significativamente a oxidação de NADH, a síntese de óxido nítrico e a expressão do mRNA do TNF- α . Tal resultado indica que o produto possui um potencial de modulação ou diminuição de respostas imunológicas, sugerindo a possibilidade de uso interno. No entanto, estes efeitos devem estar relacionados a uma composição química distinta da amostra em estudo, devendo-se, portanto, aprofundar o estudo com os compostos do óleo para entender quais são os principais terpenos responsáveis pelas atividades observadas.

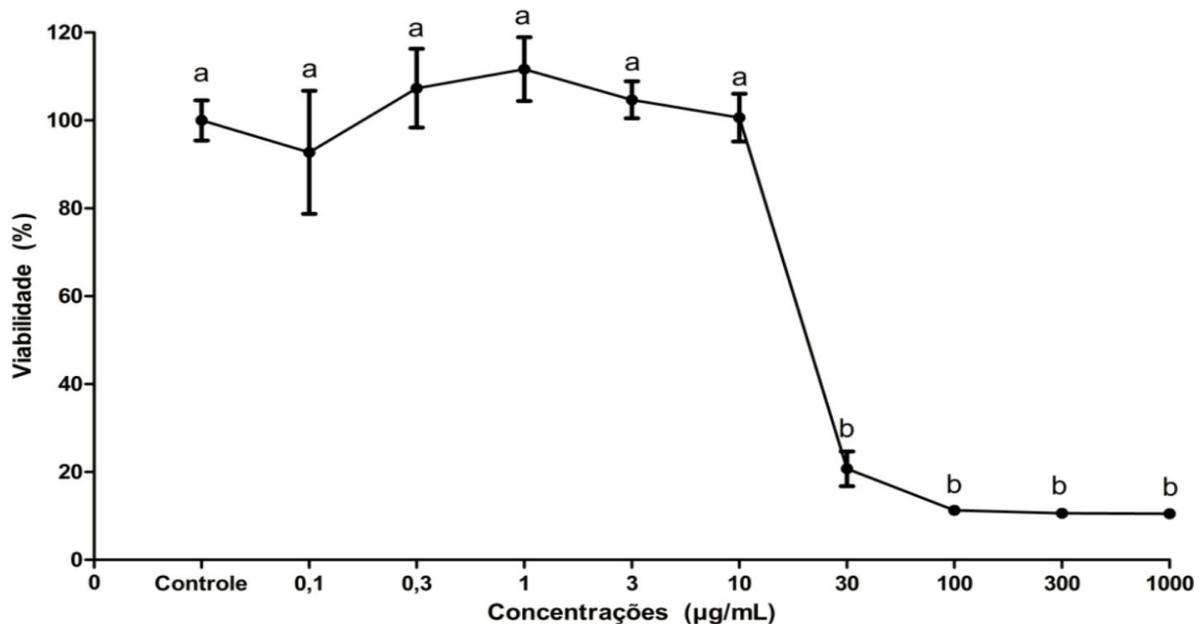


FIGURA 7. Citotoxicidade ($\mu\text{g/mL}$) (média \pm desvio padrão) do óleo essencial de *Tagetes minuta* em células epiteliais da glândula mamária MAC-T. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre as concentrações ($P < 0,01$).

Conclui-se, a partir dos resultados obtidos, que o óleo essencial de *T. minuta* possui atividade antimicrobiana para as duas principais espécies causadoras de mastite, embora em concentrações superiores as relatadas na literatura, possivelmente devido a uma composição química distinta do óleo essencial em estudo. Por outro lado, mesmo em concentrações muito baixas, forte efeito citotóxico foi encontrado sobre as células MAC-T, sugerindo um potencial dano ao tecido se o seu emprego for intramamário. Sugere-se estudos futuros envolvendo a encapsulação do óleo visando a elaboração de um possível produto para a utilização externa (i.e. teto do animal) em concentrações intermediárias (entre 0,3 mg/mL e 3 mg/mL) impedindo a entrada de bactérias no sistema mamário da vaca, ou para desinfecção de insumos utilizados na ordenha.

TABELA 1. Composição química do óleo de *T. minuta* em estudo.

Pico	Nome	Área relativa (%)	Rt	M ⁺	Pico Base
1	Dicloropropilacetileno	0,15	4,441	106	91
2	Curazol-2E4MZ	0,35	5,048	110	95
3	(+)-Sabineno	0,16	5,802	136	93
4	(+)-β-Pineno	0,17	5,894	136	93
5	1, 3, 6-Octatrieno-3, 7-Dimetil-E	13,61	6,611	136	93
6	1, 3, 7-Octatrieno-3, 7-Dimetil-E	0,14	6,771	136	93
7	Dihidrotagetona	19,65	6,882	154	85
8	Neral	0,39	7,186	152	83
9	2-Ciclohexen-1-ol	1,19	7,456	152	110
10	β-Linalol	0,37	7,516	154	93
11	2,2,4,5-Tetrametil-2H imidazol	0,38	7,736	124	83
12	α-Linalol-2-Penten-4-ona	0,78	7,968	154	81
13	5-Isopropil-3,3-dimetil-2-metileno, 2, 3-dihidrofurano	0,33	8,074	152	137
14	Trans-Tagetona	2,04	8,190	152	95
15	Cis-Tagetona	24,24	8,346	152	95
16	Trans-Tagetona	0,51	8,458	152	95
17	Tetradec-(11E)-en-1-ol	0,31	8,536	212	82
18	Borneol	0,21	8,658	154	95
19	P-ment-1-en-4-ol	0,18	8,783	154	93
20	Biciclo [6.1.0] nonano,9-(1-metiletilideno)	0,64	8,947	164	93
21	Menta-1(+),8-dien-2-ol-trans ocimenona	0,26	9,075	152	109
22	Trans-Ocimenona	0,09	9,143	150	150
23	Cis-Ocimenona	10,06	9,469	150	135
24	Trans-Ocimenona	13,52	9,602	150	135
25	Espiro[4,5]Dec-8-en-7-ona, 1,8-dimetil-4(1-metiletil)	0,20	9,717	220	83
26	8-Oxabiciclo-[5.1.0]-Oct-5-en-2-ol-1, 4, 4-Trimetil	0,99	9,838	168	125
27	S-(+)-Isopiperitenona	1,76	10,127	150	82
28	α-Fenchil acetato	0,17	10,307	196	95
29	Biciclo [6.1.0]-nonano, 9-(1-metiletilideno)	0,15	10,491	164	93
30	(+)-Isodihidrocarvona	0,13	10,816	152	95
31	2H-2,4A-Etanonaftaleno, 1,3,4,5,6,7-hexahidro-2,5,5-trimetil	0,24	10,949	204	175
32	1,1, 4A-Trimetil-5, 6-Dimetileno-decahidronaftaleno	0,41	11,218	204	122
33	Etanol, 2-(3, 3-Dimetil biciclo[2.2.1]-hept-2-ilideno	0,21	11,416	166	166
34	Isoeugenil fenilacetato	2,45	11,780	282	164
35	Biciclo [7.2.0]-undec-4-eno, 4, 11, 11-Trimetil-8-metileno	1,22	12,246	204	91
36	α-cis-Bergamoteno	0,32	12,313	204	119
37	α-Humuleno	0,31	12,682	204	93
38	Sesquisabineno	0,51	12,973	204	93
39	D-Gemacreno	0,53	13,008	204	105
40	β-Bisaboleno	0,67	13,198	204	93

REFERÊNCIAS

- AIEMSAED, J. et al. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Res Vet Sci.**, v. 91, n. 3, p. 31-37, dec. 2011.
- BLOWEY, R. W.; EDMONDSON, P. **Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche: guía ilustrada y práctica.** Zaragoza (ES): Acribia, 26 cm ix, 208 p. 1999.
- BRADLEY, A. Bovine mastitis: An evolving disease. **Vet. J.**, n.164, p. 116–128, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.46, de 06 de outubro de 2011. Estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, bem como as listas de Substâncias Permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, na forma desta Instrução Normativa e dos seus Anexos I a VII. **Diário Oficial da União**, Brasília 07 de outubro de 2011. Seção 1.
- CESTARI, I. M. et al. Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, nov. 2004.
- CHALCHAT, J. C.; GARRY, R. P.; MUHAYIMANA, A. Essential oil of *Tagetes minuta* from Rwanda and France: chemical composition according to harvesting, location, growth stage and part of plant extracted. **J. Essent. Oil Res.** n. 7, p. 375–386, 1995.
- CHAMORRO, E. R. et al. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. **Journal of the Argentine Chemical Society**, v. 96, n. 1-2, p. 80-86, 2008.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.
- CORNELIUS, W. W.; WYCLIFFE, W. *Tagetes (Tagetes minuta) Oils.* In: Preedy, V.R. (Ed.), **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety.** Academic Press, p. 791–802, 2016.
- DIVERS, T. J.; PEEK, S. F. **Diseases of dairy cattle.** 2.ed. 2008.

EL-DEEB, K. S. Chemical Composition of the Essential Oil of *Tagetes Minuta* Growing In Saudi Arabia. **Saudi Pharmaceutical Journal**. Vol. 12, No. 1. Pag. 51 – 53. Jan, 2004.

FIORDALISI, S. et al. The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. **Journal of Dairy Science**. 99:1–11, nov. 2015.

FURTADO, F. N. et al. Atividade carrapaticida do óleo essencial de *Tagetes minuta*. **Revista Saúde**. 2010. Disponível em: <<http://revistas.ung.br/index.php/saude/article/view/688/777>>. Acesso em: 03 mar. 2016.

GARCIA, M. V. et al. Chemical identification of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its acaricidal effect on ticks. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 21, n. 4, p. 405-411, out, 2012.

GILLIJ, Y. G.; GLEISER, R. M.; ZYGADLO, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2507-2515, 2008.

GRAVEN, E. H. et al. Effect of Soil Type and Nutrient Status on the Yield and Composition of *Tagetes* Oil (*Tagetes minuta* L.). **Journal of Essential Oil Research**, 5. ed., v. 3, p. 303-307, 1990.

GUDIÑA, E.J. et al. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

HOLM, L. D. J. et al. *Tagetes minuta* L. Asteraceae (Compositae) Aster Family. World Weeds: Natural Histories and Distribution. **John Wiley & Sons, Inc.**, New York, p. 822–827, 1997.

JUNGES, E. et al. Efeito do Extrato Aquoso e do Óleo Essencial de *Tagetes minuta* Aplicados ao solo sobre a Penetração de J2 de *Meloidogyne incognita* em Tomateiros. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, pag. 1027-1030, 2009.

KARIMIAN, P.; KAVOOSI, G.; AMIRGHOFRAN Z. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. V. 4, n. 3, pag. 219-227, 2014.

- KÉÏTA, S. M. et al. Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 4, p. 355-364, 2000.
- LIMA, W. P. et al. Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae) em camundongos swiss e avaliação da toxicidade e do efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 638-641, 2009.
- LORENZI, H. Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas. **Nova Odessa**, SP. 2ª Ed. 2008.
- MATSUMOTO, M. N. et al. Mulching with *Pennisetum purpureum* and other cultural practices for management of *Meloidogyne javanica* on tomato under greenhouse conditions. **Nematologia Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 101-104, 2002.
- MECHKOVSKI, A.; AKERELE, C.O. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Switzerland: World Health Organization, 1992, 122p.
- MEDEIROS, E. S. et al. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus spp.* isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 7, jul. 2009.
- MOGHADDAM, M.; OMIDBIAGI, R; SEFIDKON, F. Changes in Content and Chemical Composition of *Tagetes minuta* Oil at Various Harvest Times. **Journal of Essential Oil Research**, 1.ed., v. 19, p. 18-20, 2005.
- PALOMINO, J. C. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.
- RERI, L. N. et al. The potential of the extracts of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae), *Acalypha fruticosa* Forssk (Euphorbiaceae) and *Tarhnanthus camphoratus* L. (Compositae) against *Phlebotomus duboscqi* Neveu Lemaire (Diptera: Psychodidae), the vector for *Leishmania major* Yakimoff and Schokhor. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 47, n. 3, p. 168-174, 2010.

REUTER, S. et al. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochemistry Pharmacology*, v. 76 p.1340-51. 2008.

RUFFINENGO, S. et al. Essential oils toxicity related to *Varroa destructor* and *Apis mellifera* under laboratory conditions. **Zootecnia Tropical**, v. 25, n. 1. p. 63-69, 2007.

SAHOTA, A. **Global Organic Food & Drink Market**. 2011. Disponível em: <www.organicmonitor.com>. Acesso em: 01 jan. 2016.

SANCHES, C. R.; SOARES, J. P. G. Certificação da produção orgânica de leite. In: Soares, J. P. G. (Edit.). **Curso cadeia produtiva do leite orgânico** [recurso eletrônico]. Brasília,DF: Embrapa, 2012.

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

Sci. Vet. 40:1052. 2012.

SCRAMIN, S. et al. Utilização de extratos vegetais no controle de dois nematóides fitopatogênicos—*Meloidogyne incognita* e *Tylenchulus semipenetrans*. **EMBRAPA-CNPDA**, Documentos 16, p. 46, 1990.

SENATORE, F. et al. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (*Asteraceae*) essential oil with different chemical composition. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, n. 6, p. 574–578, 2004.

Shizari, M. T. et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. *Food Science Nutrition*. V. 2(2). Pag. 146–155. Mar, 2014.

SIMS, B.; DIJKMAN, J.; ZAMBRANA, L. **Logros del proyecto de mejoramiento de traccion animal 1997-2000**. Cochabamba, Bolívia. II Seminário–Tallerde PROMETA, UMSS. p. 13-38, 2000.

SINGH, A. et al. Essential Oil Quality and Yield with Respect to Harvest Index in *Tagetes minuta* Cultivated in Sub Tropical Plains of North India. **Journal Of Essential Oil Research**, 4. ed., v. 18, p. 362-365, 2003.

SMITH, B. P. **Large animal internal medicine**. 4.ed. 2009.

SOARES, J. P. G. et al. Produção orgânica de leite: Desafios e perspectivas. In: Marcondes, M.I. et al.,(Org.). **Anais do III Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira e I Simpósio Internacional de Bovinocultura Leiteira**. 1. ed. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, v. 1 , p. 13-43, 2011.

SOUZA, C. A. S.; AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L.- *Compositae* (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 1-9, 2000.

Sperotto, V. D., et al. Activity of the decoction of *Achyrocline satureioides* DC (Lam.) - *Asteraceae* ("macela") against standard and isolated bacteria from bovine mastitis. *Acta*

THAPPA, R. K; et al. Changes in Chemical Composition of *Tagetes minuta* Oil at Various Stages of Flowering and Fruiting. **Journal of Essential Oil Research**, 5. ed., v. 5, p. 375-379, 1992.

VIEIRA, L. R. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Blainvillea biaristata* DC. *Tagetes minuta* L. e *Gochnatia oligocephala* (Gardner) Cabrera. **III Simpósio de Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco – PLAMEVASF**. Petrolina, PE. 2011. Disponível em: <http://www.plamevasf.com/uploads/7/8/9/0/7890742/___resumo.444-114-20111114.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2016.

VIEIRA, T. S. W. J. et al. Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 791-796, 2012.

WANZALA, W. Ethnobotanicals for Management of the Brown Ear Tick, *Rhipicephalus appendiculatus* in Western Kenya. Wageningen University and Research Centre, Wageningen. **Printed by Ponsen & Looijen**, Wageningen, The Netherlands, 2009, 231p.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 1. ed., v. 16, p. 41-66, 1998.

WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F. Emergence and transfer of antibiotic resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 84 (Suppl.), p. E151-E155, 2001.

WIEST, J. M. et al. Inibição e inativação in vitro de *Salmonella spp.* com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 119- 127, 2009.

ZHU, H. et al. Bactericidal effects of *Cinnamon cassia* oil against bovine mastitis bacterial pathogens. **Food Control.**, v. 66, p. 291-299, ago. 2016.