

ATIVIDADE DESINFETANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DE *Achyrocline satureioides* (ASTERACEAE) SOBRE *Candida* spp. ISOLADAS EM SITUAÇÕES-PROBLEMA DE MASTITE BOVINA

[Disinfectant activity of the crude hydroalcoholic extract of *Achyrocline satureioides* (Asteraceae) on *Candida* spp. isolated in problem-situations of bovine mastitis]

Felipe Lopes Campos¹, Patricia Valente², Eduardo Miranda Ethur³, César Augusto Marchionatti Avancini^{4*}

¹ Departamento de Defesa Agropecuária, Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SEAPA-RS), Estrela/RS, Brasil.

² Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, Brasil.

³ Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Unidade Integrada Vale do Taquari de Ensino Superior (UNIVATES), Lageado/RS, Brasil.

⁴ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, Brasil.

RESUMO – O fenômeno de resistência apresentada por leveduras aos antimicóticos bem como a necessidade de insumos de higiene para uso em sistemas de criação animal baseados no modelo agroecológico motivaram o desenvolvimento deste trabalho. Os objetivos foram realizar a análise fitoquímica qualitativa e avaliar a ação antimicrobiana/desinfetante do extrato hidroalcoólico bruto [peso:volume de 5g:100 mL (50 mg mL)] das flores de *Achyrocline satureioides* sobre uma *Candida albicans* padrão (ATCC 14053) e isoladas de casos de mastite bovina: *C. albicans* ($n = 1$), *C. krusei* ($n = 21$) e *C. rugosa* ($n = 9$). O teste foi o de suspensão, com as linhagens em três densidades populacionais (DP): 10^5 , 10^4 e 10^3 UFC mL, nos tempos de contato (TC) de 15 e 30 minutos e de 1 até 10 horas. Com resultados da atividade influenciados pelas variáveis DP e TC, todas as leveduras foram inativadas. Como exemplo na mais alta DP: a padrão estava inativada na leitura de 1 h; dos isolados clínicos, o de *C. albicans* inativado na leitura das 3 h; sete isolados de *C. krusei* estavam inativados aos 30 min e os outros 14 na leitura de 1 h; sete isolados de *C. rugosa* estavam inativados na leitura das 4 h, os outros até às 10 h. Os fitoquímicos identificados foram compostos fenólicos, taninos, taninos condensados e flavonóides. As evidências observadas sugerem o potencial do extrato para uso sobre as fontes de infecção em procedimentos de desinfecção ou de antisepsia, ou em formulações que lhe sirvam de veículo.

Palavras-Chave: extrato vegetal; *Achyrocline satureioides*; *Candida* spp.; produto natural.

ABSTRACT – This work was prompted by the phenomenon of yeasts' resistance to antifungals, and the need for sanitation products for use in livestock farming in the agroecological model. The objectives were to undertake a qualitative phytochemical analysis of, and assess the antimicrobial/disinfectant action of, the crude hydroalcoholic extract [weight:volume of 5g:100 mL (50 mg mL)] of flowers of *Achyrocline satureioides* on standard *Candida albicans* (ATCC 14053) and isolates of cases of bovine mastitis: *C. albicans* ($n = 1$), *C. krusei* ($n = 21$) and *C. rugosa* ($n = 9$). The test was that of suspension, the lineages in three population densities (PD): 10^5 , 10^4 and 10^3 CFU mL, at contact times (CT) of 15 and 30 minutes and from 1 up to 10 hours. Activity results were influenced by the PD and CT variables, with all yeasts inactivated. For example, at the highest PD: the standard strain was inactivated in the reading at 1 hr; of the clinical isolates, *C. albicans* was inactivated in the reading at 3 hrs; seven isolates of *C. krusei* at 30 minutes and the other 14 at 1 hr; seven isolates of *C. rugosa* were inactivated in the reading at 4 hrs, with the others inactivated at 10 hrs. Phytochemicals identified were phenolic compounds, tannins, condensed tannins and flavonoids. The evidence observed suggests the extract's potential for use on sources of infection in disinfection/antiseptic procedures, or in formulations which serve as a vehicle.

Keywords: vegetable extract; *Achyrocline satureioides*; disinfectant; *Candida* spp.; natural product.

* Autor para correspondência. E-mail: cesar.avancini@ufrgs.br

Recebido: 15 de junho de 2016.

Aceito para publicação: 06 de novembro de 2016.

INTRODUÇÃO

A mastite bovina causada por fungos leveduriformes e filamentosos é considerada uma enfermidade emergente, sendo o gênero *Candida* um dos principais envolvidos nesse problema (Jones; Hunt & King, 2000; Spanemberg et al., 2009a; Cruz, 2010). A partir do advento da antibioticoterapia antibacteriana nas décadas de 50 e 60, observou-se um aumento na incidência de mastites causadas por leveduras, especialmente sob a forma de surtos localizados, os quais são frequentemente relacionados ao tratamento antimicrobiano por período prolongado (Spanemberg et al., 2009b; Langoni et al., 2013).

Na gestão sanitária das doenças infecto-transmissíveis, é essencial a adoção de procedimentos sobre os agentes morbígenos, tanto com a antibioticoterapia e antisepsia sobre o animal, quanto sobre o ambiente, por meio da desinfecção e descontaminação. Os processos de desinfecção, descontaminação e antisepsia são recursos que visam diminuir as doses infectantes de microrganismos, protegendo os hospedeiros suscetíveis de cargas potencialmente patogênicas (Wiest, 1984).

Limitações no uso dos fármacos convencionais podem ocorrer devido à resistência antimicrobiana (Chapmann, 1998; European Commission, 2009), o que motiva a busca por novos compostos ativos. Essa busca é também incentivada pelo uso de sistemas tecnológicos de criação animal referenciados nos modelos orgânico e agroecológico, e que demandam insumos e recursos sanitários veterinários considerados sustentáveis (BRASIL, 2011) e renováveis, para que sejam usados em substituição ou em complementaridade aos produtos convencionais (OMS, 2002). A utilização de extratos vegetais brutos facilitou o acesso de higienistas-sanitaristas a esses recursos (Campos et al., 2013).

Diante desse contexto, o estudo da atividade antimicrobiana de extratos vegetais vem se desenvolvendo, como observado em *Achyrocline satureioides*, popularmente conhecida por macela ou marcela (Lemos et al., 2000; Fernandez et al., 2003; Avancini & Wiest, 2008; Sperotto et al., 2012). Planta nativa no sul do Brasil (Lorenzi & Matos, 2008), seu uso popular é tradicionalmente considerado medicinal a partir dos extratos das flores, folhas e caule, devido a sua ação anti-inflamatória (Nunes et al., 2003; Souza; Bassani & Schapoval, 2007) antiespasmódica, analgésica e sedativa (Oliveira et al., 2001), antioxidante (Desmarchelier et al., 1998; Grassi-Zampieron; Vieira & Siqueira, 2009), imunostimulante (Puhlmann et al., 1992). Estudos mostraram que o

potencial de cito e genotoxicidade de extratos desta planta varia com a concentração de uso (Rivera et al., 2004; Fachinetto et al., 2007; Sabini et al., 2013; Salgueiro et al., 2016). Revisão de literatura científica sobre a planta também pode ser encontrada em Barata et al. (2009) e Retta et al. (2012).

Esse trabalho objetivou analisar o perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico bruto de *Achyrocline satureioides*, e verificar as atividades fungicida e desinfetante sobre *Candida albicans* isoladas em situação-problema de mastite bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal foi adquirido na forma seca através de um fornecedor local, cuja planta havia sido cultivada em sistema de permacultura, com certificado de produção orgânica, na área rural da cidade de Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil. As partes utilizadas foram os capítulos florais. A amostra foi identificada e depositada no acervo do Herbário do Instituto de Biociências/ UFRGS como *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., família Asteraceae, sobre o código "ICN 192145".

Os capítulos florais foram submetidos à maceração hidroalcoólica na proporção de 1:20, sendo 5 gramas do material vegetal em 100 mL de álcool etílico a 70° GL (50 mg mL), e o conteúdo armazenado posteriormente por 30 dias com agitação manual periódica. A evaporação do álcool foi procedida à temperatura de 60°C, sob pressão reduzida em aparelho evaporador rotativo a vácuo, repondo-se o volume inicial com água destilada estéril para obtenção do extrato hidroalcoólico bruto hidratado, conforme as diretrizes da Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959). Para a cepa-padrão de *C. albicans*, procedeu-se paralelamente testes com metade da proporção das flores.

Para o experimento, 31 isolados clínicos de *Candida* spp. oriundos de amostras de leite de vacas com mastite foram processados no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, da UFRGS, as quais foram identificadas como *Candida albicans* (n = 1), *Candida krusei* (n = 21) e *Candida rugosa* (n = 9), além de uma cepa-padrão de *Candida albicans* (ATCC 14053). Como critério de seleção, foram incluídos no estudo apenas as amostras clínicas provenientes de propriedades distintas. As amostras foram isoladas e congeladas imediatamente, sendo a identificação fúngica (Kurtzman et al., 2011) realizada no Laboratório de Micologia do Instituto de Biociências e no Laboratório de Micologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária, ambos da UFRGS.

Para avaliação da atividade desinfetante da planta sobre *Candida* spp., preconizou-se as diretrizes do protocolo "Suspensão Quantitativa da Atividade Fungicida e Levedurizada de Desinfetantes e Antissépticos" (British Standard, 2006), com modificações. Diferentemente do teste original, a avaliação da atividade antimicrobiana de diluições da solução-teste não foi realizada, porém, os inóculos fúngicos foram submetidos à exposição do extrato em três diferentes densidades populacionais (DP). Os inóculos fúngicos foram submetidos ao contato do extrato em diferentes tempos: 15 minutos, 30 minutos e entre 1 a 10 horas.

Para a preparação dos inóculos, os isolados foram reativados, transferindo-se 0,2 mL dos estoques congelados em 3 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Himedia[®]) e incubando a 34°C por 24 horas. Após, retiraram-se alíquotas com alça de platina para esgotamento em ágar Sabouraud Dextrose e incubação a 34°C por 24 horas. A partir dessas colônias, uma suspensão fúngica foi preparada em salina estéril a 0,85%, e sua turbidez comparada com a 0,5 da escala de McFarland, correspondente este à concentração de $1-5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Essa densidade populacional foi submetida a duas diluições logarítmicas, totalizando três densidades populacionais: 10^6 , 10^5 e 10^4 UFC mL⁻¹. No teste, 1 mL do inóculo de cada densidade populacional foi suspendida em tubos de ensaios contendo 9 mL do extrato hidratado de *A. saturoioides*, o qual resultou em uma redução logarítmica das densidades populacionais para 10^5 , 10^4 e 10^3 UFC mL⁻¹. Após os tempos de contato estipulados, 1 mL da solução foi adicionada em tubo de ensaio contendo 9 mL de caldo Sabouraud Dextrose com solução neutralizante de 3% de polisorbato 80, 0,3% de lecitina e 0,1% de histidina [3% de polissorbato 80 (Synth[®]), 0,3% de lecitina de soja (Delaware[®]) e 0,1% de histidina (Synth[®]) (Sperotto et al., 2012)] por 5 minutos.

Para a análise quantitativa da atividade fungicida do extrato hidroalcoólico bruto, foram realizadas três diluições em base decimal a partir deste tubo, onde 0,1 mL de cada diluição foi espalhada em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (ASD - Himedia[®]), para contagem de unidades formadoras de colônia presentes. Os testes foram realizados em duplicata. Foram realizados controles com meio de cultura mais inóculo, sem contato com extrato, controle de contaminação do extrato e verificação da viabilidade de crescimento da cultura 24 h.

A análise fitoquímica qualitativa do extrato foi realizada no laboratório de química do Centro Universitário UNIVATES, onde foram avaliados os principais grupos de metabólitos secundários presentes no extrato de forma qualitativa, utilizando métodos de coloração ou precipitação adequados.

As metodologias empregadas foram adaptadas a partir de Harborne (1998), Falkenberg; Santos & Simões (2003) e da Farmacopéia Brasileira (1988). Os principais metabólitos secundários avaliados foram: Taninos, Cumarinas, Saponinas, Flavonóides, Polifenóis totais e Alcalóides.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A escolha do método de suspensão com o teste adotado pelo Comitê Europeu de Padronização (CEN) para avaliar a atividade do extrato hidroalcoólico bruto deu-se tanto em função de sua aceitabilidade como padrão internacional para avaliar a atividade fungicida e levedurizada de compostos químicos, como devido a sua capacidade de gerar informações quantitativas. Com esse teste foi possível observar o "efeito microbiológico", ou seja, verificar a redução logarítmica dos inóculos, a partir de uma densidade populacional microbiana inicial conhecida. Esse dado fornece maior informação sobre a sua atividade, do que apenas os testes qualitativos dicotômicos "cresceu/não-cresceu". Deste modo pode-se avaliar não apenas a atividade desinfetante, mas a informação da redução logarítmica e tempo para inativação pode ser usada para avaliar a possibilidade de uso do extrato para outras finalidades como, por exemplo, juntando avaliação de outras variáveis (citotoxicidade), como antisséptico ou para infusão intramamária.

Para obter resultados confiáveis sobre a ação fungicida da solução testada, foi utilizado tubo contendo caldo Sabouraud Dextrose com neutralizador. Os neutralizantes têm a função de inativar resíduos da substância antimicrobiana, após a exposição do inóculo (Reybrouck, 1998). Este procedimento tem a finalidade de evitar observações falsas-negativas, expressas pela possível ação somente de inibição microbiana, confundindo com a ação de inativação da extração vegetal. Como não são padronizados neutralizadores específicos para soluções da *A. saturoioides*, foram mantidos os indicados no protocolo do teste, que correspondem aos mesmos utilizados com resultados adequados em outros estudos (Mota; Carvalho & Wiest, 2011; Sperotto et al., 2012) com extrações dessa planta. Desse modo, pode-se demonstrar que o extrato promoveu ação fungicida, e não fungistática, sobre *Candida* spp.

Sobre a cepa-padrão de *Candida albicans* (ATCC 14053), a atividade do extrato hidroalcoólico de macela pode ser observada na Tabela 1. O extrato inativou a levedura, sendo que a ação foi dependente das variáveis densidade populacional do inóculo e da proporção peso:volume do extrato, posto que interferiram no tempo necessário para promover a atividade anti-fúngica (redução

logarítmica ou inativação). Exceção para a menor densidade populacional, que apresentou igual

resultado para as duas proporções do extrato, estando inativada na leitura dos 15 min.

Tabela 1. Contagem de unidades formadoras de colônias viáveis (UFC) de *Candida albicans* padrão e isolado de origem clínica de mastite bovina frente ao extrato hidroalcoólico bruto das flores de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. – Asteraceae (“macela”) em diferentes proporções, usando teste de suspensão quantitativo.

Cepa de <i>C. albicans</i>	Proporção de <i>A. satureioides</i>	DP	UFC em diferentes tempos de contato					
			15 min	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h
ATCC 14053	5 g:100 mL	10^5	10^3	10^2	0	0	0	0
		10^4	10	0	0	0	0	0
		10^3	0	0	0	0	0	0
	2,5 g:100 mL	10^5	10^4	10^4	10^3	10^3	10^2	0
		10^4	10^3	10^3	10^2	0	0	0
		10^3	0	0	0	0	0	0
Isolado clínico	5 g:100 mL	10^5	10^3	10^3	10^3	11	0	0
		10^4	3	4	0	0	0	0
		10^3	0	0	0	0	0	0

DP = Densidade Populacional de confronto (UFC mL⁻¹); 0 = sem crescimento.

Na Tabela 1, também verificou-se que a levedura *C. albicans* isolada necessitou de maior tempo de contato com o extrato (na proporção p:v pareada) para ser inativada do que a cepa de referência. Esse resultado alerta para que a decisão quanto ao critério tempo de contato seja baseado no monitoramento da susceptibilidade e sensibilidade da amostra/linhagem presente em cada cenário de situação-problema sanitário, e não unicamente em padronizadas.

Pela Tabela 2 verificou-se que os 21 isolados de *C. krusei* foram inativados pelo extrato. Observou-se que, diferente do ocorrido com o isolado de *C.*

albicans que necessitou mais tempo de contato para ser inativado, todos os isolados foram inativados em igual ou menor tempo que a levedura padrão. Observou-se também certa diferença na sensibilidade, ou de modo inverso, na resistência, entre os isolados de *C. krusei* na relação das variáveis tempo de contato e densidade populacional, para inativação. Por exemplo, na densidade 10^5 , três deles estavam inativados já na leitura de 15 min, ao passo que 14 deles, mesmo tendo sofrido redução logarítmica, estavam inativados apenas na leitura de 1 h. Na densidade 10^4 apenas um dos isolado não estava inativado já na leitura dos 15 min, o que ocorreu na de 1h.

Tabela 2. Número de isolados (em mastite bovina) de *Candida krusei* (N = 21), em diferentes densidades populacionais iniciais, inativados pelo extrato hidroalcoólico bruto das flores de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. – ASTERACEAE (“macela”), na proporção 5g:100mL, após tempo de confronto, usando teste de suspensão quantitativo.

DP	<i>Candida krusei</i> (N = 21)	Tempo de contato		
		15min	30min	1 h
10^5	Inativados por tempo de contato	3	7	11
10^4	Inativados por tempo de contato	20	20	21
10^3	Inativados por tempo de contato	21	-	-

DP: Densidade Populacional de confronto (em UFC mL).

Na Tabela 3 pode-se verificar que também todos os isolados de *C. rugosa* foram inativados. Mas se comparado com as leveduras *C. albicans* padrão e isolados e *C. krusei* isolados confrontados neste experimento, de modo geral (exceção de 5 isolados na DP 10^3) necessitaram de maior tempo de contato para que a inativação ocorresse. Na mais elevada densidade populacional, na leitura de 3 h de contato somente dois isolados estavam inativados, sete na leitura das 5 h, tendo dois isolados necessitado de 8 h e 9 h para inativação. Mesmo que maior número de leveduras desta espécie precise ser confrontado

para afirmação mais segura, maior tolerância ao extrato pareceu ser essa uma característica intrínseca. De qualquer modo, à semelhança dos resultados do confronto do extrato com os outros isolados e a cepa padrão, foi recorrente a relação tempo de contato e diminuição da densidade populacional inicial. Quanto maior a densidade populacional inicial, maior o tempo de contato necessário para a inativação das leveduras. Sobre esse fenômeno, qual seja a relação da densidade populacional e a curva de morte microbiana por

tempo de contato já foi descrito e pode ser visto, por exemplo, em Tortora (2012).

Tabela 3. Número de isolados (em mastite bovina) de *Candida rugosa* (N = 9), em diferentes densidades populacionais iniciais, inativados pelo extrato hidroalcoólico bruto das flores de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. – ASTERACEAE (“macela”), na proporção 5g:100mL, após tempo de confronto, usando teste de suspensão quantitativo.

<i>Candida rugosa</i> (N = 9)		Tempo de Contato											
DP		15min	30min	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h
10 ⁵	Inativados por tempo de contato	-	-	-	-	2	7	7	7	7	7	8	9
10 ⁴	Inativados por tempo de contato	-	-	-	2	7	9						
10 ³	Inativados por tempo de contato	4	4	8	8	9							

DP: Densidade Populacional de confronto (UFC mL); - = todos isolados ativos.

Para discutir os resultados obtidos com outras investigações científicas que avaliaram a atividade fungicida de extrações de *A. satureioides* frente *Candida* spp., localizamos o trabalho de Duarte et al. (2005), quando realizaram o confronto do óleo essencial e do extrato etanólico das folhas de *A. satureioides* frente linhagem de *Candida albicans* CBMAI 0475 (ATCC 10231). No teste para verificar a concentração inibitória mínima, com método de diluição em placa, não observaram atividade. Pode-se entender a diferença com os resultados obtidos no estudo aqui apresentado por dois vieses: primeiro, de que a parte da planta usada foi diferente, posto que usaram folhas, e aqui as flores; segundo, que estabeleceram 2,0 mg mL como a maior concentração para considerar a planta com potencial atividade antimicrobiana, ao passo que neste estudo usou-se 50 mg mL. Observe-se, inclusive, que nos resultados obtidos com 25 mg mL o tempo de contato para a inativação da linhagem padrão já foi maior.

Gonçalves (2010) confrontou os extratos metanólicos brutos das raízes, caule e flor, pelo método de difusão com técnica de disco impregnado (com extrato) sobreposto em meio de cultura, frente as leveduras padrões de *Candida albicans*, *C. Kruzei* e *C. parapsilosis*, não tendo observado atividade de nenhum extrato. Tem-se como dificuldade de comparação a proporção planta:volume, e por consequência a concentração, usada. É informado que "A quantidade do solvente utilizada foi proporcional à quantidade da amostra, de forma que todo material vegetal ficasse imerso no solvente" (p. 41). Posto que os resultados que aqui se apresenta informa que existe relação da concentração com a atividade, considera-se limitador para a discussão.

O screening fitoquímico do extrato bruto de *Achyrocline satureioides* demonstrou a presença de compostos fenólicos, taninos, taninos condensados e de flavonóides (Tabela 4). Tais compostos são comumente encontrados nesta planta e são

atribuídos a estas classes de compostos as atividades biológicas da planta (Oliveira; Ferreria & Toma, 2010; Retta et al., 2012; Saldanha et al., 2013). A avaliação fitoquímica e a identificação pelo Herbário do Instituto de Biociências da UFRGS foram consideradas para conferir a identidade e qualidade da amostra vegetal e do extrato.

Tabela 4. Metabólitos secundários do extrato bruto de *Achyrocline satureioides*.

Classe de metabólito secundário	Extrato bruto
Alcaloides	-
Antraquinona	-
Compostos fenólicos	+
Cumarinas	-
Flavonoides	+
Saponinas	-
Taninos	+
taninos hidrolisáveis	-
taninos condensados	+
Terpenos	-

(-) metabólito não encontrado (+) metabólito encontrado.

CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico bruto de *Achyrocline satureioides*, nas condições empregadas neste experimento, promoveu ação fungicida com atividades tanto de redução logarítmica da densidade populacional quanto de inativação total dos inóculos de *Candida* spp. isoladas de situações-problema de mastite bovina.

As evidências observadas sugerem o potencial do extrato hidroalcoólico bruto como desinfetante, devendo-se realizar mais estudo para avaliar sua aplicabilidade em procedimentos de desinfecção, de descontaminação ou de antisepsia, ou ainda em formulações que lhe sirvam de veículo.

AGRADECIMENTO

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

REFERÊNCIAS

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

BARATA, L. E. S. et al. Plantas Mediciniais Brasileiras. I. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Macela). **Revista Fitos**, v.4, n. 01, p. 120-125, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N° 46, de 6 de outubro de 2011**: Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Organicos/Legislacao/Nacional/Instrucao_Normativa_n_0_046_de_06-10-2011_regulada_pela_IN_17.pdf>. Acesso em: 03 abril 2016.

BRITISH STANDARD. **British Standard (BS) - European Standard EN 1657:2005** - Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative - suspension test for the evaluation of fungicidal or yesticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the Veterinary area – test method and requirements (phase 2, step 1). European Committee for Standardization - CEN, Brussels, 2006.

CAMPOS, F. L. et al. atividade desinfetante *in vitro* de extrações de *Achyrocline satureioides* DC. Asteraceae (macela) sobre *Candida albicans* padrão. In: SIMPÓSIO DE SUSTENTABILIDADE & CIÊNCIA ANIMAL, III, 2013, Pirassununga, **Anais**. Pirassununga: FMVZ/USP, 21-22 de agosto de 2013. Trabalho 087. Disponível em: <<http://www.sisca.com.br/anais.php>> . Acesso em: 10 abril 2016.

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

CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro : Revinter, 2010. 348 p.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("marcela"). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, n.9, p.1163-1170, 1998.

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

EUROPEAN COMMISSION. SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS (SCENIHR). **Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides**: antibiotic resistance effects of biocides. Brussels : European Commission, 2009. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2015.

FACHINETTO, J.M.; et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.49-54, 2007.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis : UFRGS Editora/ Editora da UFSC, 2003. cap. 10, p. 229-245.

FERNANDEZ, V. N. V., et al. Atividade desinfetante e antisséptica de extrações de plantas nativas no sul do Brasil, frente bactérias de interesse na área da Medicina Veterinária: I - resultados preliminares do sub-projeto *Achyrocline satureioides* D.C. Asteraceae (macela). In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, XV., 2003, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 222. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/39910>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

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

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Atheneu Editora São Paulo Ltda. São Paulo, 1988.

GRASSI-ZAMPIERON, R.; VIEIRA, M.C.; SIQUEIRA, J.M. de. Atividade antioxidante e captora de radicais livres dos extratos de *A. alata* em comparação com extratos de *A. satureioides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.572-576, 2009.

GONÇALVES, J.M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e ariagem fitoquímica dos extratos das espécies da Família Asteraceae encontradas no Semi-Árido Baiano**. 2010. 91f. Dissertação de Mestrado. 91f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. 3ed. New York : Chapman and Hall Int. Ed., 1998. 302 p.

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

KURTZMAN, C.P. et al. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. (Editors). **The Yeasts. A Taxonomic Study**. 5th edition. Editora Elsevier, 2011. Volume 1. pp. 87-110.

LANGONI, H. et al. Participação de leveduras, algas e fungos na mastite bovina. **Veterinária e Zootecnia**, v.10, p.89-98, 1998.

LEMONS G. C. S. et al. Bactericidal activity of macela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC) and jaborandi- falso (*Piper aduncun* L.) against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, n.3, v. 1, p. 67-72, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**. 2 Ed.. Nova Odesa : Plantarum, 2008. 544 p.

MOTA, F. M.; CARVALHO H. H. C.; WIEST J. M. Atividade antibacteriana *in vitro* de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae ("macela", "marcela") sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, n. 13, v. 3, p. 298-304, 2011.

- NUNES, G.P. et al. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 89-93, 2003.
- OLIVEIRA, A.L. et al. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Macela) Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. **Caderno de Farmácia**, v. 7, n.1, p. 33-38, 2001.
- OLIVEIRA, C.; FERRERIA, J. A.; TOMA, M. A. Análise fitoquímica preliminar do extrato etanólico obtido a partir do rizoma da *Typha domingensis* pers. **Revista Ceciliana**, v.2, n. 2, p.17-19, 2010.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Ginebra : Organización Mundial de la Salud, 2002. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2015.
- PUHLMANN, J. et al. Immunobiologically active metallic ion-containing polysaccharides of *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, v.31, p.2617-21, 1992.
- RETTA, D. et al. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. **Industrial Crops and Products** v. 38, 27– 38, 2012.
- REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 269 – 272, 1998.
- RIVERA, F. et al. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela). **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p. 359–362, 2004.
- SABINI, M.C. et al. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 463–470, 2013.
- SALDANHA, A. A. et al. Análise fitoquímica preliminar e avaliação do possível efeito antiinflamatório da fração enriquecida em flavonóides de *Byrsonima verbascifolia* (malpighiaceae). **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 2, p. 89-91, 2013.
- SALGUEIRO, A.C.F. et al. In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 6 – 14, 2016.
- SOUZA, K.C.B. de; BASSANI, V.L. ; SCHAPOVAL, E.E.S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v. 14, p. 102–108, 2007.
- SPANEMBERG, A.. et al. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v.39, n. 1, , p. 282-290, 2009a.
- SPANEMBERG, A, et al. Diversity of yeasts from bovine mastitis in southern Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 154-156, 2009b.
- SPEROTTO V. R. et al. Atividade do decocto de *Achyrocline satureioides* D.C. (Lam.) - Asteraceae (“macela”) sobre bactérias padrões e isoladas em mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 3, p. 1-7, 2012.
- TORTORA, G. J.; FUNCKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre : Artmed, 2012.
- WIEST, J.M. Bovinocultura de leite: resistência de patógenos da glândula mamária à desinfecção e a variações do potencial de hidrogênio. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.12, p. 57-69, 1984.