

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO MINEIRO FRENTE A BACTERIAS ISOLADAS DE OVINOS COM MASTITE

Antimicrobial activity of medicinal plants of the brazilian cerrado front of isolated bacteria of sheep with mastitis

Cintya Neves de Souza¹
Anna Christina de Almeida¹
Márcia Tatiany Reis Xavier¹
João Paulo Ramos Costa¹
Livia Mara Vitorino da Silva¹
Ernane Ronie Martins¹

Resumo:Objetivo: Avaliou-se a atividade antimicrobiana in vitro de extratos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e carqueja (*Baccharis thimera*) e os óleos da castanha de pequi (*Caryocar brasiliensis*), copaíba (*Copaifera landesdorff*) e alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*), frente a bactérias isoladas de ovelhas com mastite da região Norte de Minas Gerais. **Metodologia:** A atividade antimicrobiana dos óleos e extratos frente a cepas de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. foi determinada utilizando-se a técnica de macrodiluição em caldo e de difusão em disco. O efeito microbida dos óleos e extratos que apresentaram atividade antimicrobiana nos testes anteriores também foi determinado. **Resultados:** O óleo essencial da copaíba, óleo da castanha do pequi, extrato hidroalcoólico da casca da aroeira e decocto das folhas da carqueja, não se mostraram eficientes na inibição do crescimento das bactérias utilizadas. O extrato de barbatimão apresentou atividade bacteriostática frente a bactérias isoladas de ovinos com mastite e efeito microbida do óleo essencial de alecrim-pimenta após 5 minutos de ação. **Conclusão:** *Stryphnodendron adstringens* e *Lippia origanoides* apresentaram atividade antimicrobiana sobre patógenos isolados de leite de ovinos com mastite. O óleo de alecrim-pimenta ainda apresentou efeito microbida sobre as bactérias no tempo de cinco minutos, sendo promissor na utilização como alternativa aos antibióticos comumente utilizados.

Palavras-chave: Mastite ovina; Plantas medicinais; Extratos vegetais; Óleo essencial; Fitoterápico.

¹ Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.

Autor para correspondência: Cintya Neves Souza.
E-mail: cinyamicro@hotmail.com

Artigo recebido em: 02/11/2017.
Artigo aceito em: 07/11/2017.
Artigo publicado em: 22/12/2017.

Abstract:Objective: Evaluation of in vitro antimicrobial activity of barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) and carqueja (*Baccharis thimera*) extracts and oils of pequi nut (*Caryocar brasiliensis*), copaiba (*Copaifera landesdorff*) and rosemary pepper (*Lippia organoides*), against bacteria isolated from sheep with mastitis from the Northern region of Minas Gerais state. **Methodology:** The antimicrobial activity of oils and extracts against strains of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. was determined using the broth macrodilution and disk diffusion technique. The microbicidal effect of the oils and extracts that showed antimicrobial activity in the previous tests was also determined. **Results:** The essential oil of copaiba, pequi nut oil, hydroalcoholic extract of the bark of the aroeira and decoction of the leaves of carqueja, were not efficient in inhibiting the growth of the bacteria used. The barbatimão extract presented bacteriostatic activity against bacteria isolated from sheep with mastitis and microbicidal effect of rosemary essential oil after 5 minutes of action. **Conclusion:** *Stryphnodendron adstringens* and *Lippia organoides* presented antimicrobial activity on pathogens isolated from sheep milk with mastitis. *Lippia organoides* oil also had a microbicidal effect on the bacteria in five minutes, promising in use as an alternative to the commonly used antibiotics.

Keywords: Mastitis ovine; Medicinal plants; Plant extracts; Essential oil; Herbal medicine.

INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais pelo homem para fins nutricionais e terapêuticos é tão antiga quanto a sua história. O conhecimento sobre o potencial terapêutico dos vegetais tem despertado interesse científico, buscando novos caminhos para o controle de diversas doenças.

O uso indiscriminado de medicamentos em medicina humana e veterinária, principalmente antibióticos, tem proporcionado uma crescente resistência múltipla de microrganismos a drogas, além de gerar problemas de saúde pública devido a resíduos destes produtos nos alimentos. Esta situação tem forçado o desenvolvimento de novas pesquisas, sendo os extratos e óleos vegetais promissores quanto à ação antimicrobiana, entre outras.

Devido a sua atividade metabólica secundária, os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas, utilizadas como mecanismo de defesa contra microrganismos.¹ Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídas de plantas incluem: terpenóides e óleos essenciais²; lectinas e polipeptídios³ e substâncias fenólicas e polifenóis, que são: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas⁴, flavonas, flavonóis e flavonoides,⁵ tanino⁶ e cumarinas.⁷ Estes agentes antimicrobianos isolados de plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente sua síntese enzimática, ou mesmo alterando estruturas de membranas¹. Entretanto, a grande maioria das plantas, normalmente empregadas como fitoterápicos populares, não tiveram suas potencialidades terapêuticas efetivamente comprovadas.

As plantas chamadas popularmente de car-

queja (*Baccharis trimera* (Less.) DC.), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville), pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.), aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All), alecrim-pimenta (*Lippia origanoides* Cham.) e copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) são utilizadas na região norte de Minas Gerais para tratamentos de várias enfermidades incluindo as infecciosas. No entanto há poucos relatos na literatura sobre esses potenciais, sendo assim necessária a avaliação de utilização dos mesmos para tratamento de enfermidades ocorrentes na região, como a mastite em ovinos. Assim, o objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de plantas medicinais do cerrado do norte de Minas Gerais: alecrim-pimenta, barbatimão, aroeira, copaíba, carqueja e pequi, frente a bactérias isoladas de leites do rebanho de ovinos com mastite.

METODOLOGIA

Plantas Medicinais

As plantas foram coletadas na área de reserva nativa do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais na cidade de Montes Claros/MG (coordenadas 16°40'51,5"S e 43°50'32,1"W, altitude de 640m), à exceção do pequi e do barbatimão que foram provenientes do assentamento agroextrativista Americana, no município de Grão Mogol de acordo com sua distribuição natural e disponibilidade local. O material foi identificado segundo os padrões da taxonomia clássica e comparação com exsicatas existentes em herbários da UFMG e consulta a especialistas. As 6 espécies vegetais utilizadas, sua famílias, órgão utilizado e tipo de extração estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Descrição com nome científico, família, nome popular, órgão e tipo de extração utilizado das 6 espécies de plantas medicinais utilizadas.

Espécie vegetal	Família	Nome popular	Órgão utilizado	Tipo de Extração
<i>Lippia organoides</i> Cham.	Verbenaceae	Alecrim-pimenta	Folhas	Óleo essencial
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	Mimosoideae	Barbatimão	Casca do tronco	Extrato
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All	Anacardiaceae	Aroeira	Casca do tronco	Extrato
<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	Caesalpinia-ceae	Copaíba	Folhas	Óleo
<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	Asteraceae	Carqueja	Folhas	Extrato
<i>Caryocar brasiliensis</i> Camb.	Caryocaraceae	Pequi	Fruto	Óleo da castanha

Preparo dos extratos e retirada dos óleos vegetais

O extrato aquoso das folhas da carqueja foi obtido, secando-a em estufa de circulação forçada, durante 3 dias a 40°C. Após a secagem, 15 gramas foram trituradas e adicionadas em 1000 mL de água destilada, levando-se à cocção em erlenmeyer coberto, em fogo brando, durante 15 minutos, sendo considerada a solução mãe. Já para o preparo do extrato bruto seco de barbatimão e de aroeira, as cascas do caule foram submetidas à secagem em estufa de circulação forçada a 45°C por período de 48h, logo foi moído em moinho tipo Wiley e submetido à extração por maceração estática usando etanol P.A. como solvente (1:2 de casca para etanol p/v respectivamente), em um período de oito dias.⁸ O extrato foi obtido da separação do solvente por evaporação em estufa de circulação forçada a 45°C até secar totalmente.⁹

O óleo da castanha do pequi foi obtido abrindo-se os frutos, onde os caroços sem a polpa foram secos ao sol. Após este período, retirou-se as castanhas, as quais foram secas em estufa de 40°C por 72 horas. O material obtido foi prensado em rosca sem fim, obtendo-se o óleo.

Os óleos essenciais da copaíba e do alecrim pimenta foram obtidos por meio da técnica de hi-

drodestilação de folhas frescas em aparelho Clevenger.¹⁰ O óleo foi separado do hidrolato por partição líquido-líquido, após três horas de extração, retirado com micropipeta e acondicionado em frascos âmbar estéreis sob refrigeração (4 a 8°C) até o momento do uso.

Para o óleo de alecrim pimenta realizou-se também a identificação química dos seus componentes conforme descrito por Queiroz *et al.*¹¹ por cromatografia gasosa em cromatógrafo com detector de ionização de chama.

As diferentes concentrações do extrato de barbatimão, aroeira e carqueja foram obtidas diluindo-se 2, 4, 6 e 8 gramas do extrato bruto seco em 20 mL de DMSO o que correspondeu a uma concentração de 100 µg/mL de extrato; 200 µg/mL; 300 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente conforme descrito em Orlando.⁹

Para a obtenção das concentrações testes do óleo essencial do alecrim-pimenta, copaíba e da castanha do pequi, utilizou-se 600 µL do óleo bruto diluídos em 1,5mL de DMSO e 3,5mL de água destilada estéril, obtendo-se a concentração de 150 µg/mL de óleo. A partir desta solução, obtiveram-se sequencialmente as concentrações de 75 µL/mL, 37,5 µL/mL e 18,75 µL/mL, conforme descrito em Nascimento *et al.*¹²

Amostras microbianas

Foram utilizadas cinco amostras de *Staphylococcus* coagulase positivo, cinco de *Staphylococcus* coagulase negativo, cinco de *Streptococcus* esculina positivo e cinco de *Streptococcus* esculina negativo, isoladas de leites de ovelhas com mastite clínica e subclínica em rebanhos da região do Norte de Minas Gerais identificados por Almeida *et al.*¹³ Tais cepas foram preservadas em freezer à -10°C ±5°C e recuperadas em Ágar Infuso Cérebro e Coração (Ágar BHI Difco, Detroit, EUA) e incubadas à 37°C, por 24 horas em três repiques sucessivos.

Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro das plantas medicinais

Realizou-se avaliação de sensibilidade pelo teste de difusão em disco,¹⁴ em que com auxílio de pipeta de volume regulável, um volume das concentrações dos produtos em testes foram depositados sobre os discos estéreis de 6 mm de diâmetro, conforme descrito por Orlando⁹ e após a secagem dos discos em estufa de circulação forçada a 40°C por 30 minutos procedeu-se a realização dos testes. Controles negativos foram realizados com utilização de discos impregnados com DMSO e controles positivos foram realizados com discos do antibiótico penicilina G 10U convencional. Este teste foi realizado em triplicata. A leitura foi feita com medição dos halos de inibição em milímetros e o resultado foi à média das medidas das triplicatas.

Para a Concentração Inibitória Mínima (CIM) usou-se a técnica de macrodiluição descrita em CLSI.¹⁴ Uma alíquota de 100µL da suspensão bacteriana padronizada em 0,5 da escala de MacFarland foi inoculada em cada tubo contendo as diferentes concentrações dos extratos e óleos, preparadas em caldo BHI. O valor de CIM considera-

do foi à menor concentração de extrato ou óleo capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano após incubação a 37°C por 24 horas.

A CBM (Concentração Bactericida Mínima) foi determinada pelo plaqueamento em Agar Mueller Hinton (Acumedia, Michigan, USA) de uma alíquota, obtida nos tubos das concentrações dos óleos e extratos que não apresentaram turvação para a CIM. Assim, considerou-se a CBM a concentração inoculada em placa que não apresentou crescimento bacteriano após incubação a 37°C por 24 horas. Todo o procedimento foi feito em triplicata.

A partir dos resultados da CBM, foi avaliada a curva de sobrevivência das bactérias segundo método recomendado por “European Standard EN 12761276 para avaliação da atividade de anti-sépticos”¹⁵ com variações descritas por Castro *et al.*¹⁶ A atividade microbiana foi avaliada após o tempo de 5 minutos de contato. As concentrações obtidas na CBM, determinada anteriormente foram inoculadas em culturas teste na concentração de 10⁶ UFC/mL, e incubadas à temperatura de 37°C por 5 minutos. Em seguida foram realizadas diluições das culturas em solução salina 0,85% em concentrações que variaram de 10⁻¹ a 10⁻⁶. Foram coletados 0,1 mL de cada diluição e inoculados em placas contendo Agar PCA com posterior contagem de colônias para determinação das UFC/mL.

O efeito microbiana foi calculado pela subtração no log do número de unidades formadoras de colônias por ml após a ação dos produtos em teste e log do número de unidades formadoras de colônia em controles feitos com amostras sem a presença dos extratos ou óleos. Testes que alcançaram redução maior ou igual a 5 log no número de colônias após 5 minutos de contato foram consideradas como tendo atividade microbiana aceitável.¹⁵

Análise Estatística

Para avaliação da diferença significativa nas médias dos halos de inibição para as diferentes concentrações dos óleos e extratos, utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Os extratos de carqueja e aroeira e os óleos das folhas de copaíba e de castanha de pequi não foram capazes de inibir o crescimento das bactérias nas concentrações utilizadas, nem pelo teste de difusão em disco, nem pelo teste de macrodiluição em caldo.

O óleo de alecrim-pimenta proporcionou efeito bacteriostático e bactericida nas espécies de *Staphylococcus* spp. e de *Streptococcus* spp. na maior concentração testada (150 µL/mL).

Formação de halo de inibição também foi observada em todas as bactérias testadas na concentração de 150 µL/mL, através do teste de difusão (Tabela 2). Observou-se efeito microbicida no óleo essencial de alecrim-pimenta nessa concentração, com redução de ≥ 5 Log UFC após cinco minutos de contato (Tabela 3).

A análise de cromatografia gasosa apresentou o timol como o principal composto (48,7%) entre os componentes do óleo essencial de alecrim-pimenta.

O extrato da casca do tronco do barbatimão inibiu o crescimento dos *Staphylococcus* coagulase positivo na concentração de 300 µg/mL e os *Staphylococcus* coagulase negativos na concentração de 200 µg/mL. Os *Streptococcus* coagulase negativos e coagulase positivos tiveram a inibição do seu crescimento apenas na maior concentração utilizada (400 µg/mL).

As médias dos halos de inibição de crescimento das cepas pelo extrato de barbatimão variaram com as concentrações de óleo e com as cepas em estudo. Para *Staphylococcus* spp., a partir da concentração de 100 µg/mL não houve diferença significativa em relação ao tamanho do halo de inibição formado (Tabela 4). Já as cepas do gênero *Streptococcus* apresentaram diferenças significativas no diâmetro dos halos apenas na maior concentração utilizada.

As concentrações utilizadas do extrato de barbatimão, não proporcionaram efeito bactericida em nenhuma das bactérias, não sendo, portanto realizada a atividade microbicida.

Tabela 2 - Média de halos de inibição do óleo de alecrim pimenta (*Lippia origanoides*) frente a bactérias provenientes de leite de ovelhas com mastite no norte de Minas Gerais.

Diluições µL/mL	<i>Staphylococcus</i> <i>coagulase</i> +	<i>Staphylococcus</i> <i>coagulase</i> -	<i>Streptococcus</i> <i>esculina</i> +	<i>Streptococcus esculina</i> -
150	5,3 ^A ±5,3	8,0 ^A ±5,5	15,2 ^A ±6,0	9,8 ^A ±7,8
75	0,0 ^B	0,0 ^B	0,2 ^B ±0,32	0,0 ^B
37,5	0,0 ^B	0,0 ^B	0,0 ^B	0,0 ^B
18,75	0,0 ^B	0,0 ^B	0,0 ^B	0,0 ^B

*letras maiúsculas codificam à análise estatística em cada coluna. Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Tabela 3 - Efeito microbicida (ME) do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre bactérias isoladas de leite provenientes de ovelhas com mastite no norte de Minas Gerais.

Amostras teste	Log Nc*	Log No**	ME***
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	6,8±0,04	1,5±0,12	5,3
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	6,8±0,20	1,2±0,32	5,6
<i>Streptococcus</i> esculina positivo	6,4±0,56	1,4±0,54	5,0
<i>Streptococcus</i> esculina negativo	6,3±0,56	1,3±0,72	5,0

ME = LogNc** - Log No, sendo Nc o número de UFC/mL da série controle e No o número de UFC/mL da série testada para o anti-séptico.

Tabela 4 - Média de halos de inibição do extrato bruto seco de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) frente a bactérias provenientes de leite de ovelhas com mastite no norte de Minas Gerais.

Diluições µg/mL	<i>Staphylococcus</i> coagulase +	<i>Staphylococcus</i> coagulase -	<i>Streptococcus</i> esculina +	<i>Streptococcus</i> esculina -
400	14,2 ^A ±5,3	12,6 ^A ±4,8	9,0 ^A ±4,4	4,6 ^A ±2,5
300	12,6 ^A ±3,8	12,0 ^A ±4,2	3,8 ^{AB} ±3,3	3,2 ^A ±2,32
200	11,6 ^A ±4,5	12,0 ^A ±5,1	1,8 ^B ±1,4	0,8 ^A ±1,28
100	8,4 ^A ±4,8	10,4 ^A ±4,7	1,2 ^B ±1,4	0,0 ^A

*letras maiúsculas codificam à análise estatística em cada coluna. Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

DISCUSSÃO

Apesar de relatos na literatura indicarem evidente atividade antimicrobiana de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), carqueja (*Baccharis thimera*), óleo da castanha de pequi (*Caryocar brasiliensis*) e copaíba (*Copaifera landesdorffii*),^{17,18,19,20,21} neste trabalho elas não obtiveram efeito sobre as bactérias avaliadas. A concentração do extrato, a qualidade do material coletado, época de coleta, teor do princípio ativo ou baixa sensibilidade dos microrganismos estudados aos óleos e extratos podem ter gerado essa ausência na atividade antimicrobiana dos mesmos.

Dentre as seis espécies vegetais utilizadas, o óleo de alecrim-pimenta e o extrato de barbatimão foram as espécies capazes de inibir ou mesmo

impedir o crescimento de algumas ou em todas as bactérias isoladas de leite de ovinos utilizados.

O elevado teor de taninos foi atribuído por Audi et. al.²² como o composto que ocasionou o efeito antimicrobiano do extrato da casca de barbatimão. Na medicina popular, ele é usado no tratamento de úlceras, afecções vaginais e gonorreia, já que apresenta efeito cicatrizante, anti-inflamatório, hemostático, anti-séptico, anti-diarreico e anti-edematogênico.²³ Trabalhos anteriores confirmam a atividade antimicrobiana do barbatimão a partir de cascas e raízes^{9,24} propriedade observada neste trabalho.

Pinho et al.²⁵, detectou atividade antimicrobiana do extrato de barbatimão contra *S. aureus* a partir de suas folhas, demonstrando que outras partes da planta podem apresentar ação antimicrobiana sobre esse patógeno.

Gonçalves e colaboradores²⁶ verificaram atividade antimicrobiana de cascas de barbatimão em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase negativo e *Streptococcus pyogenes* pelo teste de difusão em disco, corroborando com os resultados encontrados neste estudo. Costa *et al.*²⁷ também encontrou efeito inibitório de extrato de barbatimão e do óleo essencial de alecrim-pimenta sobre *S. aureus* isolado de leite de vacas do rebanho norte mineiro.

A capacidade do extrato de barbatimão inibir o crescimento de bactérias do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* é um importante fator, já que são patógenos envolvidos em casos clínicos de mastite em animais.^{28,29}

O efeito antisséptico de alecrim-pimenta na presença de leite bovino foi detectado por Almeida e colaboradores³⁰ frente a *S. aureus*, *Eschechia coli* e *Salmonella Choleraesuis*, evidenciando o seu potencial de utilização em cepas patogênicas oriundas da produção leiteira.

Efeitos similares ao estudo foram encontrados por Souza *et. al.*³¹, avaliando a CIM e CBM do óleo essencial de alecrim-pimenta sobre bactérias patogênicas de origem avícola. As folhas de alecrim-pimenta utilizadas por esses autores foram coletadas no mesmo local das utilizadas neste trabalho, demonstrando a efetividade de ação do óleo obtido da mesma região sobre patógenos oriundos de diversas espécies animais.

As diferentes variações de concentrações inibitórias e bactericidas mínimas obtidas por diversos autores para o óleo de alecrim-pimenta demonstra que variações no processo de extração do óleo, a sua composição química, local de coleta, cepa microbiana, entre outros fatores, interferem no grau taxa de sua atividade, mas demonstra eficácia mesmo em diferentes concentrações.

A presença de timol como composto majoritário no alecrim-pimenta corroboram com outros trabalhos publicados com estudos de plantas da

mesma área em estudo,^{11,65,30,31} indicando a similaridade na produção de metabólitos pelas plantas nesta área.

Conforme Burt,³² citado por Queiroz e colaboradores,¹¹ o mecanismo de ação dos óleos ainda não se encontra totalmente detalhado, no entanto percebe-se maior atividade dos óleos essenciais sobre patógenos de origem alimentar, aqueles que apresentam elevadas quantidades de timol, eugenol e carvacrol. Estes compostos poderiam ocasionar deformações na estrutura física da célula microbiana pela modificação da permeabilidade da membrana plasmática.

CONCLUSÃO

O extrato bruto seco de *Stryphnodendron adstringens* apresentou atividade bacteriostática sobre as bactérias patogênicas avaliadas. Já o óleo essencial de *Lippia origanoides* apresentou atividade bacteriostática e bactericida sobre *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. isolados de leite de ovinos com mastite na maior concentração utilizada de 150 µL/mL. O óleo de alecrim-pimenta apresentou efeito microbicida no tempo de cinco minutos, demonstrando o potencial dessas plantas como utilização alternativa aos antibióticos. No entanto, estudos são necessários para viabilizar a utilização destes extratos e óleos em glândulas mamárias.

Os resultados obtidos com as demais espécies vegetais indicam que outras concentrações devem ser testadas para avaliação do seu potencial antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

01. SILVA, N. C. C. FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medical plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous*

- Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 16, n. 3. 2010.
02. TORSSSEL, B. G.; *Natural product chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism*. New York: John Willey, 401p. 1989.
02. ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. *Natural product extraction: principles and applications*. Londres: Royal Society of Chemistry, 2013. 500p. Disponível em: <<http://dl.1chemist.ir/ebook/chemistry/0061-book-2013-8091.%5B1chemist.ir%5D.pdf>>. Acesso em 1 jan.2014.
03. TERRAS, F. R. G. *et al.* Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiology*, v. 103, p. 1311-1319. 1993.
04. STERN, J. L. *et al.* Phlorotannin-protein interactions. *Journal of Chemical Ecology*, v. 22, p. 1887-1899. 1996.
05. FESSENDEN, R. J. *Organic chemistry*. Boston: Willard Grant Pres. 1982.
06. SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3875-3883. 1991.
07. O'KENNEDY R, THORNES, R. D. *Coumarins: biology, applications and mode of action*. New York: John Willey. 1997.
08. ZELNIK, R. D. *et al.* Barbatusin and cyclobutatusin, two novel diterpenoides from *Coleus barbatus* Benth. *Tetrahedron*, Fort Collins, v. 33, p. 1457-1467. 1977.
09. ORLANDO, S. C. *Avaliação da atividade antibacteriana do extrato hidro-alcoólico bruto da casca do Stryphnodendron adstringens (Martius) Coville (Barbatimão)*. 2005. 88 f. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde), Universidade de Franca, SP. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2003000400003>>. Acesso em: 14 Out. 2017.
10. GUENTHER, E. *The essential oils*. Malabar: Krieger Publication Co., 1972. 427 p.
11. QUEIROZ, M. R. A. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 16, n. 3, p. 737-743. 2014.
12. NASCIMENTO, P. F. C. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p.108-113. 2007.
13. ALMEIDA, A. C. *et al.* Característica da mastite ovina no norte de Minas Gerais; ocorrência, etiologia e epidemiologia. *Revista Caatinga*, v. 24, p. 164-171. 2011.
14. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (2015a) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests of Bacteria That Grow Aerobically*. Disponível em:<http://shop.clsi.org/c.1253739/site/Sample_pdf/M100S25_sample.pdf>. Acesso em: 15 Out. 2017.
15. BLOOMFIELD, S. F.; LOONEY, E. Evaluation of the repeatability and reproducibility of European suspension test methods for antimicrobial activity of disinfectants and antiseptics. *The Journal of Ap-*

plied Bacteriology, v. 73, p. 87-93. 1992.

16. CASTRO, C. E. *et al.* Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 13, n. 3, p. 293-297. 2011.
17. BETONI, J. E. C. *et al.* Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Memória Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 4, p. 387-390. jun. 2006.
18. SANTOS, A. O. *et al.* Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Memória Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 3, p. 277-281. mai. 2008.
19. AVANCINI, C. *et al.* Antimicrobial Activity of Plants Used in the Prevention and Control of Bovine Mastitis in Southern Brazil. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, n. 6, p. 894-899. 2008.
20. SÁ, R. A. *et al.* Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Science Technololy*, v. 43, p. 85-95. 2009.
21. NARUZAWA, E. S. PAPA, M. F. S. Antifungal activity of extracts from brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassiicola*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 13, n. 4, p. 408-412. 2011.
22. AUDI, E.A. *et al.* Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 23, n. 3, p. 328-333. 2004.
23. QUEIROZ, C. R. A. A. *et al.* Caracterização dos taninos da aroeira preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Revista da Árvore*, v. 26, p. 493-497. 2002.
24. NOGUEIRA, J. C. R. *et al.* Atividade antimicrobiana in vitro de produtos vegetais em otite externa aguda. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v.74, n.1, p. 118-124. 2008.
25. PINHO, L. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciência Rural*, v. 42, n. 2, p. 326-331, fev. 2012. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/crural/article/viewFile/21203/22027>>. Acesso em: 30 out. 2017.
26. GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arquivo Instituto Biologia*, v. 72, n. 3, p. 353-358, jul./set. 2005.
27. COSTA *et al.* Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. *Biotemas*, v. 24, n. 4, p. 1-6, dez. 2011. Disponível em: <<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2011v24n4p1>>. Acesso em: 30 out. 2017.
28. ELVINGER, F.; NATZKE, R. P. Elements of mastitis control. In: VAN HORN, H. H.; WILCOX, C. J. *Large dairy herd management*. Champaign: American Dairy Science Association, 1992. p. 440-447.
29. CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, p. 7-10. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352000000100002&script=sci_

abstract&tlng=pt>. Acesso em: 30 out. 2017.

30. ALMEIDA, A. C. *et al.* Atividade antisséptica do óleo essencial de *Lippia origanoides* Cham. (Alecrim-pimenta) na presença de leite bovino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, p. 905-911. 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v36n9/1678-5150-pvb-36-09-00905.pdf>>. Acesso em 30 out. 2017.

31. SOUZA, D. S. *et al.* Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* e *Lippia rotundifolia* frente a enterobactérias isoladas de aves. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 67, n. 3, p. 940-944. 2015.

32. BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 223–253. 2004.