

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

PLANTAS MEDICINAIS EM ATENÇÃO PRIMÁRIA VETERINÁRIA:
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A BACTÉRIAS RELACIONADAS
COM MASTITE BOVINA E A DERMATÓFITOS

TESE DE DOUTORADO

LUIZ FILIPE DAMÉ SCHUCH

PORTO ALEGRE

2007

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

PLANTAS MEDICINAIS EM ATENÇÃO PRIMÁRIA VETERINÁRIA:
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A BACTÉRIAS RELACIONADAS
COM MASTITE BOVINA E A DERMATÓFITOS

LUIZ FILIPE DAMÉ SCHUCH

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na área de
concentração Medicina Veterinária
Preventiva.

Orientador: Prof. José Maria Wiest

PORTO ALEGRE

2007

LUIZ FILIPE DAMÉ SCHUCH

TÍTULO DO TRABALHO:

Plantas Medicinais em Atenção Básica Veterinária: Atividade Antimicrobiana frente a Bactérias Relacionadas com Mastite Bovina e aos Dermatófitos

Aprovada em 28 FEV 2007

APROVADO POR:

Prof. Dr. José Maria Wiest
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. César Augusto M. Avancini
Membro da Comissão

Profa. Dra. Gladis Aver Ribeiro
Membro da Comissão

Profa. Dra. Ingrid Bergmann I. de Barros
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

A Ana Luiza e a Dóris
Pelo amor e cumplicidade

Aos meus Pais
Exemplo de vida

Ao Kiko

"Porque se llama ausencia
El tiempo de no verte
Porque se llamará
Tan solo soledad
Si es llanto y nada mas"

(J. Larralde)

AGRADECIMENTOS

A CAPES, a UFRGS e a UFPEL que pelo Programa de Qualificação Institucional permitiram a realização deste trabalho.

Ao meu Orientador, Prof. WIEST, o seu exemplo de vida e a liberdade oferecida que me permitiram uma formação integral nesses quatro anos.

As famílias que compõem a COOPAVA e, por extensão, o MST, porvir forjado na luta pela vida, onde encontrei muita amizade e aprendizado.

As Professoras e Técnicos do Herbário do Instituto de Biologia da UFPel.

A FIOCRUZ pelo envio das cepas padrões.

Ao pessoal do Laboratório de Doenças Infecciosas (Bacteriologia e Micologia), inclusive e acima de tudo pelo ambiente de trabalho saudável que temos construído juntos.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho, com idéias, com trabalho ou com amizade, e foram tantas que não é aqui possível nomear.

“Yo tengo tantos hermanos que no los puedo contar y una hermana muy hermosa que se llama libertad” (A. Yupanqui).

EPÍGRAFE

“A produção ecológica deve ser baseada em alguns princípios: No respeito à natureza, no respeito a si mesmo e ao ser humano, no respeito ao consumidor, atingir qualidade e produtividade e buscar um modelo menos dependente, e por uma concepção política de que para se libertar, para transformar a sociedade em que vivemos também é preciso transformar a nossa forma de produzir”.
(A., agricultor assentado na COOPAVA).

RESUMO

As plantas medicinais são utilizadas pelo homem desde os primórdios da humanidade. O conhecimento com relação a sua identificação e uso estabelecido pelo processo de experimentação, acertos e erros, é um patrimônio cultural dos povos. Com base nos princípios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde, o resgate destes conhecimentos está sendo valorizado, através das etnociências. As práticas tradicionais em veterinária seguem o mesmo caminho. O novo paradigma para a produção agropecuária, trazido pela agroecologia, integra os conhecimentos tradicionais e aqueles ditos “modernos” para a moldagem de uma agricultura social, cultural, econômica e ecologicamente sustentável. Com base nesses parâmetros, este trabalho teve por objetivo avaliar plantas medicinais indicadas para uso como anti-séptico/desinfetante em situações-problema em produção animal, mais especificamente, em mastite bovina e dermatofitose, por uma comunidade agrícola. A coleta de informações referente ao uso das plantas foi realizada junto a COOPAVA, Cooperativa de Agricultores Assentados da reforma agrária, localizada no Município de Piratini, RS, utilizando método participativo, na moldagem de um planejamento de produção de leite em transição agroecológica. As plantas selecionadas foram *Baccharis trimera*, *Bidens pilosa*, *Eucalyptus sp.*, *Polygonum hydropiper* e *Tagetes minuta*. Utilizaram-se extratos hidroalcoólicos (EHA) e decoctos (DEC) das plantas selecionadas – soluções desinfetantes - para avaliar: atividade antibacteriana frente a microrganismos causadores de mastite, utilizando o método da microdiluição serial em placas para estabelecer atividade inibidora e inativadora dos extratos; concentração inibitória mínima para dermatófitos de interesse em saúde animal e humana; e a cinética de inativação de microrganismos relacionados a mastite bovina pelas soluções desinfetantes. Essas soluções desinfetantes foram confrontadas com 25 amostras bacterianas, sendo nove *Staphylococcus* coagulase positiva, sete *Staphylococcus* coagulase negativa, oito *Streptococcus* spp. e uma *Pseudomonas aeruginosa*. Todos os extratos avaliados apresentaram ação antibacteriana. O EHA de *Eucalyptus* foi o que apresentou maior atividade inibidora bacteriana no conjunto do experimento. Quanto à inativação, o EHA de *Eucalyptus*, o EHA *B. trimera* e o DEC *T. minuta* apresentaram os melhores resultados, inclusive atuando frente a *P. aeruginosa*, embora em concentração mais alta do que frente às outras bactérias ($p < 0,05$). Obteve-se atividade antifúngica de todos os EHA frente a todos os isolados avaliados, variando a CIM de 5,5% para EHA de *T. minuta* a 19,5% para EHA de *B. trimera*. Os decoctos de *B. trimera* e *P. hydropiper* foram os únicos ativos contra esses fungos. Os três EHA testados quanto a tempo de inativação tiveram bom desempenho frente a bactérias Gram positivas, com eficácia semelhante ao controle clorexidina a 0,18% ($p > 0,05$) frente a *S. agalactiae*, com e sem a presença de matéria orgânica e, com exceção do EHA de *B. trimera*, frente a *S. aureus* sem matéria orgânica. Os decoctos tiveram desempenho inferior, apresentando bom desempenho somente frente a *S. agalactiae*. O desinfetante controle foi o mais eficaz quando confrontado com *P. aeruginosa*. Todas as soluções desinfetantes foram sensíveis à matéria orgânica. Pode-se concluir que as plantas medicinais com indicativo anti-séptico/desinfetante podem ser úteis em sistemas de produção agroecológicos, em situações-problema relacionadas aos agentes testados.

Palavras-Chaves: Plantas medicinais, Mastite bovina, Anti-sépticos.

ABSTRACT

Since these ancient times, the succeeding civilization all over the world had used medicinal plants, in human and animal healthcare. The knowledge about it has evolved through trial and error methods and it's the cultural patrimony of the peoples. In consonance to the WHO strategies, the identification and valorization this knowledge is on, by the ethno sciences. Agroecology is the new paradigm that it focuses on a systemic vision to integrate of the traditional and non-traditional practices. Two can complement one another to achieve a cultural, economic, ecologic and social sustainable livestock health care delivery system. This purpose of the present study was to evaluate "in vitro" activity of medicinal plants used to disinfectant/antiseptic in practice livestock to bovine mastitis and dermatophytes disease. The informants were familiar agriculturist on the agrarian reform seatment, on Piratini city, RS, as previous report, using participatory approaches. The five medicinal plants were selected: *Baccharis trimera*, *Bidens pilosa*, *Eucalyptus* sp., *Polygonum hydropiper* and *Tagetes minuta*. Antibacterial activity (bacteriostatic or bactericidal) of the hidroalchoolic (EHA) or decoction (DEC) extracts were determined through the serial dilution method in the multiple tube system in the microplate against 25 contagious bovine mastitis bacterial – nine *Staphylococcus coagulase* positive, seven *Staphylococcus coagulase* negative, eight *Streptococcus* spp and a *P. aeruginosa*. Minimal Inhibitory Concentration for six samples of dermatophytes was determined by dilution methods in the microplates. To test antibacterial kinetic, EHA and DEC of *B. trimera*, *Eucalyptus* and *T. minuta* were confronted to *S. aureus*, *S. agalactiae* and *P. aeruginosa* in different times and with or without organic load, included chlorhexidine 0.18% by control. All extracts were antibacterial. EHA from leaves of *Eucalyptus* sp. was the most bacteriostatic effective, and the same extract plus EHA *B. trimera* and DEC *T. minuta* were the best bactericidal. *P. aeruginosa* was more resistant that Gram positive bacterial ($p < 0.05$). All EHA inhibited all dermatophytes valued. MIC was between 5.5% to EHA *T. minuta* and 19.5% to EHA *B. trimera*. DEC *B. trimera* and *P. hydropiper* were effective. In the kinetics experiment, the three EHA exhibited a good activity against Gram positive organisms. It were as strong to control, in presence or absence to organic load against *S. agalactiae*, and excluded EHA *B. trimera*, against *S. aureus* without organic load. The DEC were fewer effective. It was acted against *S. agalactiae* only. Chlorexidine was the best against *P. aeruginosa*. All disinfection solutions were sensible to organic load. The conclusion were that medicinal plants used ethnoknowledge system can to improved livestock health in the agroecologic systems, related to the studied transmitted agents.

Key-Words: Medicinal Plants, Bovine Mastitis, Antiseptics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Índice de intensidade de ação da solução desinfetante, indicado por uma variável ordinal e sua relação com a concentração bacteriana	60
FIGURA 2: Cinética de inativação de três bactérias frente à Clorexidina (0,55%) expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO)	74
FIGURA 3: Cinética de inativação de três bactérias frente ao EHA de <i>Eucalyptus spp</i> expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO)	74
FIGURA 4: Cinética de inativação de três bactérias frente ao EHA de <i>Tagetes minuta</i> expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO)	75
FIGURA 5: Cinética de inativação de três bactérias frente ao decocto de <i>Eucalyptus spp</i> expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO)	76
FIGURA 6: Cinética de inativação de três bactérias frente ao decocto de <i>Tagetes minuta</i> expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO)	76
FIGURA 7: Cinética de inativação de três bactérias frente ao decocto de <i>Baccharis trimera</i> expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO)	77
FIGURA 8: Cinética de inativação de três bactérias frente ao EHA de <i>Baccharis trimera</i> expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO)	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Caracterização das amostras bacterianas incluídas no trabalho quanto à reação de coagulase (<i>Staphylococcus spp.</i>) e antibiograma.	57
Tabela 2: Espécies de dermatófitos utilizadas para avaliação das soluções desinfetantes, sua identificação e origem.	61
TABELA 3: IINIB E IINAB médio e desvio padrão dos extratos de plantas com indicativo etnográfico desinfetante frente a isolados bacterianos de leite mastítico e padrões (n=25; r=2)	66
TABELA 4: IINIB E IINAB médio das diferentes concentrações das soluções desinfetantes frente a isolados de leite mastítico e padrões.	67
TABELA 5: IINIB e IINAB médio e desvio padrão das soluções desinfetantes frente aos diferentes grupos bacterianos isolados de leite mastítico e padrões (n=25; r=2)	67
TABELA 6: Atividade antibacteriana expressa em média de IINIB e IINAB de diversas concentrações de soluções desinfetantes obtidas a partir de extratos de plantas com indicativo etnográfico antisséptico/desinfetante frente a amostras de <i>Streptococcus spp</i> (n=8; r=2), isoladas de leite mastítico	69
TABELA 7: Atividade antibacteriana expressa em média de IINIB e IINAB de diversas concentrações de soluções desinfetantes obtidas a partir de extratos de plantas com indicativo etnográfico antisséptico/desinfetante frente a amostras de <i>Staphylococcus spp.</i> , coagulase positiva (n=9; r=2) isoladas de leite mastítico e padrão	70
TABELA 8: Atividade antibacteriana expressa em média de IINIB e IINAB de diversas concentrações de soluções desinfetantes obtidas a partir de extratos de plantas com indicativo etnográfico antisséptico/desinfetante frente a amostras de <i>Staphylococcus spp</i> coagulase negativa (n=7; r=2), isoladas de leite mastítico	71
TABELA 9: Atividade antibacteriana expressa em média de IINIB e IINAB de diversas concentrações de soluções desinfetantes obtidas a partir de extratos de plantas com indicativo etnográfico antisséptico/desinfetante frente a amostra de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=1; r=2)	72
TABELA 10: Concentração Inibitória Mínima (CIM) média das soluções desinfetantes obtidas a partir de extratos de plantas com indicativo etnográfico antisséptico/desinfetante extratos de plantas testadas frente a 6 diferentes isolados de dermatófitos. (n=6, r=2)	73

TABELA 11: Índice de Inibição (II)** médio das sete soluções desinfetantes sobre <i>S. agalactiae</i> em função do tempo e da presença de matéria orgânica (M.O.)	79
TABELA 12: Índice de Inibição (II) médio das sete soluções desinfetantes sobre <i>S. aureus</i> em função do tempo e da presença de matéria orgânica (M.O.)	80
TABELA 13: Índice de Inibição (II) médio das sete soluções desinfetantes sobre <i>P. aeruginosa</i> em função do tempo e da presença de matéria orgânica (M.O.)	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 As Plantas Medicinais e o Homem	16
2.2 Agroecologia e diálogo de Saberes	19
2.3 O Método Etnográfico e a Etnoveterinária	22
2.4 Plantas Medicinais como Antimicrobianos	26
2.5 Desinfecção/Anti-sepsia e seus Métodos de Avaliação em Plantas Medicinais	30
2.6 Mastite Bovina	31
2.7 Dermatofitose	41
2.8 As Plantas Seleccionadas	43
2.8.1 <i>Eucalyptus spp</i> (Labill) Myrtaceae	43
2.8.2 <i>Baccharis trimera</i> (Less) DC Compositae – Asteracea	45
2.8.3 <i>Tagetes minuta</i> (L.) Compositae – Asteracea	47
2.8.4 <i>Bidens pilosa</i> (L.) Compositae – Asteracea	48
2.8.5 <i>Polygonum punctatum</i>, (Elliot). Polygonaceae	50
3. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1 Plantas	52
3.1.1 Metodologia de Seleção das Plantas	52
3.1.2 Coleta, Secagem e Armazenamento	54
3.1.3 Produção dos Extratos	55
3.1.4 Decocto	55
3.1.5 Extrato Hidroalcólico	55
3.2 Microrganismos	55
3.2.1 Bactérias	55
3.2.2 Fungos	56
3.3 Método de Diluição – Microdiluição serial em placas	57
3.3.1 Microrganismos e Preparo do Inóculo	58
3.3.2 Diluição dos Extratos	58
3.3.3 Montagem das Placas, Incubação e Leitura	58

3.3.4 Desenho Experimental, Interpretação e Análise Estatística	59
3.4 Concentração Inibitória Mínima de Extratos de Plantas frente a Dermatófitos	60
3.4.1 Microrganismos e Preparo do Inóculo	60
3.4.2 Extratos, Montagem das Placas, Incubação e Leitura	61
3.4.3 Análise Estatística	61
3.5 Cinética de Inativação	62
3.5.1 Microorganismo e Preparo do Inóculo	62
3.5.2 Soluções Desinfetantes	62
3.5.3 Desenho Experimental	62
3.5.4 Análise Estatística	64
4 RESULTADOS	65
4.1 Método de Diluição	65
4.2 Ação Antifúngica	72
4.3 Cinética de Inativação de Bactérias Causadoras de Mastite	73
4.3.1 Estatística Descritiva, Efeito Tempo e Matéria Orgânica	73
4.3.2 Comparação da Atividade Antibacteriana	78
5 DISCUSSÃO	82
6 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE A – IINIB e IINAB de todas as repetições dos Testes de Diluição	112
APÊNDICE B - Cinética de inativação de Microrganismos relacionados à mastite bovina: Leituras e cálculo do Índice de Inativação.....	141
APÊNDICE C - Artigos enviados para publicação.....	148
APÊNDICE D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	175
APÊNDICE E – Análise estatística	175

1. INTRODUÇÃO

Durante os alguns milhares de anos da sua civilização, o homem apreendeu da natureza os recursos indispensáveis para sua evolução. Destes recursos naturais, as plantas medicinais estão entre aqueles que contribuíram com maior importância. Através da aprendizagem por tentativa, acerto e erro, as várias culturas tradicionais forjaram um acervo de produtos – unguentos, xaropes, chás e outros – que deram sustentação às práticas de cura de enfermidades e promoção da saúde.

Com as práticas contemporâneas ocidentais hegemônicas em saúde, baseado na utilização da medicina alopática com utilização de produtos industrializados, essas habilidades e princípios terapêuticos foram considerados ultrapassados e incapazes de contribuir com a saúde humana e animal. Porém, desde a Conferência sobre Atenção Primária de Alma-Ata, a época localizada na URSS, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o resgate das práticas tradicionais em saúde, entre elas as plantas medicinais. Posição reafirmada em Chiang Mai, na 41^o Assembléia Mundial da Saúde, apresentando na sua declaração final o título “Salvem plantas que salvam vidas” (AKERELE, 1988).

Nesta mesma perspectiva, em 2002 a OMS sob a coordenação do pesquisador chinês Ziaorui Zhang lança as “Estratégias da OMS para medicina tradicional” sob as seguintes bases:

“La medicina tradicional sigue jugando un importante papel en la atención sanitaria. En muchas partes del mundo es la forma de atención sanitaria preferida. El cualquier otro lugar, el uso de medicinas con base de hierbas y así llamadas terapias complementarias y alternativas está aumentando cada vez más. No existe un único determinante de popularidad. Sin embargo, la aceptación cultural de las prácticas tradicionales, junto con las percepciones de asequibilidad, seguridad y eficacia, y el interrogatorio de los enfoques de la medicina alopática, todos ellos juegan un papel.” (Zhang, 2003)

Também, na atenção primária e secundária em Medicina Veterinária o estudo e a utilização da medicina tradicional vêm ganhando espaço. A produção de alimentos de origem animal nas modernas criações baseia-se no uso em larga escala de produtos químicos de alto custo e que resultam em resíduos nos alimentos, com potencial (e comprovado) risco à saúde dos consumidores. Por exemplo, a Comunidade Européia tem restringido o uso de aditivos antibióticos químico-sintéticos na alimentação animal, criando diversas barreiras ao comércio internacional, na busca de

um alimento de menor risco a saúde da sua população e a redução da ocorrência de resistência bacteriana a antibióticos (Regulamento do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos aditivos destinados à alimentação animal, 2002). Na tentativa da manutenção da produtividade, começam a aparecer na literatura publicações que buscam validar saberes tradicionais associados à metodologia moderna de produção animal, utilizando extratos de plantas medicinais em substituição aos antibióticos e outros químicos-convencionais.

Por outro lado, os modernos métodos de produção não levam em conta as características culturais, sociológicas e econômicas dos agricultores familiares, determinando o alijamento deste grupo social dos meios de produção e aparecendo como resultado final o êxodo rural e a concentração de renda no campo.

Os enfoques dados pelo movimento da agroecologia, buscando a sustentabilidade da produção agropecuária, baseados na necessidade de gerar um conhecimento holístico, sistêmico, contextualizador, subjetivo e pluralista, nascido das culturas locais, reforçam a necessidade de trabalhos acadêmicos buscando resgatar e estabelecer bases científicas para os saberes populares.

O desenvolvimento de projetos nessa perspectiva leva a compreensão e a possibilidade de integração desses conhecimentos tradicionais nas áreas da atenção à saúde animal e métodos de produção com o conhecimento científico moderno, gerando novas tecnologias para atingir o desenvolvimento sustentável, culturalmente aceito e economicamente viável dos meios de produção.

Entre os problemas de saúde que afetam o gado leiteiro, a mastite infecciosa é a enfermidade de maior prevalência, determinando redução na produção de leite, perdas pelo descarte e morte de animais, e custos com tratamento. Na “moderna” propriedade leiteira, ocorre um amplo uso de drogas antibióticas e de desinfetantes químicos, já que, como ponto inicial de um programa de prevenção da enfermidade, encontra-se a higienização do ambiente e dos equipamentos, a anti-sepsia dos tetos, especialmente pós-ordenha, e no tratamento de vacas secas.

Agricultores e veterinários ainda lançam mão de fitoterápicos em mastite bovina, tanto para a prevenção quanto para tratamento. Predominam as práticas em tratamento, com a utilização de soluções ou pomadas medicinais a base de ervas para uso local ou a administração de plantas verdes ou secas via oral. Porém, muitas dessas

práticas já foram abandonadas, pois os agricultores não são estimulados a utilizá-las e há carência de estudos na área Veterinária.

As dermatofitoses são zoonoses de etiologia fúngica que afetam as camadas superficiais da pele afetando várias espécies animais. Os quimioterápicos antifúngicos possuem alto custo estimulando a busca de alternativas terapêuticas eficazes e mais eficientes.

Neste trabalho objetivou-se, à luz do marco teórico da Atenção Primária em Saúde e da Agroecologia, encontrar alternativas sustentáveis entre os recursos naturais renováveis, mais especificamente, com plantas com indicativo etnográfico medicinal, para o controle de mastite infecciosa bovina e dermatofitose. Este objetivo deve ser alcançado a partir da prática de agricultores familiares na aplicação de extratos de plantas, no sentido de alcançar base científica “in vitro” a ação anti-séptica/desinfetante dessas plantas na condição droga bruta, frente a microrganismos relacionado a situação-problema, utilizando o método da microdiluição seiral em placa. Também, busca-se averiguar fatores que interferem na ação anti-séptica/desinfetante dessas plantas como: forma de extração, concentração, tempo de contato e efeito matéria orgânica. Por último, através do cálculo de concentração inibitória mínima (CIM), pretende-se avaliar a atividade antifúngica dessas mesmas plantas a microrganismos causadores de dermatofitoses em humanos e animais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 As Plantas Medicinais e o Homem

A História do uso de plantas medicinais se confunde com a História do próprio homem. A referência em Gênesis sobre a orientação divina para Adão sobre as plantas medicinais simboliza este aspecto. Em textos das primeiras civilizações humanas que dominaram a escrita, já aparece m referências ao seu uso. Textos sumérios de 4000 anos atrás relacionaram em torno de 1000 plantas medicinais. A medicina ayurvédica parece ter se desenvolvido a mais de 5000 anos com o uso de plantas medicinais. No documento conhecido como “Código de Hamurabi”, já estão inscritos várias plantas com utilização terapêutica e diversas normatizações para atividades médico veterinárias. O Papiro de Ebers, datado da primeira metade do século XVI A.C., representa o primeiro tratado médico do Egito antigo e várias plantas são referidas com suas indicações medicinais (CUNHA, 2003; WANZALA et al., 2005). Há evidências que 60000 atrás, o homem de Neanderthal, que viveu na região do Iraque, utilizava plantas com fins medicinais (STOCKWELL apud DOMINGO & LÓPEZ-BREA, 2003).

A Medicina Veterinária tradicional tem evoluído conjuntamente com a espécie humana como pode ser exemplificado pelas práticas ainda aplicadas por comunidades tradicionais como os povos andinos, os massai, os somali, os tuaregue, entre muitos outros. O conhecimento destes povos tradicionais resistiu ao domínio do modelo de produção de conhecimento ocidental que impõe o seu modo de produção (WANZALA, op. cit).

O reconhecimento contemporâneo da importância da medicina tradicional é bastante recente. A Declaração de Alma-Ata (1978), construída na Conferência de Atenção Primária da OMS, antiga URSS, baliza o âmbito da Atenção Primária em Saúde (APS) como sendo “...os cuidados essenciais de saúde baseados em métodos e tecnologias práticas, cientificamente bem fundamentadas e socialmente aceitáveis colocadas ao alcance universal de indivíduos e famílias da comunidade, mediante sua plena participação e a um custo que a comunidade e o País possam manter em cada fase de seu desenvolvimento, no espírito de autoconfiança e automedicação...”. Esse documento valoriza a participação das comunidades no planejamento, na operação e no controle das ações em saúde. Também, enfatiza a priorização das ações de prevenção de

doenças e promoção da saúde e amplia o conceito de saúde, incluindo educação para saúde, nutrição e água de boa qualidade, saneamento básico, e inserindo a multisetorialidade nas ações em saúde, que incluem, ao menos, a agricultura, pecuária, produção de alimentos, indústria, educação, habitação, obras públicas e comunicação (AKERELE, 1988).

Na segunda conferência de APS, realizada em Adelaide, Austrália, o espírito de Alma-Ata é reafirmado. Nesse encontro, são estabelecidos quatro campos de ação prioritários para a APS – apoio à saúde da mulher, alimentação e nutrição, tabaco e álcool, e a criação de ambientes saudáveis. Inclui-se no último item, a compreensão de que o homem e a mulher são parte do complexo ecossistema universal, “...A extrema mas limitada diversidade de recursos naturais, usados para melhorar as condições de vida, é essencial ao ser humano”. Ressalta que o desenvolvimento industrial e agropecuário deve considerar prioritariamente a saúde da população, apoiado no conceito de desenvolvimento sustentável, e propõe que a saúde pública e os movimentos ecológicos juntem forças para o desenvolvimento sócio-econômico e dos recursos limitados do planeta (DECLARAÇÃO DE ADELAIDE, 1988).

No mesmo ano, a 41^o Assembléia Mundial de Saúde endossou a Declaração de Chiang Mai (Resolução 41.19, WHA) redigida alguns meses antes, em uma Assembléia sobre conservação de plantas medicinais realizada naquela cidade, Tailândia. Sob o título de “Salvem plantas que salvam vidas”, essa declaração insere definitivamente as plantas medicinais na agenda política e do interesse da saúde pública mundial (AKERELE, 1988).

No ano de 2002, percebendo a necessidade de definir o seu papel com relação a Medicina Tradicional a OMS lançou as “Estratégias da OMS sobre Medicina Tradicional, 2002-2005” (ZHANG, 2002), tratando da política, segurança, acessibilidade, eficácia, qualidade e uso racional da chamada Medicina Tradicional, Complementar, Alternativa ou não Convencional. A OMS se propõe a trabalhar, entre outras coisas, para fomentar os estudos e o uso racional de tais métodos terapêuticos. Nesse documento, Medicina Tradicional é conceituada como:

Um termo amplo que refere-se a medicina tradicional chinesa, a ayurvedica ou as diversas medicinas indígenas. Se incluem terapias com medicação a base de ervas, animais, minerais, ou sem medicação, como a acunpultura, as manuais ou espirituais.(Zhang, 2002)

Em muitos países, como é relatado, por exemplo, na China, a valorização da medicina tradicional e a associação de seus métodos com a medicina moderna têm promovido importantes avanços no seu sistema de saúde (HORN, 1969).

Embora a utilização da medicina tradicional seja principalmente em países em desenvolvimento, uma grande proporção da população de países ditos industrializados utilizam essas práticas. Segundo dados da OMS, 42% da população estado unidense, 49% da francesa e 70% da canadense utilizam algum método tradicional (OMS, 1998; HEALTH CANADÁ, 2001). O mercado mundial de ervas medicinais está em franco desenvolvimento e atinge mais de 20 bilhões de dólares ao ano (Conferencia das nações para o comercio e desenvolvimento, 2000; CALIXTO, 2003).

O Brasil abriga aproximadamente 22% da biodiversidade vegetal do planeta, em grande parte concentrada na floresta amazônica e no que resta da mata atlântica. No entanto, o Brasil contribui com algo em torno de 270 milhões de dólares, cerca de 5% do mercado de medicamentos, sendo 70% controlado por empresas transnacionais, sendo que muitas delas importam a matéria-prima. Esse mercado é um importante setor de diversificação da produção para a agricultura familiar e para os projetos de agricultura urbana, através da exploração sustentada de espécies nativas ou cultivadas (CALIXTO, 2003; CARVALHO et al. 2004; LOURENZANI et al. 2004). A utilização de plantas medicinais em sistemas de produção animal precisa ser feita com critério e atenção a biodisponibilidade da matéria-prima e o risco de extinção de plantas por uso predatório. Estratégias precisam ser aplicadas para manejo de reservas espontâneas de plantas ou a domesticação delas para uso medicinal (REIS et al., 2003).

A Legislação Brasileira sobre o assunto foi revisada por Silva et al. (2004). Os autores ressaltam a RDC n^o 17 da ANVISA, publicada em 2000, que dispõe sobre a regulamentação para o registro de medicamentos fitoterápicos que cria o “produto fitoterápico tradicional” passando a reconhecer a etnografia como base para obtenção do registro. (BRASIL, 2000).

O acesso ao patrimônio genético existente no território brasileiro e ao conhecimento tradicional é regulado pela MP 2.186-16, de 23 de agosto de 2001. Nesta Medida Provisória, fica garantido a “comunidade indígena ou comunidade local que criam, desenvolvem, detêm ou conservam conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético” ter referida a origem do conhecimento em todas as formas de divulgação e exploração, impedir o uso e divulgação dos conhecimentos por terceiros

não autorizados e perceber benefícios que possam ser gerados pela exploração do conhecimento (BRASIL, 2001).

Em 2006, através do Decreto 5.813, de 22 de junho de 2006, o Governo brasileiro dá forma de Lei a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Entre as Diretrizes, estão o reconhecimento das práticas populares com plantas medicinais, a necessidade de preservação da biodiversidade através do uso sustentável, promover a inclusão da agricultura familiar nos arranjos produtivos de plantas medicinais e garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso as plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006).

2.2. Agroecologia e o Diálogo dos Saberes

Durante o desenvolvimento do capitalismo, a agricultura foi vista como subordinada a indústria, útil apenas como produtor de alimentos para a hegemonia industrial/urbana dos países mais desenvolvidos e como reserva de mão-de-obra para a indústria. Para isso, havia necessidade da substituição dos modelos agrícolas tradicionais por outros ditos “modernos” baseados no aumento da escala de produção, em insumos externos, na especialização e na mecanização (NAVARRO, 1992). Esse processo trouxe como conseqüências uma agricultura cara que necessita da permanente intervenção dos governos para garantir preço, sistemas de produção com graves e difusos impactos no ambiente e que apesar de uma alta produtividade não foi capaz de resolver o problema da alimentação existente (FERNANDEZ & GARCIA, 2001).

Diversos pesquisadores passam a refletir sobre essas conseqüências. A partir da crítica do movimento ecológico e da insustentabilidade econômica do modelo hegemônico, aparece a agroecologia como proposta para o desenvolvimento sustentável. Isto é, a utilização de experiências produtivas de agricultura ecológica, para elaborar propostas de ações sociais coletivas que revelem a natureza depredadora do modelo produtivo agroindustrial hegemônico, para substituí-lo por outro que aponte para “uma agricultura sustentável, mais justa, economicamente viável e ecologicamente apropriada” (SEVILLA-GUZMAN, 2001).

Agroecologia é o reencontro do homem com a natureza, rompe com a visão mecanicista-cartesiana de que a terra é uma máquina e, artificialmente, separa o processo agrícola do ecossistema. Dessa forma, reaproxima o sistema de produção

agrícola de sua visão organicista e globalizadora da natureza como ser vivo (NAVARRO, 1992).

Ao rever-se o significado de rural, as suas inter-relações sócio-culturais e, mesmo sob uma visão funcionalista, a sua importância como produtor de alimento e de estabilidade social, passa-se a compreender a ruralidade (meio social rural) como uma categoria de pensamento do mundo social, com singularidades de modos de vida e sociabilidades. Essa postura se contrapõe àquelas que pressupõem que o rural é dependente do urbano (KARAM, 2002). A sustentabilidade do ponto de vista econômico, ecológico e cultural torna-se a mola mestra. O desenvolvimento é entendido como a realização de potencialidades sociais, culturais e econômicas de uma sociedade, em perfeita sintonia com seu entorno ambiental e seus valores políticos e éticos (CAPORAL & COSTABEBER, 2002).

Fernandez & Garcia (2001) chamam a reflexão sobre o modelo tecnológico da agricultura moderna economicamente inviável, com grande impacto ambiental e incapaz de reduzir a carência alimentar da população. Para os autores não é a capacidade técnica que impõe limites para a transposição do modelo de altos insumos não-renováveis, para outro sistema que se baseie na utilização de insumos locais renováveis.

A transformação da agricultura por conta da agroecologia está intimamente ligada à transformação da sociedade como um todo, não a uma simples substituição de insumos (MOREIRA & CARMO, 2004). A satisfação das necessidades alimentares e de matéria-prima da sociedade continua sendo o centro da história agroecológica. Porém, também é central, o caráter sustentável desde o ponto de vista social, econômico, ecológico e cultural, das formas de produzir (NAVARRO, 1992). O desenvolvimento sustentável é entendido como a capacidade de satisfazer as necessidades da geração presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras de satisfazer as suas (BRUNDTLAND REPORT, apud LEBEL, 2003).

Dessa forma, não se parte do pressuposto da negação seja do “moderno”, seja do “tradicional”. Ao contrário, a luz da informação e da sistemática contemporânea, atua-se no sentido de permitir que as diversas culturas existentes possam atuar conjuntamente para o crescimento da sociedade, sem partir do pressuposto da exclusão ou da superioridade de uma sobre a outra, e fazendo uso da metodologia científica disponível e adequada a cada realidade (FERNANDEZ & GARCIA, 2001).

Minayo et al. (1994) traz a perspectiva da historicidade das sociedades e do embate constante entre o que está dado e o que está sendo construído. A lógica homogeneizadora da ciência moderna determina a modelação de todos os sistemas culturais e, por consequência, os sistemas de produção à forma das culturas dominantes. No entanto, estes princípios não atingem a todos de forma idêntica e nem no mesmo momento histórico. Assim, classificam-se os indivíduos de uma sociedade colocando de um lado os modernos ou adaptados e de outro os ultrapassados ou inaptos, criando os caminhos para a exclusão social típica dos tempos atuais. Para o campo, a tecnificação é o correto, o tradicional é o incorreto (PÉREZ E CALDERON, 2003).

Por sua vez, Morin (2000) expõe que somos nós que produzimos a sociedade que nos produz. Somos parte do todo e trazemos no nosso interior esse todo na forma da cultura e das normas sociais. Então, propõe o pensamento complexo, aceitando o desafio da incerteza e ligando (contextualizando e globalizando) as partes e o todo através do princípio sistêmico – *complexus significa originalmente o que se tece junto*.

Nesta construção, entende-se ciência como um conjunto de saberes acumulados até agora pelo homem, assim como uma maneira de chegar até eles e um caminho para adquirir novos conhecimentos. Tal como um sistema, está composto por subsistemas que se influenciam entre si, de forma dialética (CURRÁS, 1994). No mesmo sentido, Kruger (1997) entende que tecnologia não é um conjunto de técnicas e nem é a sofisticação da técnica. “A passagem da técnica para a tecnologia não é uma questão de gradação ou desenvolvimento interno ao campo das técnicas, refere-se antes à condição sócio-econômica em que a tecnologia está inserida e a sua fundamentação científica.”

A forma de uso das plantas medicinais emanam de uma concepção de vida e da percepção da natureza como um todo indivisível. A sua composição varia sob diversas condições – etapa de desenvolvimento, época do ano, solo, clima, luz, presença de outras plantas. Essas inter-relações entre metabólitos e o equilíbrio que encontram em determinado indivíduo, resultam em um mecanismo de ação muito diferente daquele de um princípio ativo isolado e concentrado. A simples validação científica, desconsiderando todos esses fatores, estabelece uma subordinação dos saberes tradicionais ao saber científico, tornando o diálogo entre os saberes improvável (ANÔNIMO, 2004).

Medeiros & Cabral (2001) questionam o privilégio da medicina “moderna” sobre a fitoterapia na sociedade ocidental, remetendo ao fato que a fitoterapia, em geral tem menor quantidade de contra-indicações e de efeitos colaterais. Apontam para o

cruzamento dos saberes, popular e acadêmico-científico, o popular desvelado pelo senso comum e o científico pela bibliografia e a produção acadêmica, intermediado pela dialogicidade crítica entre pesquisador e os detentores do conhecimento tradicional, segundo Freire (1980), como a forma de produção conjunta do conhecimento.

Neste sentido, a agroecologia como ciência interdisciplinar se converte em importante ferramenta para alcançar o desenvolvimento sócio-econômico em bases ecológicas e ambientais sustentáveis. O desafio é integrar os diferentes enfoques em estudos com rigor científico, necessariamente, integrando as realidades sociais e ecológicas das comunidades rurais (MÉNDEZ & GLIESSMAN, 2002).

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

2.3 O Método Etnográfico e a Etnoveterinária

O conhecimento etnoveterinário reflete a experiência de vida dos povos. A curiosidade insatisfeita de pessoas que através de trabalho, com acerto e erro, desenvolveram um rico conhecimento através dos séculos de história e transmitiram, pela expressão oral, esse conhecimento entre as gerações. Envolvem cuidados com os animais, cura, sistemas de manejo, alimentos e condutas alimentares, seleção de raças e práticas de cruzamento, ervas, rituais, conhecimento etnoepidemiológico de vetores, patógenos, hospedeiros e doenças (WANZALA et al., 2005).

A etnobiologia ou a ciência do “Folk” integra áreas das ciências humanas e biológicas, recuperando conhecimentos, habilidades e o uso dos recursos naturais integrados na cultura das sociedades (POSEY, 1987).

McCorkle (1986) apud Pieroni et al. (2004) introduziu o termo nos meios acadêmicos. Ela conceitua a etnoveterinária como a “investigação sistemática e a aplicação do conhecimento tradicional (“folk”) em medicina veterinária, teoria e prática”, incluindo as práticas sociais e os caminhos pelo quais o conhecimento é introduzido na comunidade. Mathias (2000) explicita esse conceito entendendo que são “as crenças, conhecimentos, habilidades, métodos e práticas tradicionais pertinentes aos cuidados com os animais”.

Martin (1996) refere-se ao prefixo “etnos” como o olhar das pessoas sobre o mundo em seu entorno. Acrescenta que a presença do prefixo seguido por uma especialidade acadêmica indica uma visão holística de como a vida é manejada, desde o ponto de vista científico, filosófico e cultural.

Akabwai et al., (1997) entendem que a etnoveterinária é dinâmica, sempre com o incremento de novas informações gerados localmente ou introduzidas e adaptadas localmente. Introduzem quatro idéias que envolvem o termo etnoveterinária:

- *são os conhecimentos que organizam as estratégias de produção e saúde animal em sistemas de produção não industrializados;*
- *também conhecidos como “conhecimento veterinário existente”, é a fusão das informações tradicionais e ocidentais sobre o ambiente, mercado, saúde e nutrição animal, padrões de doenças e estratégias de manejo;*
- *é aquele conhecimento que é experimental, mágico ou mítico, tradicional e experimentado na natureza;*
- *é a soma do conhecimento local – passado e presente.*

De uma forma geral, todos concordam de que a etnoveterinária é um conhecimento interdisciplinar, holístico que busca resgatar os saberes, imaginários, valores e crenças que afetam as relações que são estabelecidas entre o homem, os animais e o seu entorno. Ela está voltada, não exclusivamente, para os saberes ou práticas pecuárias realizadas por grupos sociais ditos tradicionais – camponeses, indígenas e afros latino-americanos – dando ênfase ao uso de plantas em geral. Ela abrange vários aspectos entre eles a etnofarmacologia (PÉREZ & CALDERON, 2003; IMRIE, 2005, WANZALA ET AL., 2005).

A etnofarmacologia, que trata do uso de plantas e outros métodos tradicionais de manutenção e recuperação da saúde, evoluiu apoiada no método científico, na busca de

validação dos saberes populares. A maneira de entender a alteração de saúde na cultura popular difere do padrão da medicina moderna ao compreender a enfermidade como o sinal ou sintoma observado e não através da caracterização de uma doença em si. Assim, não é suficiente para as ciências “etno” saber apenas qual planta e em que dose é utilizada para uma determinada enfermidade. Necessita-se compreender os conceitos saúde/doença da população, analisar os sinais e sintomas a eles associados, como é preparado, administrado e as conseqüências de um tratamento sob a ótica da cultura local para então relacionar esses conceitos com os conceitos biomédicos modernos (ELISABETSKY & SOUZA, 2003).

As plantas para os povos tradicionais fazem parte da unidade da natureza e da tradição, como seres de entidade superior, por isso eram utilizadas para reequilibrar o indivíduo, o que delimita o conceito o de saúde nessas culturas (MENA, 2005).

PÉREZ & CALDERON (2003) ressaltam que a etnoveterinária é um conhecimento transdisciplinar que busca resgatar o vínculo das partes com o todo, permitindo ao observar recriar os vácuos existentes entre as várias disciplinas de forma crítica e histórica.

A pesquisa baseada na etnografia através da coleta de dados e a consolidação em bases científicas se apresentam sob vários aspectos que podem ser resumidos, segundo Lapa et al., (1997) por:

- *razões sociais imediatas - retorno da informação melhorada;*
- *razões terapêuticas – medicamento com novo espectro,*
- *razões botânicas – influência no ecossistema,*
- *razões éticas – veneno ou placebo;*
- *razões empresariais – desenvolvimento de novos produtos;*
- *razões acadêmicas - desenvolvimento sustentado.*

Neste escopo de razões, a questão “A quem se destina o conhecimento produzido?” é de crucial importância. O retorno das informações a comunidade de origem de forma elaborada é um compromisso ético a ser assumido pelo pesquisador, contribuindo com o desenvolvimento cultural e a preservação da biodiversidade da comunidade ou grupo estudado (JORGE & MORAES, 2002).

O método etnofarmacológico na pesquisa de plantas medicinais apresenta, em geral, estudo em oito etapas – 1. Coleta e análise dos dados etnofarmacológicos; 2. Identificação botânica; 3. Pesquisa bibliográfica; 4. Análise química das classes de

compostos presentes na planta; 5. Estudo farmacológico preliminar do extrato bruto; 6. Fracionamento químico; 7. Estudos farmacológicos e toxicológicos; 8. Caracterização da estrutura química das substâncias isoladas (ELISABETSKY & SOUZA, 2003). Porém, esse modelo é demorado e caro considerando as necessidades dos países em desenvolvimento. A redução desse processo pode ser feita através de: 1. antropologia e botânica: coleta de dados sobre a preparação popular de plantas; 2. toxicologia: realização de testes toxicológicos, diretamente com a preparação popular; 3. testes aplicados de bioatividade: verificação da atividade biológica das plantas, com modelo pertinente para a atividade procurada, realizada através de ensaios controlados com a indicação e preparação tradicional/popular (AVANCINI, 2002).

Ghotge et al. (2002) relataram uma experiência em etnoveterinária de mulheres cientistas veterinárias na Índia e propõe um método de validação de saberes populares em plantas medicinais ainda um pouco mais reduzido. A partir de um banco de dados etnográficos de 700 tratamentos utilizados por práticos em veterinária, os autores dividiram estes tratamentos em três grupos – plantas com grande número de informações empíricas e muitas referências na literatura foram imediatamente recomendadas para uso; plantas com muitas informações empíricas, mas pouca bibliografia científica foram consideradas plantas por validar e iniciou-se imediatamente pesquisa para este fim; plantas com pouca informação empírica foram consideradas por validar, mas não prioritárias para pesquisa em curto prazo.

Na última década, pesquisadores de diversos povos têm direcionado a sua atenção para o resgate dos saberes populares em veterinária. Lans & Brown (1998) utilizando método etnográfico que envolveu a entrevista com crianças na escola, produtores individuais e em grupos, e a revisão da literatura local, relataram o uso de 76 plantas medicinais em práticas etnoveterinárias em Trinidad-Tobago. Nesse trabalho, destacam-se o uso para endoparasitas, lesões internas e externas e condições relacionadas com a prenhez.

Van der Merwe et al. (2001) identificaram 45 plantas utilizadas sozinhas ou em associações para 29 alterações de saúde dos animais na África do Sul. McGaw et al. (2005) avaliaram diferentes extratos de plantas utilizadas na etnoveterinária da África do Sul quanto a seu efeito antibacteriano e antihelmíntico, encontrando atividade antihelmíntica e atividade frente a bactérias Gram positivas e/ou Gram negativas em muitas delas.

Viegi et al. (2003) revisaram as diversas publicações existentes na Itália sobre fitoterapia em medicina veterinária encontrando mais de 260 espécies de plantas utilizadas para os mais variados problemas de saúde animal. Esses autores relataram o uso de cinco plantas nativas (*Brassica oleracea*, *Avena sativa*, *Anagallis arvensis*, *Linum usitatissimum* e *Scrophularia canina*) para o tratamento de mastite e a utilização de *Buxus sempervirens* na cama das vacas para prevenir a ocorrência de mastite. O tratamento de problemas de pele relacionados como “dermatoses” é executado com 12 espécies diferentes de planta.

Também na Itália, Pieroni et al. (2004) descrevem remédios naturais e nutracêuticos utilizados em etnoveterinária no sul daquele País. Foram identificadas ao redor de 40 preparações para uso veterinário e diversas plantas utilizadas como nutracêuticos objetivando melhorar a saúde animal e melhorar a qualidade do leite e seus derivados.

Guarrera et al. (2005), pesquisando em região da Basilicata, sul da Itália, encontraram 15 plantas utilizadas em etnoveterinária, enquanto 45 eram usadas na medicina humana.

Tabuti et al. (2003) descreveram os resultados de uma pesquisa etnoveterinária em Uganda, onde foram relatadas 33 doenças ocorrendo em ruminantes com 38 espécies de plantas utilizadas para tratamento. As raízes eram porção da planta mais utilizada (37,5%) seguida pelas folhas (27,5%) e frutos (10%).

Van Leeuwen (2001) elaborou um manual de conhecimentos campesinos em El Salvador onde lista uma série de procedimentos em medicina tradicional naquele País. Descreve o uso de chichipince (*Hamelia patens*) em decocto intra-mamário para tratamento de mastite, além do uso de limão para massagiar o úbere e mel para tratamento de feridas externas do teto.

Muhammad et al (2005) relata o uso de plantas medicinais e outros métodos de medicina veterinária tradicional por tratadores de camelos no Paquistão, listando 15 plantas para as mais diversas enfermidades dos animais.

2.4. Plantas Medicinais como Antimicrobianas

Embora, desde a antiguidade os povos utilizem plantas na conservação de alimentos, o estudo sistemático das plantas como antibióticos é relativamente recente.

Diversos condimentos, como alho, orégano, tomilho e muitos outros, tem demonstrado atividade antimicrobiana, explicando a sua utilização histórica (BEDIN et al., 1998; OGARA et al., 2000; LAMBERT et al., 2001, CARVALHO et al., 2004).

Sartoratto et al. (2004) avaliaram óleos essenciais de oito plantas aromáticas utilizadas no Brasil e encontraram atividade antibacteriana e/ou anti-candida em todas elas. *Aloysia triphila* e *Thymus vulgaris* foram as plantas que apresentaram CIM mais baixo frente a maioria das bactérias utilizadas enquanto que *Mentha piperita* foi a mais ativa frente a *Candida. albicans*. Nenhuma atuou sobre *Staphylococcus epidermidis* ou *Pseudomonas aeruginosa*.

Em geral, os princípios ativos das plantas medicinais com atividade antimicrobiana são resultados do metabolismo secundário destas e acumulados em um ou vários dos seus tecidos. De uma forma geral, as plantas são capazes de produzir mais de 100.000 desses produtos naturais de baixo peso molecular. Os metabólitos secundários se diferenciam dos primários por não serem essenciais para a vida da planta. Estas substâncias podem dividir-se em dois grupos: as fitoanticipinas presentes nas plantas de forma constitutiva e as fitoalexinas produzidas como resposta a um estímulo externo, em geral, uma agressão por microrganismo ou parasito. Dentre os grupos químicos mais comumente relacionados com atividade antimicrobiana, estão derivados fenólicos - óleos essenciais, flavonóides, quinonas, taninos, alcalóides e outros – e alguns compostos enxofrados (DIXON, 2001; DOMINGO & LÓPEZ-BREA, 2003; SIMÕES et al., 2003).

Muitos autores têm buscado plantas que apresentem ação antimicrobiana. A maioria dos trabalhos concentra-se em países da África, Ásia e América Latina, onde se encontra o maior número de espécies vegetais (GUERRA & NODARI, 2003).

Quiroga et al. (2001) procuraram plantas da flora argentina com ação antifúngica. Testaram extratos etanólicos de 15 plantas e quatro apresentaram atividade antifúngica – *Larrea dicatricata*, *Zuccagnia punctata*, *Larrea cuneifolia* e *Prosopanche americana*.

Gonçalves et al. (2005) estudaram o potencial antibacteriano do extrato hidroalcoólico de 17 árvores nativas brasileiras. Servindo-se do método de difusão em Agar, encontraram que 25% destas possuíam ação antibacteriana, destacando-se a *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) e *Eugenia uniflora* (pitangueira) que

atuaram sobre *Escherichia coli*. Nenhum dos extratos testados atuou sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Holetz et al. (2002) testaram o extrato hidroalcoólico de 13 plantas brasileiras utilizadas como medicinal frente a bactérias e fungos de importância clínica para humanos, utilizando a técnica da microdiluição em caldo. Apenas duas delas não apresentaram nenhuma ação antimicrobiana. *Psidium guajava* (goiabeira), *Piper regnellii* (pariparoba), *Eugenia uniflora* (pitangueira) e *Punica granatum* (romã) apresentaram as menores concentrações inibitórias mínimas (CIM). Somente o extrato de goiaba foi ativo frente *Candida albicans*.

Para avaliar extratos etanólicos de plantas medicinais australianas, Palombo & Semple (2001) utilizaram o método de diluição como “screening”. Das 39 plantas testadas, 12 apresentaram ação antimicrobiana, sendo a *Eremophila duttoni* considerada a mais ativa. Essa planta é utilizada na medicina tradicional local para dor de ouvido, doença respiratória e inflamação dos olhos. O extrato desta planta foi submetido a ensaio de inibição da curva de crescimento bacteriano. Culturas de bactérias Gram positivas foram acrescentadas a meio de cultura e ao extrato e incubadas à 37⁰C. Coletas de amostras nos tempos 0, 1, 2, 4, e 6 horas foram realizadas e analisadas no espectrofotômetro. O extrato foi capaz de inibir o crescimento de *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* em 1 hora e de *Streptococcus pyogenes* em 2 horas de incubação.

Cota et al. (2003) avaliaram a ação antimicrobiana de extrato etanólico e frações de *Coccoloba achrosticoides* demonstrando ação sobre *Micrococcus luteus* e *S. aureus*.

Pereira et al. (2004) enfrentaram o óleo de 3 plantas medicinais –*Ocimum gratissimum* (Alfavacão), *Cymbopogon citratus* (capim limão) e *Salvia Officinalis* (salvia) a 100 amostras bacterianas, a maioria Gram negativas, isoladas de infecção urinária, utilizando o método de difusão. O óleo de salvia foi o que apresentou maior eficácia, inibindo 94 das amostras testadas. Nenhum dos três extratos inibiu *P. aeruginosa*.

Loguercio et al. (2005) avaliou a atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de jambolão (*Syzygium cumini*). O extrato inibiu todos os 17 isolados bacterianos, Gram positivos e Gram negativos, testados pelo método de difusão.

Vieira et al. (2001) demonstraram a ação antibacteriana de extratos hidroalcoólico, acetônico e decocto de goiabeira (*Psidium guajava*) frente *S. aureus* e *E. coli* isolados de peixe e camarão comercial.

Feresin et al. (2001) estudaram a atividade antibacteriana de diferentes extratos de seis plantas da flora nativa da Argentina, utilizadas na medicina tradicional na Província de San Juan e encontraram forte ação antibacteriana e antifúngica no extrato obtido com hexano e com diclorometano de carqueja (*B. grisebachii*), inibindo crescimento de *S. aureus* resistente a meticilina, *Microsporun canis*, *M. gypseum*, *Tricophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*.

Cerdeiras et al. (2000) demonstraram atividade antibacteriana em compostos de *Ibicella lítea*, conhecida no Uruguai como “cuerno del diablo” e utilizada para tratamento de infecções nos olhos e na pele. Olano et al. (1996) já haviam demonstrado atividade antibacteriana de extratos aquoso e etanólico desta planta.

Tereschuk et al. (2003) estudaram *Tagetes terniflora*, planta nativa na Argentina, utilizada pela população como condimento e para tratamento de doenças infecciosas, quanto a sua atividade antibacteriana e demonstraram ação sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas a partir de extratos de diferentes solventes, inclusive o aquoso.

Coelho de Souza et al. (2004), a partir de uma fonte etnográfica, testaram, pelo método de difusão, extratos metanólicos de dezoito plantas encontradas no Rio Grande do Sul e citadas como possuidoras de ação antimicrobiana. Extratos de *Chaptalia nutans*, *Cordia monosperma*, *Echinodorus grandiflorus*, *Eugenia uniflora*, *Leonurus sibiricus*, *Luehea divaricata*, *Malva sylvestris*, *Ocotea odorífera*, *Parapiptadenia rígida*, *Pluchea sagitalis*, *Psidium cattleyanum* e *Senna neglecta* apresentaram ação frente, ao menos, a uma bactéria testada.

Através do método de pesquisa etnográfica, o grupo de pesquisa “Medicina veterinária preventiva e saúde pública/UFRGS” tem avaliado diversas espécies utilizadas na medicina popular com atividade antibacteriana. Avancini et al (2000) encontraram atividade bactericida e bacteriostática a partir do decocto de partes aéreas de *Baccharis trimera*. Aplicando a técnica dos tubos múltiplos, esse extrato inativou *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* e *Salmonella gallinarum*.

Souza et al. (2000) relataram ação antibacteriana do decocto de *Tagetes minuta* frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella pullorum* e *Escherichia coli*.

Então, diversos outros extratos foram caracterizados quanto a sua atividade antibacteriana – *Origanum apliedii* (BEDIN et al, 1998), *Casaeria sylvestris* (chá-de-bugre, guaçatonga) (WIEST & GUTKOSKI, 1999), *Hypericum caprifoliatum* (AVANCINI et al., 2002), *Cuphea mesostomom* Koehne (sete-sangrias) (BORTOLLINI et al., 2003) e várias plantas condimentares (CARVALHO et al., 2005).

2.5 Desinfecção / Anti-sepsia e seus Métodos de Avaliação em Plantas Medicinais

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

A detecção de atividade antimicrobiana das plantas medicinais é realizada através da exposição dos microrganismos aos extratos da planta a ser testada. Existem muitos métodos descritos com esse objetivo, porém eles distribuem-se sob três princípios básicos – os métodos de difusão, de diluição e de bio-autografia (RIOS et al., 1988). Segundo esses autores, os métodos de diluição são mais úteis já que eles são simples, com boa reprodutibilidade, permitem o teste de extratos pouco solúveis em solvente aquoso e não dependem da capacidade de difusão do princípio ativo no meio de cultura.

O método de diluição pode ser realizado em base aquosa ou líquida. Os resultados obtidos quanto à concentração inibitória mínima são comparáveis. Porém, o método realizado sob meio líquido possui a vantagem de permitir a identificação da atividade bacteriostática e/ou bactericida do extrato, enquanto a técnica em meio sólido facilita testar grande número de cepas bacterianas com menor custo e tempo (RIOS, op.cit.).

Alguns fatores podem interferir nos resultados da avaliação “in vitro” dos extratos de plantas, em especial, o método de extração, o volume do inóculo, a composição do meio de cultura, o pH e a temperatura de incubação. (RIOS, op. cit.).

A modificação na técnica de diluição em meio líquido introduzida por Avancini (2000, 2002), adicionando as diluições sucessivas do inóculo bacteriano, às várias diluições de desinfetante, aproximou a metodologia de avaliação dos desinfetantes ao encontrando à campo. Em várias situações problema, como por exemplo, na superfície do teto, é provável que o título infectante de um microrganismo não atinja os altos índices indicados nas metodologias tradicionais (AVANCINI et al., 2000).

Uma das características mais importante da técnica de diluição é a possibilidade de identificar e diferenciar o efeito bactericida (inativador) ou bacteriostático (inibidor) do desinfetante (RIOS et al., 1988). Para que essa diferenciação possa ser feita, acrescenta-se ao meio de cultura substâncias capazes de interferir na ação residual do desinfetante que, então, permitem aos microrganismos, se inibidos, retornar ao seu estado vegetativo. Essas substâncias ou conjunto de substâncias são chamadas neutralizantes, inativadores ou desinibidores (REYBROUCK et al., 1979; ESPIGARES et al., 2003).

Além da avaliação da efetividade específica do desinfetante / anti-séptico a utilizar, deve-se considerar os fatores que podem interferir na sua ação “in vivo”. Os fatores mais comumente descritos como intervenientes na ação do desinfetante são a concentração do desinfetante, a carga de microrganismos, o tempo de exposição, a temperatura, o pH, a presença de matéria orgânica e o fator suporte, sendo variável a sensibilidade dos desinfetantes frente a cada um desses fatores (SCHLIESSER & STRAUCH, 1981).

Sassone et al. (2003) avaliaram a atividade antibacteriana de Clorexidina e hipoclorito de sódio sobre microrganismos envolvidos em infecções orais. Nas condições experimentais, tanto hipoclorito de sódio quanto clorexidina foram efetivas contra as bactérias testadas em tempo de contato “imediatamente” e na presença de matéria orgânica (0,5% de albumina sérica bovina), com exceção da clorexidina a 0,12% frente a *Enterococcus faecalis*.

2.6 Mastite Bovina

Mastite é compreendida como a reação inflamatória da glândula mamária causada por agentes de natureza infecciosa, tóxica ou traumática. Ela se caracteriza pela alteração física, química e, em grande parte dos casos, microbiológica do leite e por

alterações patológicas na glândula mamária, típica de uma resposta inflamatória (SCHALM et al., 1971).

Mastite é a enfermidade mais prevalente dos bovinos leiteiros. As perdas econômicas mundiais estão estimadas em trinta e cinco bilhões de dólares por ano (WELLENBERG et al., 2002). Entre os componentes deste custo estão tratamento, descarte do leite alterado, redução na produção dos animais, mortes, perda definitiva de produção e descarte precoce de animais, custo do trabalho do agricultor e do veterinário, além das consequências econômicas para a indústria do leite pelo ingresso de leite de qualidade alterada (DEGRAVES & FETROW; 1993; HILTERTON & BERRY, 2005).

A mastite clínica é diagnosticada pelo exame clínico do animal, podendo-se detectar alterações sistêmicas (febre, anorexia e, inclusive, a morte do animal) ou do úbere (calor, edema, dor, endurecimento à palpação), ou através de alterações do leite, como a presença de sangue, coágulos, flocos ou pús. Para melhor observação do aspecto do leite, usa-se coletar os primeiros jatos de leite em um recipiente de fundo negro e/ou telado. A mastite sub-clínica é detectada por técnicas indiretas que demonstrem o aumento da quantidade de células somáticas por contagem direta (CCS) ou por métodos químicos que permitam obter uma estimativa da quantidade de células presentes no leite, sendo o mais utilizado o “California mastitis test” (CMT) (RADOSTITS et al., 1994).

De uma forma geral, a mastite bovina possui caráter infeccioso, comumente, determinada por bactérias, fungos, algas ou clamídias. Os principais microrganismos encontrados associados à mastite bovina são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp coagulase negativos, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *Streptococcus* sp. de origem fecal, *Corynebacterium bovis*, enterobactérias e outras bactérias Gram negativas, leveduras e algas do gênero *Prototheca* sp (SCHALM, 1971; FERREIRO et al., 1985; ADORNES et al., 1995; COSTA et al., 1995; GOMES et al., 1996; PINTO et al., 1997; BRITO et., 1999). Esses patógenos alcançam a glândula mamária via ducto do teto e migram até o parênquima da glândula mamária causando inflamação (SCHALM, 1971).

A redução na produção de leite devido à ocorrência de mastite subclínica é calculada entre 18-24% em um quarto infectado por *S. agalactiae*, 10-19% quando infectado por *S. aureus*, 26% no caso de *S. uberis* e 20% na infecção por *S. dysgalactiae*, os principais agentes de mastite (McLEOD & WILSON, 1951;

O'DONOVAN et al., 1960; KING, 1969). Esses autores ainda demonstram a perda de qualidade do leite infectado, expresso, principalmente, em redução do teor de gordura e de sólidos totais.

Vacas com mastite clínica tem maior perda de produção quando o caso ocorre no terço inicial da lactação, quando acomete vacas múltiparas, além da ocorrência de mastite clínica reduzir a duração da lactação e aumentar a taxa de descarte. O tipo de microrganismo causador da mastite clínica parece ser de menor importância na redução da produção (ERB et al., 1985; BARTLETT et al., 1991a; BARTLETT et al., 1991b). Barker et al. (1998) descreveram redução na eficiência reprodutiva de vacas com mastite, maior intervalo até o primeiro cio, necessidade de maior número de inseminações para conceber e maior tempo entre o parto e a concepção. Resultados reafirmados por Schrick et al. (2001) que ainda acrescentam que vacas com mastite clínica entre o primeiro serviço e a prenhez tem ampliado ainda mais o período parto/concepção e o número de coberturas por gestação, enquanto vacas com mastite sub-clínica neste período não sofrem esse efeito.

A incidência da enfermidade varia com a idade do animal e com a fase da lactação, ocorrendo 50% dos casos nos primeiros 60 dias pós-parto. Hillerton & Berry (2005) relataram uma incidência de mastite clínica no Reino Unido de 25% das vacas em ordenha/ano, com média de 40 casos/ por 100 vacas ano.

Busato et al. (2000) estudaram através de estudo longitudinal uma amostragem das propriedades certificadas como orgânica na Suíça. Encontraram prevalência de mastite sub-clínica de 21% nos primeiros 100 dias de lactação e de 34,5% de 100-305 dias. Como fatores de risco, encontraram tempo de lactação, a idade da vaca. Nas propriedades em que os produtores realizavam “California Mastitis Test” (CMT) periodicamente havia menor risco de mastite.

Grande parte dos casos de mastite são sub-clínicos, nos quais o número de células somáticas no leite encontra-se aumentado, porém não são observadas alterações físicas macroscópicas do leite (SEARS et al., 1993).

De acordo com as características epidemiológicas, a mastite infecciosa pode ser dividida em contagiosa ou ambiental. Mastite contagiosa é aquela em que o reservatório primário é a própria vaca e a prevalência de infecção intra-mamária devido a aquele patógeno é alta. Os patógenos que se adequam a essa descrição são o *S. agalactiae*, *S.*

aureus, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp* e *S. dysgalactiae*. Esses microrganismos são transmitidos por fômites da vaca infectada à não infectada. As mãos do ordenhador, a máquina de ordenha e os materiais utilizados para lavar e secar o úbere são os fômites mais importantes e as medidas de higiene durante e logo após a ordenha são muito eficazes para o seu controle (FOX & GAY, 1993).

Entende-se por mastite ambiental, aquela em que o reservatório primário do patógeno é o ambiente e a exposição do quarto não infectado pode ocorrer em qualquer momento da vida do animal, durante a ordenha, entre as ordenhas, durante o período seco ou, mesmo, antes da primeira lactação. Os agentes mais comuns são bactérias Gram negativas (*E. coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Pseudomonas*, *Proteus e Serratia*, as mais comuns) e *Streptococcus* ambientais (*S. uberis* e outros) (BRAMLEY & DODD, 1984; SMITH & HOGAN, 1993).

Apesar de normalmente descrito como patógeno ambiental, Schukken et al. (2004) rastrearam geneticamente um surto de *S. uberis* em um rebanho estabelecendo evidências da transmissão da bactéria entre animais.

A produção da enzima coagulase é utilizada para dividir os *Staphylococcus* em dois grupos: Coagulase positivo formado pelo *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, rotineiramente agrupados como *S. aureus*, e coagulase negativo. (SEARS et al., 1993).

Staphylococcus coagulase negativa são considerados patógenos menores. Apesar disso, Benites et al. (2002) encontraram resultados estatisticamente semelhantes quando comparou o isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa de quartos com lesão histopatológica, indicando mastite. Existem muitas espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa encontradas em bovinos, sendo considerados parte da flora da pele dos bovinos. Entretanto, algumas espécies habitam o canal do teto e estão, frequentemente, envolvidas com mastite em vacas primíparas ou múltíparas, comportando-se como agentes contagiosos (TRINIDAD et al., 1990; MATTHEWS et al., 1992).

O padrão moderno de produção de leite indica cinco eixos principais num programa de controle de mastite – regulagem e higienização da máquina de ordenha ao menos anualmente, para que ela não seja a rota de transmissão; desinfecção de tetos pós-ordenha com desinfetante efetivo para reduzir exposição; tratamento de todos os casos de mastite clínica imediatamente para minimizar a exposição e reduzir a duração

do caso; tratamento de vacas secas e eliminação de animais com infecção crônica ou recorrente (RADOSTITS et al., 1994; HILLERTON & BERRY, 2004). Ekman (2002), embora concorde com essas medidas, ressalta a importância nas ações sobre o ambiente como a higiene dos estábulos, uma rotina de ordenha limpa e correta que não cause danos aos animais. Laranja & Machado (1994) analisaram um programa de prevenção e controle de mastite que constava de seis pontos – tratamento da vaca seca, tratamento de casos de mastite clínica, bom manejo de ordenha, bom funcionamento da máquina de ordenha, descarte ou segregação de vacas com mastite crônica, bom conforto e higiene na área de permanência dos animais, concluindo que o programa mostrou-se bastante efetivo para controle da enfermidade.

O benefício econômico da aplicação dessas práticas de controle e prevenção e a consequente redução da ocorrência de casos de mastite tem sido amplamente discutido na literatura (NATZKE, 1981; GIL et al., 1990; RADOSTITS et al., 1994).

No trabalho clássico realizado por Gil et al. (1990), analisando dados de 719 propriedades leiteiras no Canadá, estabeleceram a associação de 17 variáveis de manejo com reduzida contagem de células somáticas (CCS) no rebanho. Entre esses, destacam-se a imersão de tetos pós-ordenha, lavagem do úbere com papel toalha individual ou com papel jornal, tratamento de vaca seca em animais selecionados por risco, visita de veterinário ou especialista em saúde do úbere, maior tempo como produtor de leite e mais alto grau educacional, entre outros. Por outro lado, foram fatores associados à alta CCS tratamento de vacas durante a lactação, maior número de trabalhadores na ordenha, número de lactação, maior número de vacas em ordenha e uso de iodo para imersão de tetos pré-ordenha.

Souza et al. (2005) estudaram 175 rebanhos no estados de Minas Gerais e encontraram os fatores associados a alta contagem de célula somática naqueles rebanhos foram imersão de tetos pós-ordenha, alimentação das vacas durante a ordenha e não adoção da linha de ordenha. Outras variáveis como método de ordenha (balde-ao-pé, mecânica canalizada ou manual), local de ordenha, idade dos rebanhos ou avaliação dos primeiros jatos de leite não foram associadas a alta CCS.

Os produtos químicos-sintéticos mais utilizados no Brasil para desinfecção de tetos e teteiras são os compostos halogenados (cloro e iodo), clorhexidina, aldeídos e compostos de amônia quaternária (LADEIRA, 1998). Kruze (1998) recomenda o uso de

hipoclorito de sódio (0,1 a 4,0% de cloro disponível), iodofor (0,1 a 1% de iodo disponível) e gluconato de clorexidina (0,1 – 0,55%).

A eficácia desses produtos tem sido demonstrada experimentalmente. Oura et al. (2002) comprovaram a eficácia de dois produtos comerciais contendo clorito de sódio acidificado, embora o escore de lesão de teto tenha sido superior que o controle para os dois produtos. Oliver et al. (2001) encontraram redução na ocorrência de novas mastites, com aplicação de compostos fenólicos comerciais na imersão de tetos pré-ordenha, realizando a imersão por, no mínimo, 30 segundos. Nickerson et al. (1990) demonstraram a eficácia de iodofor a 0,18% utilizado para imersão de tetos pós-ordenha, prevenindo 90% das novas infecções por *S. aureus*.

Amaral et al. (2004) avaliaram a eficácia da desinfecção de teteiras utilizando duas fontes de cloro (hipoclorito de sódio e clorina). Concluíram que a utilização de cloro a 150 ppm não foi eficiente na desinfecção das teteiras, inclusive com a contagem de coliformes e *Staphylococcus spp.* tendo aumentado após a desinfecção, nas condições práticas de manejo, estabelecidas no estudo. Nesse mesmo trabalho, os autores demonstraram redução da contagem de células nos tetos utilizando esses desinfetantes.

Pedrini e Margatho (2003) avaliaram os princípios ativos mais utilizados para desinfecção de tetos frente a bactérias causadoras de mastite e encontraram uma baixa eficácia do iodo à 0,5%, do hipoclorito de sódio à 0,5% e do cloreto de benzalconio à 1%, obtendo bons resultados apenas com a clorexidina à 0,5%. Ressaltam que apesar de resultados melhores obtidos com concentrações mais elevadas de iodo e de hipoclorito de sódio, estas não são indicadas porque resultam em resíduos detectáveis no leite, especialmente o iodo, e causam irritação na pele dos tetos, podendo servir de porta de entrada para microrganismos causadores de mastite. Burmeister et al. (1998) demonstraram a perda da saúde da pele do teto. Entre os produtos testados pelos autores, aquele que continha iodo a 1% foi o que resultou em maior comprometimento tecidual.

Em uma série de trabalhos, Wiest e seu grupo de pesquisa avaliaram diferentes desinfetantes comerciais quanto à sua atividade antibacteriana e os fatores que interferem na eficácia desses produtos, inclusive frente a agentes causadores de mastite. Encontraram uma ampla variação na atividade desses produtos, em grande parte das vezes com atividade antibacteriana em concentração acima da concentração considerada

segura para uso. Além disso, caracterizam a interferência de fatores como matéria orgânica, suporte, pH e tempo na atividade bactericida e/ou bacteriostática dos desinfetantes (WIEST et al., 1982/83; WIEST, 1984; SCHMIDT & WIEST, 1989; WIEST & SCHMIDT, 1989).

A clorexidina é recomendada como desinfetante de tetos na concentração de 0,1 – 0,55%. Boddie et al. (1990) testaram gluconato de clorexidina com bons resultados tanto “in vitro” como “in vivo”. Boddie et al. (1997) avaliaram a eficácia de dois desinfetantes, um a base de clorexidina (0,5%) e o outro a base de iodo (1,0%) encontrando uma redução de 70-75% de novas infecções devido a *S. aureus* e 55% devido a *S. agalactiae*. Oliver et al. (1990) reduziram novas infecções intra-mamárias utilizando digluconato de clorexidina a 0,5%, inclusive aquelas causadas por *S. uberis*. Justificam essa eficácia contra patógenos ambientais porque a clorexidina pode permanecer com atividade germicida sobre a pele do teto pelo menos 8 horas após a aplicação (SCHMIDT et al., 1985).

Os cuidados com a presença de resíduos de produtos químicos no leite em se intensificado na última década.. Porém, maior atenção tem sido dada a presença de resíduos de antibiótico no leite. Como demonstrou Fagundes (2003) que concluiu que o tratamento da vaca seca, mesmo respeitado o período de carência propostos pelos fabricantes, 19% das amostras de leite colhidas no início da lactação seguinte apresentavam resíduos de antibióticos.

Nascimento et al. (2001) encontraram 50% das amostras de leite obtidas com comércio na região de Piracicaba, SP, apresentaram resíduos de antibióticos. Barros et al. (2001) encontraram 38,7% de amostras de leite tipo C contaminados com substâncias inibidoras de crescimento bacteriano.

Muitas vezes o uso de antibióticos durante a lactação é realizado de forma desnecessária como pode demonstrar Wilson et al. (1999) que aplicaram métodos epidemiológicos para revisar os registros de tratamento de mastite sub-clínica com antibióticos nos Estados da Pensilvania e Nova Iorque, EUA. Encontraram que não houve diferença estatística entre tratamento ou não tratamento para quase todos os microrganismos, com exceção de *S. agalactiae*, onde alguns princípios ativos mostraram-se mais eficazes que não tratar, com RR médio de 2,9 (IC= 1,9-4,3). Perspectiva com que concordam Nickerson et al. (1999) justificando que existe pobre penetração do antibiótico em locais de fibrose, abscesso e inflamação, há inativação de

antibióticos no leite e a baixa acessibilidade dos microrganismos ao antibiótico como é o caso de *S. aureus* no interior de fagócitos.

Alguns autores investigaram a presença de resíduos de desinfetantes utilizados na rotina da ordenha no leite. Rasmussen et al. (1991) identificaram aumento do teor de iodo em amostras de leite onde um desinfetante a base de iodo era utilizado na rotina para imersão pré e/ou pós-ordenha de tetos. Os autores discutem que o tempo de utilização do produto interfere no teor de iodo no leite. Ingawa et al. (1992) encontraram pequeno aumento no conteúdo de iodo no leite em animais submetidos a imersão de tetos pré-ordenha com iodo à 0,1% e um sanitizante gel preparado pelos autores, porém consideraram o teor de iodo no leite como normal.

Não somente o uso local, mas a administração via oral de iodo orgânico ou inorgânico reflete-se em aumento da concentração de iodo no leite (SWANSON et al., 1990).

O mercado orgânico é um dos que mais cresce, especialmente, nos países industrializados e mais conscientizados. Entre os anos de 1997 a 2000 ele cresceu 87% atingindo os 86 milhões de dólares estados unidense. Pouco mais da metade da superfície cultivada dentro dos princípios ecológicos se encontra na Oceania (RIVERA & BRUGAROLAS, 2003).

Cabe ressaltar a existência de vários modelos de produção orgânica. Desde aqueles de base ecológica tradicional até alguns tipos de agricultura alternativa que já são subordinadas a regras de certificadores internacionais ou, mesmo, usando insumos orgânicos importados. Há diferenças fundamentais entre as bases teóricas que sustentam essas correntes (CAPORAL & COSTABEBER, 2004).

As práticas “limpas” para atenção a saúde do gado leiteiro criado dentro desses sistemas, ainda são carentes de métodos seguros e eficazes. A norma de certificação da Associação de Agricultura Orgânica é omissa quanto ao uso de antissépticos na rotina do gado de leite e refere-se aos desinfetantes da seguinte forma - “desinfetantes aceitos para uso na limpeza e desinfecção das instalações e materiais, são permitidos detergentes biodegradáveis, sabão, sais minerais solúveis, permanganato de potássio, hipoclorito de sódio, cal, soda cáustica, ácidos minerais simples (nitríco e fosfórico), oxidantes minerais em enxágües múltiplos, água fervente, vapor, creolina e vassoura de fogo” (Associação da Agricultura Orgânico, 2004).

O Instituto Biodinâmico aplica praticamente a mesma listagem de desinfetantes e acrescenta a seguinte informação entre os produtos de uso veterinário permitido:

“Antibióticos - Nenhum. Como tratamentos auxiliares em desordens dos dutos mamários podem ser usadas plantas com ação anti-séptica: Uva ursina (*Arctostaphylos uva-ursi*), Cavalinha (*Equisetum arvense*), Rosa canina, Hipérico (*Hipericum perforatum*), além de mel, própolis e extrato de calêndula para uso como antibiótico” (Instituto Biodinâmico, 2004).

Campos (2004) estudou amostras de leite obtidas de produção orgânica e comparou com amostras de leite produzida de forma convencional numa região de São Paulo. A autora pode concluir que as amostras de leite oriundas de produção orgânica apresentavam menor contaminação com quimioterápicos beta-lactâmicos, negativo nas amostras de produção orgânica e com 6,67% de positividade naqueles produzidos convencionalmente, resíduos de organofosforados foram semelhantes para os dois tipos de produção, e acidez abaixo dos padrões legais no leite oriundo de propriedades orgânicas, devido a alta contagem de células somáticas que eleva o pH., o que evidencia a necessidade de melhor controle de mastite neste tipo de produção.

Algumas alternativas para controle e tratamento de mastite bovina adaptadas a estes sistemas de produção tem sido avaliadas, tanto preventivas como curativas. Berry & Hillerton (2002) avaliaram o uso de um selante inerte, composto por subnitrito de bismuto e parafina, para o canal do teto durante o período de vaca seca e encontraram uma redução significativa de novas infecções intra-mamária, em unidades de produção orgânica. A estimulação da resposta imunológica no interior do úbere tem sido explorada como alternativa para prevenção de mastite. Zecconi et al. (1999) avaliaram um imunomodulador produzido a partir de culturas virais de *Parapox ovis* no tratamento da mastite e encontraram redução nas novas infecções intra-mamária, com razão de risco de 0,47.

Almeida et al., (2005) obtiveram 100% de cura utilizando o método das ordenhas múltiplas para tratamento de mastite clínica experimental causada por *S. aureus*, estatisticamente superior ao controle utilizando antibiótico comercial.

As plantas medicinais em mastite bovina aparecem, na maior parte das vezes como curativas. Hu & Du (1997) utilizaram um produto originado da reação de bisulfito de sódio e “houttuynin” que é obtido de *Houttuynia cordata* e obtiveram boas taxas de recuperação de casos clínicos.

Abaineh & Sintayehu (2001) utilizaram *Persicaria senegalense* para tratamento de mastite sub-clínica, selecionada a partir de um trabalho de resgate etnográfico no sul

da Etiópia. A planta era utilizada por agricultores para tratamento de mastite e pelas mulheres para higiene pós-parto. Os autores testaram diferentes extratos da planta “in vitro” frente aos microrganismos isolados de mastite sub-clínica e alcançaram inibição das bactérias *S. aureus*, *Corynebacterium bovis* e *Pseudomonas aeruginosa* (mastite clínica) e de *C. albicans* pelos extratos solvidos por éter de petróleo, acetona e metanol, obtendo resultados negativos quando extrato etanólico foi utilizado. Para tratamento dos animais, planta cozida e planta seca em pó foram utilizadas via oral em dois experimentos separados, nas quantidades de 1,5 kg e 0,77 kg, respectivamente. Controles foram utilizados constituídos de um grupo de animais não tratados e outro tratado com antibiótico. O tratamento com planta seca em pó foi considerado efetivo, obtendo-se taxa de cura microbiológica de 92,8% significativamente superior ao grupo controle não tratado (40%) e estatisticamente comparável ao grupo tratado com antibiótico (80%). Também, a redução no escore do CMT foi semelhante ao grupo tratado com antibiótico.

Hu et al., (1995) realizaram testes “in vitro” com extratos de ginseng (*Panax ginseng*) sobre a atividade de polimorfonucleares obtidos do leite de vacas e demonstraram a capacidade de amplificar a resposta oxidativa destas células sob efeito do ginseng. Hu et al. (2001; 2003) utilizaram extrato de ginseng via sub-cutânea em vacas com mastite sub-clínica e como adjuvante de vacina para *S. aureus* e obtiveram taxa de proteção superior e um aumento da atividade das células de defesa desses animais em comparação com os controles.

Mukherjee et al. (2005) avaliaram o potencial imunoterapêutico de *Ocimum sanctum* para a recuperação de animais com mastite sub-clínica. O tratamento foi realizado através de infusão intra-mamária de extrato aquoso obtido das folhas da planta. Esse tratamento foi capaz de reduzir a contagem bacteriana total e aumentar a contagem de linfócitos e neutrófilos com aumento da capacidade fagocítica destas células, assim como aumentou a quantidade de enzimas lisossomais no leite.

Ampliando a pesquisa ao uso de própolis em mastite encontram-se outros trabalhos. Meresta et al. (1985) e Meresta & Meresta (1989) na Polônia testaram “in vitro” e “in vivo” o extrato de própolis encontrando boa efetividade contra bactérias Gram positivas e uma taxa de recuperação alta de casos de mastite clínica causada por *Candida*, *Staphylococcus sp*, *E. coli* ou *Streptococcus sp*. No Brasil, testes “in vitro” frente a bactérias isoladas de casos de mastite bovina mostraram atividade

antibacteriana de extratos etanólicos de própolis para bactérias Gram positivas (PINTO et al., 2001).

Fox et al., (2006) testaram duas formulações para imersão dos tetos pós-ordenha, contendo iodo (1 e 0,5 %) e um complexo condicionante com propileno glicol, polivinilpirridona, glicerina, lanolina, alantoína e aloe. Concluíram que ambas formulações foram efetivas no controle de novas infecções intra-mamárias e não foram agressivas a pele do teto.

Com objetivo de avaliar o uso de plantas para imersão dos tetos pós-ordenha foi desenvolvido trabalho piloto de pesquisa por Farias et al. (2003) em uma propriedade leiteira buscando a produção orgânica de leite bovino. Foi observado e o desempenho produtivo e as condições de saúde dos animais por um período de dois anos. No primeiro ano, foi utilizado manejo convencional e, no segundo, introduziu-se o uso do extrato cru obtido por decocto de plantas como desinfetante e extrato alcoólico de própolis para o tratamento de casos de mastite. Através de acompanhamento através do “Califórnia Mastitis Test (CMT)” semanal e teste da caneca de fundo escuro diário, foi possível observar uma redução da prevalência de mastite sub-clínica de 13,37% dos quartos/semana no primeiro ano para 7,43% no segundo ano. Da mesma forma, houve redução na incidência de casos de mastite clínica (10,26 casos novos por mil quartos em risco no primeiro ano para 2,40 no segundo) e a duração do curso clínico destes casos (média de 17,08 dias no primeiro ano e de 10,78 dias no segundo). Foi concluído que adequando e aprimorando as práticas higiênico-sanitárias do rebanho, é possível produzir leite com qualidade e baixa ocorrência de mastite sem uso de antibióticos, substituindo os desinfetantes químicos comerciais por extratos cru de plantas e utilizando tratamentos naturais (própolis) para casos clínicos. Nesse trabalho, foram utilizados extratos de plantas medicinais nativas e introduzidas, com indicativo etnográfico por agricultores familiares em assentamentos da reforma agrária no sul do RS, em rodízio e dependendo da disponibilidade, decocto de *Eucalyptus sp.* (eucalipto), *Baccharis trimera* (carqueja), *Tagetes minuta* (chinchilo), *Casearia sylvestris* (guaçatonga), *Bidens pilosa* (picão preto) e *Polygonum sp.* (erva-de-bicho).

2.7 Dermatofitose

A dermatofitose é uma enfermidade infecto-contagiosa causada por um grupo de fungos denominado dermatófitos, que parasitam a queratina dos pêlos, peles, unhas, cascos e penas (JUNGERMAN & SCHWARTZMAN, 1972; LACAZ et al., 1998).

Os fungos dermatófitos pertencem a um grupo de agentes que estão interrelacionados pela similaridade morfológica, fisiológica e de patogenicidade. Estes fungos apresentam características em comum como serem filamentosos, se reproduzem de forma assexuada através dos macro e microconídeos, não são sensíveis a ciclohexemida, normalmente não invadem os tecidos vivos, não sobrevivem em áreas com processo inflamatório intenso e são altamente queratinolíticos, e distribuídos nos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. O gênero *Microsporum* se divide nas espécies *canis*, *gallinae*, *nanum* e *gypseum*. O *Trichophyton* está dividido nas espécies *mentagrophytes*, *verrucosum*, *equinum* e *rubrum*. Esses dois gêneros de dermatófitos são considerados de maior importância para a medicina veterinária por conter espécies consideradas patogênicas para os animais domésticos (FERREIRO et al., 1983; ALMEIDA & BIANCHI, 1997; CABANES et al, 1997; DIECKMANN et al., 1998).

As dermatofitoses são enfermidades de distribuição mundial, sendo comum em regiões de clima tropical e temperado, particularmente em áreas quentes e úmidas, embora os surtos em bovinos e eqüinos, na sua maioria, sejam observados nos meses de outono e inverno. Afeta bovinos, eqüinos, cães, gatos, suínos, aves, ovinos, humanos e animais silvestres, sendo os animais jovens mais suscetíveis que os adultos (JUNGERMAN & SCHWARTZMAN, 1972; LACAZ et al., 1998).

Um grande número de infecções humanas se originam no contato com um animal portador sintomático ou assintomático de um fungo dermatófito. Dentre as espécies de fungos dermatófitos, o *M. canis* é o principal responsável pelos casos zoonóticos, pelo fato, deste, ter como reservatórios o cão e o gato. Cerca de 30% de todos os casos de microsporose e cerca de 15% de todos os casos de dermatofitose (tinha) em humanos são causados pelo *M. canis*, sendo a maioria dessas infecções adquiridas dos gatos. Aproximadamente 50% de humanos expostos a gatos infectados, sintomáticos ou assintomáticos, adquirem a infecção. O crescente número de casos de microsporose humana pode estar relacionada à presença do agente no reservatório animal, já que na ausência do reservatório, o *M. canis* não se espalha de forma tão

intensa entre os homens (GAMBALE et al., 1993; LARSSON et al., 1994; LOPES et al., 1994; NOBRE et al., 1999).

Os sinais clínicos da dermatofitose são intensamente variáveis e dependem da interação hospedeiro-fungo e, portanto, do grau da inflamação. Os sinais observados, refletem a patogenia do agente. A alopecia, descrita, ocorre devido a invasão do folículo piloso e enfraquecimento da haste do pêlo. Pêlos quebrados e variável grau de perda dos mesmos ou ainda a presença de pápulas, pústulas e, ocasionalmente, furúnculos é consequência direta da resposta imune contra os dermatófitos. Em bovinos as lesões atingem, principalmente, a cabeça e o pescoço, podendo disseminarem-se para o tronco, membros e cauda. Em animais gravemente afetados observa-se emagrecimento e formação de crostas disseminadas por todo o corpo, que ao serem removidas deixam áreas úmidas e hemorrágicas. Em eqüinos as lesões iniciais são pequenas e normalmente observadas em áreas de abrasão, principalmente no lombo, garupa e cabeça. Como se trata, primariamente, de uma doença folicular, a invasão dos folículos pilosos suscetíveis resulta no enfraquecimento da haste, que se traduz, clinicamente por áreas de pêlos quebrados e graus variáveis de alopecia. (LARSSON et al., 1994; MULLONEY & FADOK, 1984; RADOSTITS et al., 1994; CABANES et al., 1997; CABANES, 2000).

As medidas de controle utilizadas nas dermatofitoses visam principalmente interferir na cadeia de transmissibilidade da enfermidade, podendo ser utilizados medidas higiênico-sanitárias e medidas quimioterápicas porém controlar as dermatofitoses é particularmente difícil devido a existência de animais clinicamente normais, mas que carregam em seu pêlo o fungo (RYCROFT & McLAY, 1991, ROMANO, et al. 1997; SILVEIRA et al., 1999).

A prospecção de práticas profiláticas ou curativas na cultura tradicional para essas enfermidades adquire importância devido ao aspecto zoonótico da enfermidade, da reduzida disponibilidade de drogas antifúngicas eficazes e que, em geral, são caras e com dose tóxica muito próxima a dose terapêutica (DEL PALACIO et al., 2002; EICHENBERG, 2003).

2.8 As plantas Selecionadas

2.8.1 *Eucalyptus spp* Labill. (Myrtaceae)

O eucalipto é originária da Austrália e Tasmânia. Existem mais de 400 espécies de *Eucalyptus spp*. São utilizados na produção de bosques para comércio (celulose, madeira e lenha), e como sombra e corta vento no campo. Também, é o mais utilizado como medicinal (DEL VITTO et al., 1998; LORENZI & MATOS, 2002).

São árvores de grande porte, alcançado até 60 metros de altura. Possui folhas coriáceas opostas, com dois tipos morfológicos diferentes, as dos ramos jovens são azuladas, largas e peltadas, enquanto que as dos ramos maduros são estreitas, lanceoladas ou em forma de foice. Apresenta flores e botões florais solitários na axila das folhas. Os frutos são operculados, medindo até 1,5 cm de comprimento (LORENZI, 2000).

É utilizado na medicina popular como anti-catarral. As folhas maduras são secas e utilizadas como chá para nebulização no tratamento de gripe, congestão nasal e sinusite (LORENZI & MATOS, 2002). Utilizado como fumegação para tratamento de garrotilho nos eqüinos. O chá das folhas e casca é considerado antisséptico pulmonar, intestinal, anti-asmático, hemostático, febrífugo e anti-catarral (ALBUQUERQUE, 1989; DEL VITTO et al., 1998). Franco & Fontana (2004) registraram a indicação popular para fricção ou compressa em nevralgias de origem reumática, ciática, nas articulações ou nas costas. Além dessas, Balbachas (1963) ressalta que o eucalipto é um bom antisséptico. Aplica-se exteriormente para lavar feridas e úlceras. Utilizado no tratamento de malária na Venezuela (CARABALLO et al., 2004).

A atividade antimicrobiana tem sido demonstrada para várias espécies de Eucalipto. Kumar et al. (1988) avaliou a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de vinte e quatro espécies de eucaliptos e encontraram diferenças na atividade entre essas espécies. Pattnaik et al. (1996) demonstraram a ação antimicrobiana do óleo essencial do eucalipto sobre vinte e duas espécies bacterianas e onze de doze fungos testados. Takahashi et al. (2004) demonstraram a atividade antimicrobiana de extrato metanólico de várias espécies de Eucalipto, sendo os mais eficazes *E. globulus*, *E. maculata* e *E. botyroides*. Atuaram contra Gram positivos, *Pseudomonas putida* e *Tricophyton mentagrophytes*, mas nenhum dos extratos atuou sobre *E. coli*. Takarada et al. (2004) testaram óleo de eucalipto entre outros sobre bactérias periodontopáticas obtendo atividade bactericida do óleo a 0,2% em 30 segundos, inibiu a adesão de *Streptococcus*

mutans, além de, a essa concentração, ser pouco tóxico em cultura de células da veia endotelial.

Óleo de eucalipto tem sido formulado para uso medicinal, com eficácia em aplicação tópica em casos de infecção por *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, (SHERRY et al. 2001).

Vários monoterpenos (1,8-cineol, α , β e γ terpineno, 4 terpineol e outros) e taninos têm sido identificados e colaboram para a atividade antibacteriana do eucalipto (NISHIMURA & CALVIN, 1979; HOU et al., 2000). Chagas et al. (2002) encontraram o citronelal (94%) como principal componente do óleo essencial de *E. citriodora*, 1,8 cineol (85,84%) e alfa-pineno (8,8%) em *E. globulus* e um número maior de constituintes, principalmente, Z-citral (11,36%), E citral (14,99%) e o acetato de geranila (7,66%) em *E. staigeriana*.

A atividade anticarrapaticida de óleos essenciais de três espécies de Eucalipto, *E. citriodora*, *E. globulus* e *E. staigeriana* foi estudada por Chagas et al. (2002). As três espécies foram capazes de matar 100% das teleógenas de *Boophilus microplus* expostas nas concentrações de 17%, 15% e 12,5%, respectivamente.

Diversas reações adversas são atribuídas ao uso ou contato com óleos de *Eucalyptus*, seus extratos e material da planta fresco ou processado. Os compostos presentes na planta que podem ser tóxicos são: 1,8-cineol, glicosídeos cianogênicos, rutina e taninos. A maioria dos estudos sobre reações adversas foi realizada em roedores. Baseado nesses estudos, a dose letal 50% (DL 50) via oral do óleo essencial de eucalipto foi avaliada em 4.44g/kg de peso corporal para ratos e 3.32g/kg para camundongos. O DL50 é mais baixo quando estudado o 1,8-cineol isoladamente - 2.48g/kg para ratos. A DL50 dérmica para coelhos é maior que 5g/kg. O óleo de eucalipto não parece teratogênico nem capaz de ser eliminado pelo leite (PAGES et al., 1990; WHITMAN et al., 1994; CHALCHAT et al., 1995, 1997; MIZRAHI et al., 1997)

Alguns relatos de caso humanos de intoxicação já foram publicados. Dentre esses casos, predominam as intoxicações por vaporização, reações alérgicas ao pólen e ingestão de grandes quantidades de óleo essencial por crianças. Informação em animais não são disponíveis (DAY et al., 1997; DARBENE et al., 1998; BORAL et al., 2004).

A ocorrência de reações alérgicas a óleos essenciais utilizados em cosméticos tem sido descrita em estudos humanos. Como exemplo, pode-se citar aquelas descritas por Schaller e Korting (1995) causada por óleos de cânfora e misturas de lavanda e jasmim. No entanto, óleo de eucalipto é utilizado como ingrediente de

produtos para tratamento de pele e cosméticos. Wilmms et al. (2005) avaliaram em um trabalho clínico a suscetibilidade da pele humana a preparações de cremes contendo óleo de eucalipto e não encontraram nenhuma reação adversa.

O Conselho Europeu aprovou o uso do óleo de eucalipto como aditivo alimentar humano em dose de 15 ppm. Na França, infusão de folhas de *Eucalyptus globulus* é registrado para tratamento de doença bronquiolar benigna, sem estudos toxicológicos (Anônimo, 2001).

2.8.2 *Baccharis trimera* (Less.) DC.; Compositae - Asteracea

Syn. *B. genisteloides* var. *trimera* (Less.) Baker

O gênero *Baccharis* apresenta aproximadamente 500 espécies de plantas, divididas em 28 grupos por suas similaridades morfológicas. O grupo *trimera* apresenta quatro espécies de difícil diferenciação – *B. articulata* (Lam) Persoon, *B. cylindrica* (Less) DC, *B. gaudichaudiana* DC e *B. trimera* (Less) DC. É um subarbusto perene, da família Compositae ou Asteraceae, ereto, dióico, com cerca de 50 cm de altura, muito ramoso na base, nativa do sul e sudeste do Brasil, principalmente dos campos de altitude. As folhas são dispostas ao longo de caules e ramos como expansões aladas onde ocorre a fotossíntese, bi-alada em *B. articulata* e tri-aladas na outras três espécies. Apresenta inflorescências do tipo capítulo, unisexuais, dispostas ao longo dos ramos, de cor esbranquiçada. Essa planta é conhecida popularmente como carqueja, carqueja-domato, bacárida, cacália, condamina, quina-de-condamine, tiririca-de-babado, carqueja-amargosa, carqueja-amarga, bacanta, bacorida, carque, cacalia-amarga, vassoura (CORDAZO & SEELIGER, 1988; LORENZI, 2000. LORENZI & MATOS, 2002; BUDEL et al., 2003).

B. trimera é abundante na região sul do Brasil, Uruguai e Argentina onde é amplamente utilizada na medicina tradicional. O primeiro relato escrito é de 1931, onde Correa (apud LORENZI & MATOS, 2002) descreve o uso de ramos e folhas para o tratamento de esterilidade feminina e de impotência masculina. É utilizada para tratamento de problemas digestivos, hepáticos e como vermífugo na forma de infusão.

Balbachas (1963) traz várias indicações. Chás para anemia, cálculos biliares, diarreias, enfermidades da bexiga, do fígado, dos rins, má digestão, má circulação.

Devido ao seu efeito “dissolvente” é diurético e depurativo, pode ser utilizado, também, para gota, reumatismo, feridas, chagas venéreas e em casos de lepra. Nesses casos, indica usar junto com o chá abluções com uma decocção forte sobre as partes lesionadas.

Rodrigues & Carvalho (2001) relatam seu uso na forma de infusão como antifebril, anti-reumática, cálculos biliares, colagoga, para tratamento de diabete, estomática, para obesidade, anti-helmíntica e nas doenças do couro cabeludo como decocto. Externamente, é utilizado para banhar feridas, varizes e ulcerações, auxiliar na “desintoxicação” do organismo (FRANCO & FONTANA, 2004). Medeiros et al. (2004) relata seu uso para dor de estômago e gripe em uma comunidade no Rio de Janeiro. Dickel et al. (2006) relata o uso por herbalistas de Porto Alegre da planta com o objetivo de perda de peso.

Entre os Kaiowá e Guaranis de uma reserva no Mato Grosso do Sul, a carqueja é conhecida com Kakareka-á e utilizada para cólica e anemia (BUENO et al., 2005).

Diversas espécies de *Baccharis* são presentes na América do Sul, algumas utilizadas em medicina tradicional outras descritas como tóxicas (FERESIN et al., 2003). Efeitos antibimicrobianos já foram demonstrados de *B. trimera*, *B. pedunculata* (ROHALISON et al., 1995), *B. grisebachii* (FERESIN et al., 2003) e *B. notoserigila* (COBOS et al., 2001).

Atividade antibacteriana, antiinflamatória e analgésica desta planta já foram descritas (GENE et al., 1996; AVANCINI et al., 2000). Avancini et al. (2000) demonstraram ação bactericida ou bacteriostática de *B. trimera* frente a *S. aureus*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* e *Salmonella gallinarum*.

Com relação à toxicidade da carqueja, devido a presença na sua composição de substâncias hipotensivas, hipoglicemiantes e estimulantes da contração dos músculos lisos, o seu uso via oral apresenta-se contra-indicado para pessoas com pressão arterial baixa e mulheres grávidas, assim como é indicado o acompanhamento médico em usuários diabéticos insulino-dependentes. Em um estudo buscando extratos de plantas efetivos contra *Leishmania*, Luize et al. (2005) avaliaram a atividade hemolítica destes extratos frente a eritrócitos de ovinos e encontraram efeito hemolítico do extrato cru acetônico de *B. trimera*. Não foram encontradas referências quanto a DL50, estudos ou relatos clínicos de intoxicação via oral, nem quanto ao seu uso tópico.

2.8.3 *Tagetes minuta* L.; Compositae - Asteracea

Tagetes minuta L. é uma espécie da família Compositae, originária do México e introduzida há muito tempo no Brasil. É conhecida por vários nomes populares – chinchilo, picão-do reino, cravo-de-defunto, vara-de-rojão, estrondo, rabo-de-rojão, cravo-de-urubu, coorá, coari, coari-bravo, cravo-bravo, erva-fedorenta alfinite-de-mato, rosa-de-lobo. e, na Argentina e Uruguai, por suico ou chinchilla (TERESCHUK et al., 1997; SCARPA, 2003; LORENZI & MATOS, 2002).

É um sub-arbusto anual, ereto, pouco ramificado, de 1-2 metros de altura, nativa de áreas abertas e sob distúrbio da América do Sul. As folhas são compostas com 3-9 folíolos glandulosos. As flores são pequenos capítulos amarelos, reunidas em panículas axilares e terminais. Considerada planta daninha de lavouras, porém suas raízes destroem alguns nematóides prejudiciais a algumas culturas (LORENZI, 2000).

A sua parte aérea é empregada como aromática, excitante e diurética, sendo utilizada para reumatismo, dispepsia, vermífugo e para estimular fluxo menstrual. Flores e folhas são uns dos chás mais utilizados pelos povos indígenas para bronquites, tosse, resfriado e catarro, para limpar o pulmão após parar de fumar (FRANCO & FONTANA, 2004; LORENZI & MATOS 2002). Scarpa (2003) descreve seu uso como vermífugo e para as dores estomacais, enquanto Fuck et al. (2005) descreveram a utilização da planta como depurativo do sangue, vermífugo e para ferida brava.

O uso do cravo-de-defunto (*T. erecta*), é indicado contra a angina, sudorífico, anti-espasmódico, béquico, anti-reumático e para cólicas uterinas (ALBUQUERQUE, 1989).

A ação antimicrobiana foi primeiro demonstrado por Tereschuk et al. (1997), identificando um flavonóide como principal componente ativo (quercetagin-7-arabynosil-galactoside). Souza et al. (2000) encontraram potente ação do decocto da planta contra *E. coli*, *S. gallinarum*, *S. aureus* e *E. faecium*.

Bii et al. (2000) encontraram que o óleo essencial do *T. minuta* foi mais efetivo frente a fungos filamentosos do que para levedura, embora tenha atuado sobre ambos.

Algumas evidências para efeito fototóxico e sensibilizante de pele tem sido encontrado para constituintes do gênero *Tagetes*. Hausen e Helmke (1995)

demonstraram que 5-(3-buteno-1-inil)-2,2'-bitiofeno, alfa-tertienil e hidroxitremetona são capazes de sensibilizar a pele de cobaias.

2.8.4 *Bidens pilosa* L.; Compositae – Asteracea

B. pilosa é conhecida por vários nomes populares amor-seco, carrapicho, carrapicho-de-agulha, carrapicho-de-duas-pontasa, carrapicho-picão, coambi, cuambri, cuambu, erva-picão, fura-capá, guambu, macela-do-campo, picão, picão-amarelo, picão-das-horas, picão-do-campo, picão-preto, pico-pico, piolho-de-pare. É uma planta herbácea ereta, anual, ramificada, alcançando entre 50-130 cm de altura, nativa da América tropical. Possui folhas compostas pinadas, com folíolos de formato, tamanho e quantidade variáveis. As flores são pequenas, reunidas em capítulos terminais. Os frutos são aquênios alongados de cor preta com ganchos aderentes em uma das extremidades. Existem outras duas espécies do mesmo gênero com características e propriedades similares: *B. alba* e *B. subalternans* (LORENZI, 2002).

É considerada erva daninha em lavouras agrícolas. Os povos da Amazônia a utilizavam para angina, diabetes, disenteria, aftosa, hepatite, laringite, verminose e hidropsia. A sua infusão é empregada por indígenas como diurética, emenagoga, antidisentérica e para o tratamento da icterícia. Na medicina tradicional brasileira considerada diurética e emoliente, empregada para febres, blenorragia, leucorréia, diabetes, icterícia, problemas do fígado e infecções urinárias e venéreas (LORENZI & MATOS, 2002).

A utilização de infuso ou banho de suas folhas ou de toda a planta foi descrita como antifebril, para afecções da garganta, tosse, reumatismo articular, gonorréia, desobstrução do fígado, hepatite, icterícia e feridas (RODRIGUES & CARVALHO, 2001; FRANCO & FONTANA, 2004).

Albuquerque (1989) descreve o uso de chá de folhas e raízes da planta como diurético, sialagogo, anti-disentérico, anti-escorbútico, hepato-protetor, contra diabetes e hepatite. É utilizada em assentamento no Paraná para o “amarelão preto” (doenças hepáticas) (VISBISKI et al., 2003).

Autores têm referido à atividade antimicrobiana de *Bidens pilosa* (picão preto). A atividade antibacteriana é maior contra bactérias Gram positivas (MACHADO et al., 1988; RACE & VAN STADEN, 1997). Atividade antiviral, também foi demonstrada (CHIANG et al., 2003). Fenil-heptatrieno, ácido linólico e ácido linolênico estão

presentes nas folhas de *B. pilosa* e apresentam atividade antimicrobiana (GEISSBERGER & SEQUIN, 1991).

Rojas et al. (2006) demonstraram atividade antibacteriana de extratos etanólicos e decocto de *B. pilosa* utilizada na medicina tradicional da Colômbia.

O picão-preto está entre as plantas utilizadas na medicina tradicional para tratamento de malária, sendo demonstrado que o extrato hidroalcolólico das raízes da planta possui forte efeito inibidor do *Plasmodium falsiparum* ação essa dependente da presença de poliacetilenos e flavonóides da planta (OLIVEIRA et al., 2004)

Informações bibliográficas quanto à toxicidade de *B. pilosa* não foram encontradas.

2.8.5 *Polygonum punctatum* Elliot., Polygonaceae

Syn. *Persicaria punctata* (Elliot) Small, *P. acre* Kunth, *P. hidropipeoides* Pursh.

Como erva-de-bicho são conhecidas diferentes espécies de plantas do gênero *Polygonum* (*P. hydropiper*, *P. acuminatum*, *P. punctatum* Elliot syn. *Persicaria punctata*, *P. acre* e *P. hidropiperoides*) com características e propriedades semelhantes. Apresenta outros nomes populares como acataia, cataia, capiçoba, pimenta-do-brejo, capetiçoba, pimenta d'água, caichoba, persicária, curage (BALBACHAS, 1963; LORENZI & MATOS, 2002).

Em geral, são plantas herbáceas, anuais ou perenes, aquática, com ramos decumbentes e com nós salientes, pouco ramificadas, de 40-60 cm, nativa da Ásia e naturalizada no sul e sudeste do Brasil. As folhas são membranáceas, alternas, inteiras, alternas, geralmente com nervuras avermelhadas, de 4-8 cm de comprimento. As flores são pequenas, de coloração branca ou rosada, dispostas em partículas terminais longas, fruto lenticular ou trígono (CORDAZZO & SEELINGER, 1988; LORENZI, 2000).

A erva-bicho apresenta diversos usos populares no Brasil, no tratamento de hemorróidas e reumatismo, abortivo, diurético, adstringente, estimulante, diurética, vermícida, antigonorréica, sendo utilizada para tratamento tópico de úlceras na pele, erisipela e artrite (LORENZI & MATOS, 2002). Aplicada no caso de varizes, feridas, eczemas, disenteria, urina no sangue, febre persistente e para evitar gravidez (FRANCO & FONTANA, 2004). Utilizada contra “congestões cerebrais”, não só na forma de chá,

mas também de clisteres e em banhos para erisipela (BALBACHAS, 1963). Visbiski et al. (2003) relatam seu uso contra sarna.

A partir das partes aéreas de *P. punctatum* foi extraído um dialdeído sesquiterpeno chamado Poligodial, com alta atividade antibacteriana e antifúngica (ALVES et al., 2001). Diversos flavonóides com comprovada ação antibacteriana, têm sido isolados de espécies de *Polygonum* em diversas partes do mundo, ainda não demonstrados nas espécies da flora brasileira (DATTA et al., 2000; SMOLARZ, 2002).

Hedge et al. (2004) identificaram dois novos sacarídeos fenólicos de *P. cuspidatum*, planta nativa do Peru, que inibem a atividade da enzima DNA primase bacteriana, necessária para replicação do cromossomo bacteriano.

De *P. hidropiperoides* foram isolados flavonóides, sesquiterpenos e cumarinas e não foi observada nenhuma toxicidade nos extratos de *P. hidropiperoides*, nas doses de 250 mg/Kg a 600 mg/Kg (Lopes et al., 2002; Jacome et al., 2004). Rahman et al., (2005) confirmaram a baixa toxicidade do extrato dessa planta, indicando a DL50 via oral mais baixa em 758,8mg/kg alcançada por extrato clorofórmico à 2%. Esses mesmos autores não encontraram alterações nos parâmetros sanguíneos após injeções via sub-cutânea do extrato em doses sub-letais durante seis semanas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Plantas

3.1.1 Metodologia de seleção das plantas

Para realização deste trabalho foram utilizadas plantas com indicativo etnográfico anti-séptico/desinfetante. A seleção das plantas foi realizada num projeto prévio realizado junto a Cooperativa de Produção Agropecuária Vista Alegre (COOPAVA), organizada a partir do assentamento da reforma agrária Conquista da Liberdade, Município de Piratini. O objetivo era avaliar bases de produção de leite que introduzisse métodos sustentáveis/renováveis de produção.

A proposta de trabalho foi gerada a partir de três reuniões com a direção do assentamento, tendo como resultado um projeto de pesquisa em parceria com a COOPAVA, tendo a Cooperativa participado com 30% dos recursos orçados como contrapartida.

A metodologia baseou-se na pesquisa-ação, onde na etapa inicial de execução do projeto (ano 1), desenvolveram-se atividades de interação com a comunidade, com três objetivos prioritários e que resultaram na definição da metodologia de trabalho para o ano 2. Foram eles:

- obtenção de parâmetros de produção para serem utilizados como testemunha no tempo;
- atividade de formação para aprofundamento da discussão sobre os significados da então chamada “produção ecológica de leite”;
- resgate de práticas veterinárias e médicas tradicionais na comunidade.

A atividade foi realizada com reuniões entre os componentes do “grupo do leite”, isto é, os trabalhadores que tinham como atividade prioritária no assentamento o manejo dos bovinos de leite, juntamente com um veterinário pesquisador, um estudante do curso de veterinária e, em algumas reuniões, o veterinário que prestava serviço para o assentamento. As reuniões eram agendadas de acordo com a escala de trabalho da Cooperativa, nunca ultrapassando 20 dias entre cada uma. O tema da reunião seguinte era decidido pelo grupo. A partir desta sistemática, identificaram-se algumas praticas

veterinárias tradicionais aplicadas no manejo dos animais de leite, a maioria delas buscadas na memória dos agricultores da sua juventude em sua terra de origem.

Vale destacar que as 50 famílias que compõem o assentamento Conquista da Liberdade chegaram a área em Piratini no mês fevereiro de 1992 (portanto, quando do início do trabalho, estavam assentadas há oito anos), oriundas das regiões do Alto Uruguai e Missões, região norte do Rio Grande do Sul, após passarem um período de dois anos e cinco meses em acampamentos. Todos eram agricultores ou filhos de agricultores, na sua maioria, descendentes de colonos italianos ou da mescla dos povos europeus, africanos e indígenas que deram origem a uma parcela importante da população do Estado do Rio Grande do Sul, os chamados “pelo duro”. Tornaram-se “sem terra” por força da expropriação da sua terra pelo crescimento do interesse econômico pelas terras onde nasceram e pela construção de barragens no Rio Uruguai (da Silva, 2005).

Participante do coletivo de saúde do assentamento e participante do grupo do leite, a D. Teresa apresentou bastante conhecimento sobre plantas medicinais e preparação de “remédios”. Ela relatou a dificuldade de adaptar-se a disponibilidade de plantas medicinais da região do assentamento e que nunca pensou em utilizar em animais as formulações utilizadas na sua prática com as pessoas. Colaborou bastante na organização da farmácia fitoterápica, apresentando diversas fórmulas, especialmente, com relação a pomadas de uso externo, e na obtenção de plantas nativas. Uma estudante do curso de veterinária trabalhou mais intensamente junto às mulheres que participavam das reuniões, seguidamente, permanecendo uma ou duas noites com as famílias. Essa metodologia permitiu reduzir os problemas de relacionamento com o grupo, inclusive as questões ligadas ao gênero.

As indicações e escolha das plantas para o uso na desinfecção de tetos foram sempre originadas nas discussões coletivas, através do testemunho dos componentes do grupo de seus conhecimentos de plantas medicinais. Na grande maioria, não eram utilizadas na rotina dos informantes na prática veterinária, mas, uma associação criada pelo espaço de discussão com a prática humana ou informações recuperadas da sua memória de juventude, de práticas utilizadas por seus pais e avôs ou da sua comunidade de origem.

Associado a isto, a avaliação da biodisponibilidade natural ou cultivada das plantas medicinais levou a escolha definitiva daquelas a serem utilizadas. Na rotina de

anti-sepsia durante a ordenha, eram utilizadas de 1 a 1,5 kg de planta seca/dia. Por este motivo, o decocto de *Eucalyptus* foi introduzido no decorrer do projeto.

Ao final, resultou na identificação de cinco plantas – *Baccharis grupo trimera* (Herbário Pel 24658), *Bidens pilosa* (Herbário Pel 24657), *Eucalyptus spp.* (Herbário Pel 24661), *Polygonum punctatum* (Herbário Pel 24660) e *Tagetes minuta* (Herbário Pel 24659) – utilizadas, agora, nesta Tese. No ecossistema modificado que compõe a área da Cooperativa, essas plantas foram classificadas de acordo com escala ACFOR como abundante, comum, abundante, freqüente e comum, respectivamente (KENTE & COKER, *apud* CARVALHO et al., 1997).

Termo de consentimento livre e esclarecido foi firmado com a Cooperativa de Agricultores – COOPAVA (APÊNDICE D) nos termos da MP N^o 2.186, de 23 de agosto de 2001 para estudo e divulgação dos conhecimentos recuperados.

3.1.2 Coleta, Secagem e Armazenamento

As amostras de plantas utilizadas foram obtidas a partir da reserva dos próprios agricultores. Dentro da metodologia utilizada por eles, as parte aéreas das plantas eram colhidas pela manhã no início do outono, durante a época de maior biodisponibilidade para aquelas sazonais. A secagem foi realizada ao ar, em varais à sombra, protegidos de insetos e chuva. O tempo de secagem, em média, foi de 15 dias. O local de coleta foi num raio de 1 Km, a partir da referência 4587E, 6070N, localizada no Município de Piratini, Rio Grande do Sul.

Após este período, as plantas eram armazenadas em bambonas plásticas de 100 litros, momento no qual retiramos uma amostra de aproximadamente 2 kg de planta seca para realização deste trabalho. Então, as plantas foram grosseiramente fraturadas e armazenadas em frascos de vidro, em ambiente escuro e fresco, até serem utilizadas. As amostras de plantas utilizadas neste estudo foram obtidas todas de uma só vez, utilizadas para todas as etapas do experimento, permanecendo no laboratório durante 1,5 anos, com atenção para a ocorrência de contaminação fúngica ou de insetos.

Exsicatas de cada uma das plantas foram produzidas segundo Ming (1995), sendo encaminhadas para identificação e conservação no herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, sob responsabilidade da Dra. Elen Garcia.

3.1.3 Produção dos Extratos

3.1.3.1 Decocto

Os decoctos utilizados neste trabalho foram produzidos com base na Farmacopéia Brasileira (1959) com pequenas modificações. Uma proporção de 1:10 (g/L) de planta seca foi adicionada a água destilada estéril e colocada à ferver por 10 minutos em fogo brando, em frasco Erlenmeyer estéril coberto com uma placa de Petry. Após este período, o fluido produzido foi recuperado com pipeta, mensurado, reconstituído ao volume inicial com água destilada estéril e filtrado em gaze com quatro dobras. Cada decocto (DEC) produzido foi submetido às avaliações realizadas neste trabalho no máximo até 24 horas após a sua produção.

3.1.3.2 Extrato Hidroalcoólico

Da mesma forma que o decocto, os extratos hidroalcoólicos foram produzidos com base na Farmacopéia Brasileira (1959). Uma proporção de 1:10 (g/mL) de planta foi submetido a extração com etanol obtido a partir de cereais, hidratado à densidade de 70⁰ GL. A mistura foi colocada em frasco âmbar e durante ao menos 15 dias, foi agitada 2 vezes por dia. Ao final deste período, foi filtrada em filtro de gaze quatro dobras, o volume original reconstituído com álcool de cereais a 70⁰GL e armazenada em frasco âmbar, em local fresco e protegido da incidência direta da luz solar até sua utilização.

Para realização dos testes de desinfecção, o solvente etanólico foi extraído utilizando evaporador rotativo a 40 rpm, com temperatura máxima para extração de 60⁰C e sob pressão negativa de 600mm/Hg, em tempo o suficiente para extrair um mínimo de 95% do volume de álcool esperado. Após essa extração, o volume original era repostado com água destilada estéril e a suspensão obtida era utilizada até no máximo 24 horas após a sua preparação. Este produto será referido neste trabalho como EHA.

3.2 Microrganismos

3.2.1 Bactérias

A bacterioteca utilizada para realização deste trabalho originou-se a partir da rotina de diagnóstico do Laboratório de Doenças Infecciosas, Departamento de

Veterinária Preventiva, da Faculdade de Veterinária – UFPel (LDI/DVP/FV/UFPel). Isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* foram multiplicados em placas de agar sangue (Agar Base¹ + 5-8% de sangue ovino) e identificados segundo Quinn et al. (1998). Foram acrescentadas cepas padrões de *S. aureus* (ATCC 12600) como controle e *P. aeruginosa* (ATCC 10145) como representante de bactérias Gram negativas relacionada a mastite.

Na Tabela 1 são apresentadas os isolados bacterianos utilizados, caracterizando-os por espécie/gênero, reação à coagulase (para amostras do gênero *Staphylococcus*) e perfil de sensibilidade a seis antibióticos testados. No total foram utilizadas 15 amostras de *Staphylococcus* isoladas de casos de mastite e uma cepa padrão, oito isolados de *Streptococcus spp* e uma cepa padrão de *Pseudomona aeruginosa*.

As amostras foram mantidas em sub-cultivos em Agar sangue, com no máximo 10 repiques realizados mensalmente, ou congeladas à -20⁰C em sangue ovino desfibrinado e glicerinado (10% glicerina), sendo recuperadas em Agar sangue quando necessário.

3.2.2 Fungos

Foram utilizados seis isolados de dermatófitos, pertencentes a três espécies de dermatófitos, sempre uma cepa padrão e um isolado de campo - *Microsporum canis* (ATCC 32903), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533) e *Microsporum gypseum* (ATCC 14683) - gentilmente cedidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os isolados de campo foram obtidos de casos clínicos de dermatofitose em cão (*M. canis*), chinchila (*T. mentagrophytes*) e o *M. gypseum* foi isolado do solo através da técnica de isca (Lacaz, 1998) e eram pertencentes à micoteca do Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária – UFPel e foram cedidos para a realização desse experimento.

Eram mantidos em cultura em Agar Sabouraud² adicionado de Cloranfenicol através de repiques bimestrais,

¹ Vetec

² Vetec

TABELA 1: Caracterização dos isolados bacterianas incluídas no trabalho quanto à reação de coagulase (*Staphylococcus spp.*) e perfil de sensibilidade.

Identificação	Coagulase	Amp	Cef	Genta	PenG	Neom	Tetra
B1 -- Staphylococcus	Pos	S	S	S	S	S	S
B2 -- Staphylococcus	Pos	S	S	S	S	S	S
B3 -- Staphylococcus	Neg	S	S	S	S	S	S
B4 -- Staphylococcus	Neg	S	S	S	S	S	S
B5 -- Staphylococcus	Neg	R	S	S	R	S	S
B6 -- Staphylococcus	Neg	S	S	S	S	S	S
B7 -- Staphylococcus	Neg	S	S	S	S	S	S
B8 -- Staphylococcus	Neg	S	S	S	S	S	S
B9 -- Staphylococcus	Pos	S	S	S	S	S	S
B10 -- Staphylococcus	Pos	S	S	S	S	S	S
B11 -- Staphylococcus	Pos	S	S	S	S	S	S
B12 -- Staphylococcus	Pos	S	S	S	S	S	S
B13 -- Staphylococcus	Pos	S	S	S	S	S	S
B14 -- Staphylococcus	Neg	R	S	S	R	S	S
B15 -- Staphylococcus	Pos	S	S	S	S	S	S
B16 -- Staphylococcus ATCC	Pos	S	S	S	S	S	S
B20 -- Streptococcus agalactiae	NT	S	S	S	S	R	S
B21 -- Streptococcus agalactiae	NT	S	S	S	S	R	S
B22 -- Streptococcus agalactiae	NT	S	S	S	S	S	S
B23 -- Streptococcus dysgalactiae	NT	S	S	S	S	S	S
B24 -- Streptococcus dysgalactiae	NT	R	S	S	S	S	S
B25 -- Streptococcus uberis	NT	S	S	R	R	S	S
B26 -- Streptococcus agalactiae	NT	S	S	S	S	S	S
B27 -- Streptococcus agalactiae	NT	S	S	R	R	R	R
B30 – Pseudomonas aeruginosa ATCC	NT	R	R	S	R	R	R

Amp – ampicilina mg

Cef – cefalotina mg

Genta – gentamicina mg

PenG – penicilina G UI

Neom – neomicina mg

Tetra – tetraciclina mg

S – sensível

R - resistente

Pos – coagulase positiva

Neg – coagulase negativa

NT – não testado

3.3 Método de Diluição – microdiluição serial em placas

A avaliação da intensidade de atividade de inibição e/ou inativação dos extratos frente a bactérias isoladas de mastite foi realizada através da adaptação da técnica da microdiluição serial em placas (DVG, 1974; RIOS et al., 1987; SCHILLACCI et al., 2003).

3.3.1 Microrganismos e Preparo do Inóculo

Para esta etapa do trabalho foram utilizados todos os isolados bacterianos da bacterioteca – nove *Staphylococcus* coagulase positiva, sete *Staphylococcus* coagulase negativa, oito *Streptococcus* spp e um *P. aeruginosa*.

As bactérias foram ativadas através da cultura em Caldo BHI* à 37°C por 24 horas, em incubadora com agitação a 180 rpm, com exceção das amostras de *Streptococcus* que apresentaram crescimento mais abundante em cultura estática. Após esse período, as culturas foram submetidas a diluições logarítmicas de base 10 sucessivas, utilizando-se como diluente Caldo BHI formulado à dupla concentração a concentração indicada pelo fabricante, a ponto de obterem-se oito diluições sucessivas onde a maior diluição apresentasse entre 10^{2-3} UFC/mL. Essas oito diluições foram utilizadas para serem confrontadas com as diluições dos extratos. O cálculo das unidades formadoras de colônia seguiu Cavalli-Sforza (1974).

Para realização do IINAB, o diluente (caldo BHI) foi acrescido de substâncias neutralizantes.

3.3.2 Diluição dos Extratos

Uma vez produzidos os extratos, seis diluições foram obtidas acrescentando-se água ao concentrado – puro, 60%, 40%, 20%, 10% e 8%. A concentração “puro” equivale ao extrato obtido de 100 gramas de planta por litro de solvente.

3.3.3 Montagem das Placas, Incubação e Leitura

A avaliação de Índice de Inibição Bacteriano (IINIB) e do Índice de Inativação Bacteriano (IINAB) era feita confrontando-se as diluições seriadas de bactérias com as diferentes concentrações de cada extrato. Para isso, foram utilizadas microplacas de poliestireno, com fundo chato, contendo 96 orifícios.

Em uma microplaca, era acrescentado 100 µL por orifício de cada diluição de cada uma bactéria estudada no sentido das linhas e em cada duas colunas era acrescentada 100 µL de uma das diluições de um extrato. Assim, obteve-se a exposição de todas as diluições bacterianas a todas as diluições dos extratos, em duplicata. Com

* VETEC

esse procedimento, corrigiu-se a concentração do meio de cultura e obteve-se concentração final de extrato de 50%, 30%, 20%, 10%, 5% e 4%, o que corresponde a uma concentração de planta de 50, 30, 20, 10, 5 e 4 g/L.

Eram mantidas colunas controles positivo, onde foram colocados 100 µL de cada diluição bacteriana e 100 µL de água destilada estéril, e negativo, com 100 µl de caldo BHI dupla concentração e as diluições dos extratos. Esse último procedimento serviu, também, para avaliação da esterilidade dos extratos.

Então, as microplacas eram fechadas e incubadas à 37⁰C durante 48 horas. Após, as microplacas eram abertas e 5 µL de cada orifício era semeado em placas de Agar BHI* sendo que para *Streptococcus*, foi utilizado Agar ICC adicionado de 5% de plasma eqüino. A recuperação de colônias compatíveis com o inóculo no sub-cultivo indicou resistência da bactéria àquela diluição do extrato e a ausência de colônias no sub-cultivo indicou sensibilidade.

3.3.4. Desenho Experimental, Interpretação e Análise Estatística

O modelo utilizado para esse trabalho seguiu o desenho fatorial, onde cinco diferentes plantas, extraídas por dois solventes diferentes, em seis concentrações diferentes, foram confrontadas com quatro grupos bacterianos, representados por um total de 25 isolados. A variável dependente era expressa por um índice de intensidade de ação obtido a partir da linha onde houve inibição total da capacidade de re-isolamento bacteriano ao plaqueamento, refletindo a diluição bacteriana em que houve inibição ou inativação - zero quando houve recuperação bacteriana de todas as diluições de dada bactéria até 8, quando não houve recuperação de nenhuma das diluições bacterianas para uma dada diluição do extrato (Quadro 1) (CARVALHO, 2004).

Ainda, a variável dependente foi expressa em duas unidades. IINIB quando se referia ao experimento realizado com caldo BHI sem neutralizantes, indicando a capacidade inibitória do extrato, e IINAB quando o experimento foi realizado adicionando neutralizantes ao meio de cultura, referindo-se a capacidade de inativação bacteriana do extrato.

* VETEC

FIGURA 1: Índice de intensidade de ação da solução desinfetante, indicado por uma variável ordinal e sua relação com a concentração bacteriana .

8	7	6	5	4	3	2	1	0	Variáveis ordinais de intensidade de ação (IINIB e IINAB)
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}		UFC/mL – diluições do inóculo inibida ou inativada
10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	n.a	UFC/mL – Doses infectantes inibidas ou inativadas

A análise estatística foi realizada para comparar o efeito de cada solução desinfetante, o tipo de extração e a sensibilidade dos grupos bacterianos aos desinfetantes. Considerando que as variáveis dependentes IINIB e IINAB são ordinais e não seguem a distribuição normal, elas foram submetidas à análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis para comparação entre as 10 soluções desinfetantes (cinco plantas e duas formas de extração). Quando significativo, as médias foram comparadas utilizando o método de Kruskal-Wallis para comparação de médias (CALLEGARI-JACQUES, 2003). O mesmo método foi utilizado para comparar a sensibilidade dos grupos bacterianos às soluções desinfetantes. Foi utilizado o teste de T de Wilcoxon para comparar EHA e DEC de cada planta e a correlação das variáveis IINIB e IINAB foi avaliada pelo teste de Spearman. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico Statistix 8.0.

3.4 Concentração Inibitória Mínima dos Extratos de Plantas frente a Dermatófitos

3.4.1 Microrganismos e Preparo do Inóculo

Foram utilizadas as seis isolados de três espécies de dermatófitos existentes na micoteca do Laboratório de Micologia, da Faculdade de Veterinária, UFPel (Tabela 2). Os microrganismos foram ativados através do cultivo prévio em meio Mycosel* e o inóculo preparado por diluição em meio de cultura Sabouraud líquido, até a concentração de 10^3 UFC/mL. Para isso, o micélio do fungo foi obtido com alça de platina, ressuspendido em salina estéril com Tween 80 à 1% e vigorosamente

* VETEC

homogeneizado até alcançar a escala 2 de MacFarland. Então, foi diluído 50 vezes em caldo Sabouraud dupla concentração estéril sendo este o inóculo.

3.4.2 Extratos, Montagem das placas, Incubação e Leitura

Foram utilizados extratos hidroalcoólicos e decoctos das cinco plantas. Os extratos preparados como previamente descritos foram diluídos em escala logarítmica de base 2, utilizando-se salina estéril, obtendo-se sete diluições, do puro até 1,56% significando 100 g/L a 1,56g/L. O método utilizado foi a microdiluição em caldo (NCCLS, 1997) modificado por Nascente (2001). O experimento foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 orifícios, onde foram colocados em cada um 100 µL de suspensão fúngica e 100 µL de extrato diluído, que determina uma concentração final da solução desinfetante de 50 g/L a 0,782g/L. Controles positivo de crescimento fúngico e negativo de esterilidade do extrato foram realizados. As microplacas foram fechadas e incubadas à 25⁰C, durante 10 dias. A leitura foi realizada pelo método visual, onde a ausência de crescimento micelial visível indicou eficácia da solução desinfetante e o resultado foi expresso em Concentração Inibitória Mínima, indicada pela recíproca da diluição onde houve inativação completa do fungo, em g/L.

3.4.3 Análise estatística

Foi realizada análise descritiva dos resultados e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para análise de variância e comparação entre médias de variáveis não-paramétrica, comparando-se os resultados obtidos em cada uma das formas de obtenção do extrato, considerando cada isolado fúngico como uma repetição.

Tabela 2: Identificação e origem das espécies de dermatófitos utilizadas para avaliação das soluções desinfetantes.

Espécie	Identificação	Origem
<i>Microsporum canis</i>	ATCC 32903	FIOCRUZ
<i>Microsporum canis</i>	LM – Mc01	Cão
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	ATCC 9533	FIOCRUZ
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	LM – Tm01	Chinchila
<i>Microsporum gypseum</i>	ATCC 14683	FIOCRUZ
<i>Microsporum gypseum</i>	LM – Mg01	Solo

3.5 Cinética de Inativação

3.5.1 Microrganismos e Preparo do Inóculo.

Para realização desta etapa do experimento, foram utilizadas as cepas padrão cedidas pela Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) de *S. aureus* ATCC 12600 e de *P. aeruginosa* ATCC 10145 e a amostra B21, referente a *S. agalactiae* isolado de leite de um bovino com mastite, pertencente a bacterioteca do LDI/DVP/FV/UFPEL. Os cuidados de manutenção foram os mesmos conforme já descrito no item 3.2.3. As bactérias eram multiplicadas em Ágar sangue 24 horas antes da realização dos experimentos, ressuspensa em salina estéril à escala 2 de turvação de MacFarland e diluída 50 vezes em salina a fim de obter-se um inóculo entre 10^7 e 10^8 UFC/mL

3.5.2 Soluções Desinfetantes

Neste experimento, foram utilizados extratos hidroalcolico e decocto de três plantas das quais se obteve melhores resultados no primeiro experimento – *B. trimera*, *Eucalyptus spp.* e *T. minuta*. Os extratos das plantas foram preparados como previamente descrito e sem diluição prévia, portanto, numa única concentração experimental.

Como controle positivo, foi incluída no experimento uma solução de clorexidina associada à cetrimida*, ajustada para alcançar a concentração final de 0,18% de clorexidina.

3.5.3 Desenho Experimental

O experimento foi realizado submetendo-se as três amostras bacterianas ao contato com as sete soluções desinfetantes, durante quatro intervalos de tempo – 30 segundos, 2, 10 e 30 minutos. Como variável interveniente, o experimento foi repetido com a presença de matéria orgânica representada por leite integral estéril, a uma concentração final de 20%.

O procedimento foi como segue:

* Digluconato de clorexidina + Cloreto de cetrimida, Chemitec.

Tubos foram preparados com 1 mL de água estéril ou leite estéril. A esses, foi acrescido 4 mL da solução desinfetante. Com controle de tempo com cronômetro, foi adicionado a cada tubo 50 µL de inóculo, homogeneizado vigorosamente, e em cada tempo desejado era retirada uma amostra de 30 µL de cada tubo e transferida para outro tubo contendo 3 mL de caldo BHI. Após homogeneização, três alíquotas de 40 µL deste tubo foram semeadas em três placas de Agar BHI, sendo, logo a seguir, espalhadas com alça de Drigalski. Para o experimento com *S. agalactiae*, foram utilizadas placas de Agar BHI com 5% de plasma equino.

As placas de Petry foram incubadas por 24 horas à 37⁰C e as UFC contadas utilizando contador com lupa. Da mesma forma, os tubos com caldo BHI inoculados foram incubados para controle de possível contaminação e, também, para avaliar ação antimicrobiana residual das soluções desinfetantes através da inoculação de *S. aureus* naqueles tubos onde não houve crescimento visível após cinco dias de incubação. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

Controle negativo foram realizados, adicionando o inóculo a 5 mL de água estéril e realizando procedimento idêntico a aqueles com solução desinfetante. O experimento foi considerado válido quando as contagens bacterianas dos tubos controles estiveram, em média, entre 40 e 300 UFC, indicando o inóculo mínimo de 10⁷UFC/mL.

A interpretação foi realizada da seguinte forma: A média de colônias em cada repetição dos tratamentos foi submetida à transformação logarítmica, assim como a média dos controles. Já que os valores obtidos nos controles não são sempre idênticos, foi calculado um índice de inativação utilizando a seguinte fórmula:

$$II = 1 - (\log \text{trat} / \log \text{cont})$$

Onde:

II é o índice de inativação e pode ter variação de 0 a 1. Quanto mais próximo a um, maior a efetividade da solução desinfetante. Nos casos em que o II encontrado foi negativo, o valor foi considerado igual a 0.

Log trat é a média da contagem das três placas do isolado bacteriana exposta a determinada solução desinfetante num dado tempo, submetida a transformação logarítmica ($\log (Y+1)$, segundo Markus (1973)) e Log cont é a média da contagem das três placas do controle da amostra bacteriana, submetida a mesma transformação logarítmica.

3.5.4. Análise Estatística

Análise descritiva foi realizada calculando-se a média do II para cada desinfetante, bactéria e tempo, com e sem matéria orgânica.

As variáveis dependentes II das soluções desinfetantes foram comparadas através de análise de variância seguindo delineamento fatorial, para cada uma das bactérias testadas, com e sem matéria orgânica. Quando houve significância para o fator solução desinfetante, comparação com o padrão (clorexidina) foi realizada utilizando o teste de Dunnett, para demonstrar efeito inferior ao controle. O efeito matéria orgânica foi analisado para cada desinfetante utilizando o teste Tukey.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistix 8.0.

4. RESULTADOS

4.1 Método de Diluição

Todas as soluções desinfetantes apresentaram algum efeito antibacteriano. Os extratos hidroalcoólicos apresentaram atividade superior aos decoctos com exceção do *T. minuta* onde não houve diferença entre os extratos para nenhum dos grupos bacterianos ($p < 0,05$). O coeficiente de correlação entre IINIB e IINAB foi de 0,70, considerada alta correlação.

A análise geral dos resultados, expresso na Tabela 3, demonstrou que o EHA de *Eucalyptus spp.* apresentou-se como a solução desinfetante com melhor IINIB ($p = 0,0026$). Aparecem em um segundo grupo, o DEC de *T. minuta* e os EHA de *B. trimera*, *T. minuta* e *B. pilosa*, esta em posição intermediária. Em relação ao IINAB, o grupo de maior eficácia é formado pelo EHA de *Eucalyptus spp.*, *B. trimera* e o DEC de *T. minuta*. Em ambas as análises, os dois extratos de *P. punctatum* apresentam-se com o pior desempenho juntamente ao DEC de *Eucalyptus spp.* Como esperado, pode-se observar diferenças significativas entre as concentrações dos extratos, tanto ao IINIB ($p = 0,0047$) quanto ao IINAB ($p = 0,042$) (Tabela 4). Quanto aos grupos bacterianos, a *P. aeruginosa* apresentou-se mais resistente que os outros grupos, tanto no IINIB ($p = 0,000$) quanto no IINAB ($p = 0,000$). Embora sem diferença significativa entre os outros 3 grupos bacterianos, *Streptococcus spp* apresentou-se mais sensível, seguido pelo grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativa e, posteriormente, por *Staphylococcus* coagulase positiva (Tabela 5).

TABELA 3: IINIB E IINAB médio e desvio padrão dos extratos de plantas com indicativo etnográfico desinfetante frente a isolados bacterianos de leite mastítico e padrões (n=25; r=2).

Planta	Extrato	Média	Variável dependente	p entre extratos da planta
<i>Polygonum punctatum</i>	DEC	0,607 ^{e, B}	IINIB*	0,0198
		0,000 ^{e, B}	IINAB**	0,0140
	EHA	1,310 ^{e, A} 0,113 ^{d, e, A}	IINIB IINAB	
<i>Baccharis trimera</i>	DEC	3,113 ^{c, d, B}	IINIB	0,0000
		1,063 ^{c, B}	IINAB	0,0000
	EHA	4,740 ^{b, A} 3,493 ^{a, A}	IINIB IINAB	
<i>Bidens pilosa</i>	DEC	2,513 ^{d, B}	IINIB	0,0000
		1,733 ^{b, c, A}	IINAB	0,9697
	EHA	3,653 ^{b, c, A} 1,823 ^{b, c, A}	IINIB IINAB	
<i>Tagetes minuta</i>	DEC	4,423 ^{b, A}	IINIB	0,3270
		2,687 ^{a, b, A}	IINAB	0,0000
	EHA	4,763 ^{b, A} 1,113 ^{c, d, B}	IINIB IINAB	
<i>Eucalyptus spp</i>	DEC	0,203 ^{e, B}	IINIB	0,0000
		0,013 ^{e, B}	IINAB	0,0000
	EHA	5,927 ^{a, A} 3,633 ^{a, A}	IINIB IINAB	

IINIB p=0,0026 e IINAB = 0,0000

Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$) considerando separadamente IINIB e IINAB, minúsculas referem-se à comparação entre as soluções desinfetantes através da análise de dados ordinais não paramétricos de Kruskal-Wallis e as maiúsculas referem-se à comparação entre forma de extração de cada planta pelo teste pareado de Wilcoxon, com p apresentado na última coluna.

*IINIB – Índice de inibição da solução desinfetante.

**IINAB – índice de inativação da solução desinfetante.

TABELA 4: IINIB E IINAB médio das diferentes concentrações das soluções desinfetantes frente a isolados de leite mastítico e padrões

Concentração do Extrato (%)		Média
50	IINIB*	6,22 ^a
	IINAB**	4,40 ^a
30	IINIB	5,23 ^b
	IINAB	3,3 ^b
20	IINIB	4,24 ^c
	IINAB	1,52 ^c
10	IINIB	2,21 ^d
	IINAB	0,16 ^d
5	IINIB	0,57 ^e
	IINAB	0,02 ^d
4	IINIB	0,29 ^e
	IINAB	0 ^d

Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$) considerando separadamente IINIB e IINAB, através da análise de dados ordinais não paramétricos de Kruskal-Wallis.

*IINIB – Índice de inibição da solução desinfetante.

**IINAB – índice de inativação da solução desinfetante

TABELA 5: IINIB E IINAB médio das soluções desinfetantes frente aos diferentes grupos bacterianos isolados de leite mastítico e padrões.

Grupo bacteriano		N [*]	Média
1	IINIB**	9	3,138 ^a
	IINAB***	9	1,371 ^a
2	IINIB	7	3,293 ^a
	IINAB	7	1,706 ^a
3	IINIB	8	3,281 ^a
	IINAB	8	1,859 ^a
4	IINIB	1	0,592 ^b
	IINAB	1	0,025 ^b

Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$) considerando separadamente IINIB e IINAB, através da análise de dados ordinais não paramétricos de Kruskal-Wallis.

*N: número de amostras testadas.

**IINIB – Índice de inibição da solução desinfetante.

***IINAB – índice de inativação da solução desinfetante.

*** Grupo 1: *Staphylococcus coagulase positiva*

Grupo 2: *Staphylococcus coagulase negativa*;

Grupo 3: *Streptococcus spp*;

Grupo 4: *Pseudomonas aeruginosa*

A estratificação da análise, isolando-se as variáveis concentração de extrato e grupo bacteriano, permite obter algumas importantes informações. Frente ao gênero *Streptococcus spp* (Tabela 6), duas soluções desinfetantes apresentaram inibição bacteriana na concentração de 4 g/L (EHA de *T. minuta* e de *Eucalyptus spp*). Na concentração de 50g/L, o DEC de *P. punctatum* não apresentou ação inibidora sobre nenhuma das amostras testadas, enquanto que o DEC e o EHA desta planta não apresentaram capacidade de inativação, e juntamente com do DEC de *Eucalyptus spp*, apresentaram tanto IINIB, quanto IINAB estatisticamente menor que os demais ($p=0,000$). O decocto de *B. pilosa* apresentou uma potência de ação intermediária enquanto que os demais extratos apresentaram forte efeito anti-estreptococos.

Com relação ao *Staphylococcus coagulase positiva*, somente o EHA de *Eucalyptus spp* foi capaz de inibir algumas amostras a 4 e 5 g/L (três de nove isolados testados) e inativar a 5 e 10 g/L (respectivamente, um e dois isolados). Todos os extratos foram capazes de inibir alguma das amostras bacterianas, divididos em três grupos quanto a sua eficácia: DEC e EHA de *B. trimera*, DEC e EHA de *B. pilosa*, DEC e EHA de *T. minuta* e EHA de *Eucalyptus spp* com IINIB médio acima de 7,5, EHA e DEC de *P. punctatum*, com IINIB intermediário e o DEC de *Eucalyptus spp* com IINIB mais baixo, atuando sobre a cepa padrão de *S. aureus*. A distribuição do IINAB para esses microrganismos foi semelhança ao IINIB, sendo que DEC de *Eucalyptus spp* e DEC de *P. punctatum* não apresentaram atividade inativadora sobre nenhuma das cepas e o EHA de *T. minuta* e de *P. punctatum* atuaram sobre uma única amostra (Tabela 7).

Os resultados para *Staphylococcus coagulase negativa* estão descritos na Tabela 8. Eles apresentaram-se muito semelhantes ao grupo anterior. Somente o EHA de *Eucalyptus spp* inibiu amostras desse grupo bacteriano a 4 e 5 g/L e inativou a 5 e 10 g/L. Também, o IINIB para EHA e DEC de *P. punctatum* e DEC de *Eucalyptus spp* a 50g/L foram baixos, diferindo significativamente dos demais ($p=0,000$). Quanto ao IINAB, DEC de *P. punctatum* e *Eucalyptus spp* não apresentaram efeito, enquanto que EHA de *P. punctatum* e *T. minuta* foram baixos, diferindo estatisticamente dos demais extratos ($p=0,000$), com exceção do DEC de *B. trimera*, que apresentou ação intermediária.

A *P. aeruginosa* foi a bactéria mais resistente (Tabela 9). Ambos os extratos de *P. punctatum*, *B. pilosa* e os decoctos de *B. trimera* e *Eucalyptus spp* não apresentaram

ação inibidora a 50 g/L. O EHA de *Eucalyptus spp* e de *B. trimera* e o DEC de *T. minuta* inibiram até 30 g/L, em diferentes intensidades. Somente o DEC de *T. minuta* foi capaz de inativar a bactéria, em muito baixa intensidade (IINAB médio de 1,5).

Tabela 6: Atividade antibacteriana expressa em média de IINIB e IINAB de diversas concentrações de soluções desinfetantes obtidas a partir de extratos de plantas com indicativo etnográfico antisséptico/desinfetante frente a amostras de *Streptococcus spp* (n=8; r=2), isoladas de leite mastítico.

Planta ***	Desinfetante Extrato ****	Concentração						
		50 g/L	30 g/L	20 g/L	10 g/L	5 g/L	4 g/L	
1	1	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^c	0 ^b	0 ^a	IINIB *
		0 ^b	0 ^d	0 ^b	0 ^a	0	0	IINAB **
1	2	6,88 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^c	0 ^b	0 ^a	IINIB
		0 ^b	0 ^d	0 ^b	0 ^a	0	0	IINAB
2	1	7,69 ^a	5,5 ^{a,b}	5,5 ^{a,b}	0,5 ^c	0 ^b	0 ^a	IINIB
		5,5 ^{a,b}	4,19 ^{b,c,d}	0,31 ^b	0 ^a	0	0	IINAB
2	2	8 ^a	8 ^a	8 ^a	6,75 ^{a,b}	0 ^b	0 ^a	IINIB
		8 ^a	7,94 ^a	4,81 ^a	0 ^a	0	0	IINAB
3	1	4,94 ^{a,b}	2,56 ^b	0,13 ^b	0 ^c	0 ^b	0 ^a	IINIB
		4,06 ^{a,b}	1,5 ^{c,d}	0 ^b	0 ^a	0	0	IINAB
3	2	8 ^a	8 ^a	7,88 ^a	5,88 ^{a,b}	0,31 ^{a,b}	0 ^a	IINIB
		8 ^a	7,94 ^a	2,38 ^{a,b}	0 ^a	0	0	IINAB
4	1	8 ^a	8 ^a	7,31 ^a	3 ^{b,c}	0,13 ^{a,b}	0 ^a	IINIB
		8 ^a	7,69 ^{a,b}	2,63 ^{a,b}	0 ^a	0	0	IINAB
4	2	8 ^a	8 ^a	8 ^a	6,88 ^{a,b}	5,13 ^a	2,81 ^a	IINIB
		8 ^a	5,94 ^{a,b,c}	4,69 ^a	0 ^a	0	0	IINAB
5	1	1,31 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^c	0 ^b	0 ^a	IINIB
		0,25 ^b	0 ^d	0 ^b	0 ^a	0	0	IINAB
5	2	8 ^a	8 ^a	8 ^a	8 ^a	4,88 ^a	0,50 ^a	IINIB
		8 ^a	8 ^a	4,31 ^a	0,75 ^a	0	0	IINAB
	p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	IINIB
		0,000	0,000	0,000	0,029	--	----	IINAB

Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$) dentro de cada concentração e considerando separadamente IINIB e IINAB, através da análise de dados ordinais não paramétricos de Kruskal-Wallis.

* IINIB – Índice de inibição que um desinfetante a correspondente concentração foi capaz de inibir o crescimento bacteriano.

** IINAB – índice de inativação que um desinfetante a correspondente concentração foi capaz de inativar a amostra bacteriana.

*** Planta 1: *Polygonum punctatum*;

Planta 2: *Baccharis trimera*;

Planta 3: *Bidens pilosa*;

Planta 4: *Tagetes minuta*;

Planta 5: *Eucalyptus spp*.

**** Extrato 1: Decocto

Extrato 2: Hidroalcoólico

Tabela 7: Atividade antibacteriana expressa em média de IINIB e IINAB de diversas concentrações de soluções desinfetantes obtidas a partir de extratos de plantas com indicativo etnográfico antisséptico/desinfetante frente a amostras de *Staphylococcus spp.*, coagulase positiva (n=9; r=2) isoladas de leite mastítico e padrão.

Planta ***	Desinfetante ****	Concentração						
		50 g/L	30 g/L	20 g/L	10 g/L	5 g/L	4 g/L	
1	1	3,11 ^c	1,56 ^{d,e}	0 ^c	0 ^c	0 ^a	0 ^a	IINIB*
		0 ^c	0 ^c	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0	IINAB**
1	2	5,94 ^{b,c}	2,78 ^{c,d,e}	0 ^c	0 ^c	0 ^a	0 ^a	IINIB
		0,44 ^c	0 ^c	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
2	1	7,56 ^{a,b}	7 ^{a,b,c}	5,89 ^{a,b}	0,11 ^{b,c}	0 ^a	0 ^a	IINIB
		3,22 ^{b,c}	0,5 ^c	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
2	2	8 ^a	7,83 ^{a,b}	7,33 ^a	4,33 ^a	0 ^a	0 ^a	IINIB
		8 ^a	7 ^a	6,28 ^a	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
3	1	7,67 ^{a,b}	6,78 ^{b,c,d}	4,11 ^{b,c}	1,56 ^{a,b,c}	0 ^a	0 ^a	IINIB
		6,56 ^{a,b}	4,94 ^{a,b}	0,44 ^b	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
3	2	7,89 ^{a,b}	7,28 ^{a,b}	3,72 ^{a,b}	0,56 ^{b,c}	0 ^a	0 ^a	IINIB
		6,06 ^{a,b}	1,06 ^{b,c}	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
4	1	8 ^a	8 ^a	7,89 ^a	3,78 ^{a,b}	0 ^a	0 ^a	IINIB
		7,89 ^a	7,22 ^a	1,33 ^{a,b}	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
4	2	8 ^a	7,89 ^{a,b}	6,67 ^{a,b}	2,22 ^{a,b,c}	0 ^a	0 ^a	IINIB
		0,89 ^c	0,28 ^c	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
5	1	0,44 ^c	0 ^e	0 ^c	0 ^c	0 ^a	0 ^a	IINIB
		0 ^c	0 ^c	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
5	2	8 ^a	8 ^a	7,61 ^a	5,33 ^a	3,11 ^a	2,33 ^a	IINIB
		7,22 ^a	8 ^a	3,78 ^a	0,94 ^a	0,22 ^a	0	IINAB
	p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	IINIB
		0,000	0,000	0,000	0,007	0,030	----	IINAB

Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$) dentro de cada concentração e considerando separadamente IINIB e IINAB, através da análise de dados ordinais não paramétricos de Kruskal-Wallis.

*IINIB – Índice de inibição que um desinfetante a correspondente concentração foi capaz de inibir o crescimento bacteriano.

**IINAB – índice de inativação que um desinfetante a correspondente concentração foi capaz de inativar a amostra bacteriana.

***Planta 1: *Polygonum punctatum*;

Planta 2: *Baccharis trimera*;

Planta 3: *Bidens pilosa*;

Planta 4: *Tagetes minuta*;

Planta 5: *Eucalyptus spp.*

****Extrato 1: Decocto

Extrato 2: Hidroalcoólico

Tabela 8: Atividade antibacteriana expressa em média de IINIB e IINAB de diversas concentrações de soluções desinfetantes obtidas a partir de extratos de plantas com indicativo etnográfico antisséptico/desinfetante frente a amostras de *Staphylococcus spp* coagulase negativa (n=7; r=2), isoladas de leite mastítico.

Desinfetante		Concentração						
Planta ***	Extrato ****	50 g/L	30 g/L	20 g/L	10 g/L	5 g/L	4 g/L	
1	1	3,71 ^b	2,43 ^{b,c}	0,86 ^{d,e}	0 ^b	0 ^a	0 ^a	IINIB*
		0 ^d	0 ^c	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0	IINAB**
1	2	5,43 ^{a,b}	3 ^{b,c}	0,57 ^{d,e}	0 ^b	0 ^a	0 ^a	IINIB
		1,86 ^{b,c,d}	0 ^c	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
2	1	7,86 ^a	6,57 ^{a,b}	5,71 ^{a,b,c,d}	0 ^b	0 ^a	0 ^a	IINIB
		6,07 ^{a,b,c}	2 ^{b,c}	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	IINAB
2	2	8 ^a	8 ^a	8 ^a	5,5 ^a	0 ^a	0 ^a	IINIB
		8 ^a	8 ^a	7,79 ^a	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
3	1	7,71 ^a	6 ^{a,b,c}	3,71 ^{c,d,e}	1,86 ^{a,b}	0 ^a	0 ^a	IINIB
		7,57 ^a	5,64 ^{a,b}	2,21 ^{a,b}	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
3	2	7,71 ^a	7,07 ^{a,b}	4,07 ^{b,c,d,e}	0,07 ^b	0 ^a	0 ^a	IINIB
		7,14 ^{a,b}	1,86 ^{b,c}	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
4	1	8 ^a	8 ^a	7,86 ^{a,b}	4 ^{a,b}	0 ^a	0 ^a	IINIB
		8 ^a	7,29 ^{a,b}	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
4	2	8 ^a	7,86 ^a	6,29 ^{a,b,c}	3,14 ^{a,b}	0 ^a	0 ^a	IINIB
		1,07 ^{c,d}	0 ^c	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
5	1	1,86 ^b	0,43 ^c	0 ^e	0 ^c	0 ^a	0 ^a	IINIB
		0 ^d	0 ^c	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0	IINAB
5	2	8 ^a	8 ^a	8 ^a	6,57 ^a	4,29 ^a	3,43 ^a	IINIB
		8 ^a	8 ^a	7,57 ^a	3,71 ^a	0,57 ^a	0	IINAB
	p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	IINIB
		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	----	IINAB

Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$) dentro de cada concentração e considerando separadamente IINIB e IINAB, através da análise de dados ordinais não paramétricos de Kruskal-Wallis.

* IINIB – Índice de inibição que um desinfetante a correspondente concentração foi capaz de inibir o crescimento bacteriano.

** IINAB – índice de inativação que um desinfetante a correspondente concentração foi capaz de inativar a amostra bacteriana.

*** Planta 1: *Polygonum punctatum* ;

Planta 2: *Baccharis trimera*;

Planta 3: *Bidens pilosa*;

Planta 4: *Tagetes minuta*;

Planta 5: *Eucalyptus spp.*

**** Extrato 1: Decocto

Extrato 2: Hidroalcoólico

Tabela 9: Atividade antibacteriana expressa em média de IINIB e IINAB de diversas concentrações de soluções desinfetantes obtidas a partir de extratos de plantas com indicativo etnográfico antisséptico/desinfetante frente a amostra de *Pseudomonas aeruginosa* (n=1; r=2).

Desinfetante		Concentração		Desinfetante		Concentração			
Planta ***	Extrato ****	50 g/L	30 g/L	Planta	Extrato	50 g/L	30 g/L		
1	1	0 ^a	0 ^a	IINIB	3	2	0 ^a	0 ^a	IINIB*
		0 ^a	0	IINAB			0 ^a	0	IINAB**
1	2	0 ^a	0 ^a	IINIB	4	1	7 ^a	1 ^a	IINIB
		0 ^a	0	IINAB			1,5 ^a	0	IINAB
2	1	0 ^a	0 ^a	IINIB	4	2	4 ^a	0 ^a	IINIB
		0 ^a	0	IINAB			0 ^a	0	IINAB
2	2	6,5 ^a	4,5 ^a	IINIB	5	1	0 ^a	0 ^a	IINIB
		0 ^a	0	IINAB			0 ^a	0	IINAB
3	1	0 ^a	0 ^a	IINIB	5	2	7 ^a	5,5 ^a	IINIB
		0 ^a	0	IINAB			0 ^a	0	IINAB
	P	0,00	0,00						
		0,00	--						

Obs.: Nenhuma solução desinfetante foi ativa em concentração inferior a 30 g/L.

Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$) dentro de cada concentração e considerando separadamente IINIB e IINAB, através da análise de dados ordinais não paramétricos de Kruskal-Wallis.

*IINIB – Índice de inibição que um desinfetante a correspondente concentração foi capaz de inibir o crescimento bacteriano.

**IINAB – índice de inativação que um desinfetante a correspondente concentração foi capaz de inativar a amostra bacteriana.

***Planta 1: *Polygonum punctatum* ;
 Planta 2: *Baccharis trimera*;
 Planta 3: *Bidens pilosa*;
 Planta 4: *Tagetes minuta*;
 Planta 5: *Eucalyptus spp.*

**** Extrato 1: Decocto
 Extrato 2: Hidroalcoólico

4.2 Ação Antifúngica

Os resultados da ação antifúngica dos extratos de plantas avaliados neste trabalho estão apresentados na Tabela 10. Os EHA das plantas testadas apresentaram ação antifúngica frente às seis amostras testadas. O EHA de *T. minuta* e de *B. pilosa* foram significativamente melhores que os demais ($p=0,0002$), apresentando CIM médio de 6,25 e 5,5 g/L, respectivamente. Apenas os decoctos de *P. punctatum*, frente à amostra padrão de *M. canis*, e o DEC de *B. trimera*, frente às duas amostras de *M. canis*, mostraram ação antifúngica.

Tabela 10: Concentração Inibitória Mínima (CIM) média das soluções desinfetantes obtidas a partir de extratos de plantas com indicativo etnográfico antisséptico/desinfetante extratos de plantas testadas frente a 6 diferentes isolados de dermatófitos. (n=6, r=2)

Planta	EHA **	Isolados sensíveis	CIM médio g/L *	
			Decocto	Isolados sensíveis
<i>Baccharis trimera</i>	19,5 ^{A,b***}	6	25 ^B	2
<i>Bidens pilosa</i>	6,25 ^{A,a}	6	>50 ^B	0
<i>Eucalyptus spp.</i>	19,5 ^{A,b}	6	>50 ^B	0
<i>Polygonum punctatum</i>	16,5 ^{A,b}	6	25 ^B	1
<i>Tagetes minuta</i>	5,5 ^{A,a}	6	>50 ^B	0

* A CIM está expressa pela menor concentração de extrato (g/L) que apresentou efeito antifúngico. CIM negativo foi representado pelo valor >50.

** EHA- Extrato hidralcoólico

*** Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas nas linhas e letras minúsculas nas colunas (p<0,05)

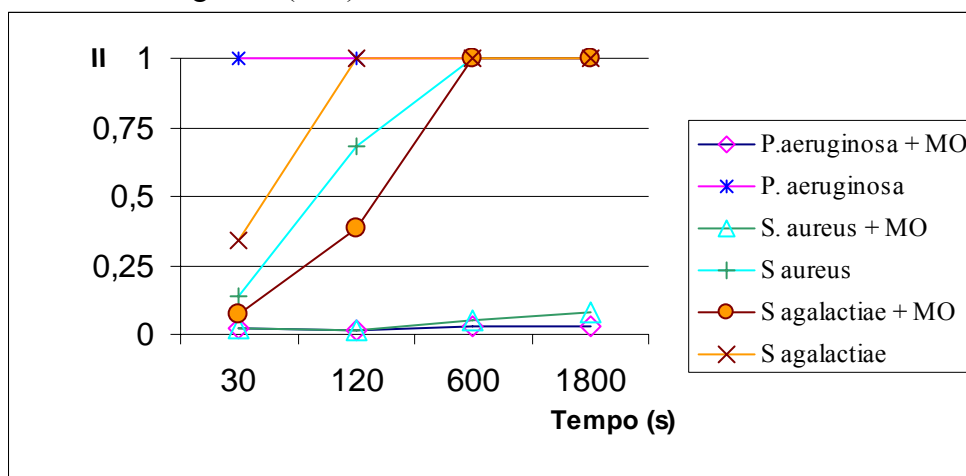
4.3 Cinética de Inativação de Bactérias Causadoras de Mastite

4.3.1 Estatística Descritiva, Efeito Tempo e Matéria Orgânica:

Clorexidina: A clorexidina, utilizada neste experimento como controle positivo, foi capaz de inativar as três espécies bacterianas durante o período testado. A ação sobre *S. agalactiae* foi rápida havendo inativação total aos 30 segundos. Já *P. aeruginosa* foi inativada aos 2 minutos e *S. aureus* aos 10 minutos não apresentava mais células viáveis (Figura 2).

Quando em presença de matéria orgânica leite a 20%, a ação da clorexidina foi bastante reduzida (p<0,0000). Apesar de demonstrar uma tendência de redução da contagem de *S. aureus* e *P.aeruginosa*, a sua eficácia foi fraca, não ultrapassando 10^{0,3} de redução na contagem de células após 30 minutos de incubação. Porém, a clorexidina ainda foi capaz de inativar completamente o *S. agalactiae* na presença de matéria orgânica após 10 minutos de incubação.

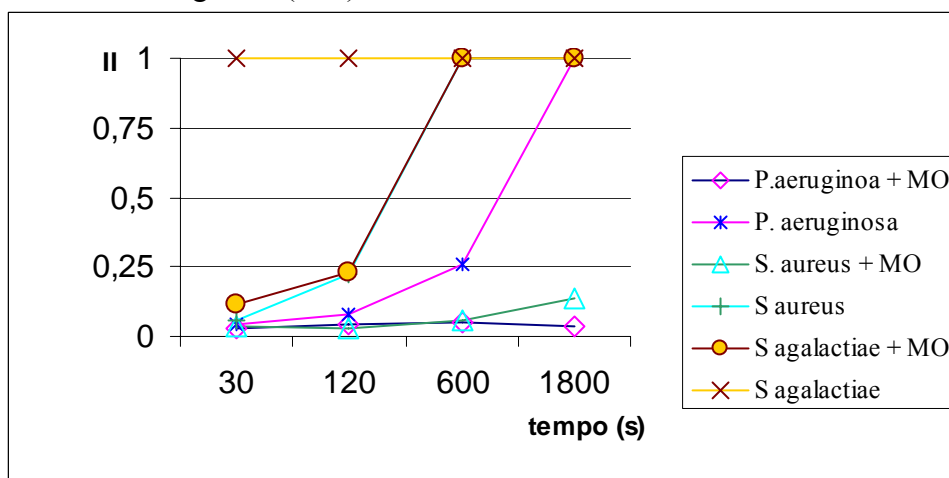
Figura 2: Cinética de inativação de três bactérias frente à Clorexidina (0,55%) expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO).



EHA - *Eucalyptus* spp.: Também, este extrato foi capaz de inativar ao menos 10^5 UFC/ml dos três microrganismos testados, alcançando este resultado em 30 segundos, 10 minutos e 30 minutos para *S. agalactiae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente (Figura 3).

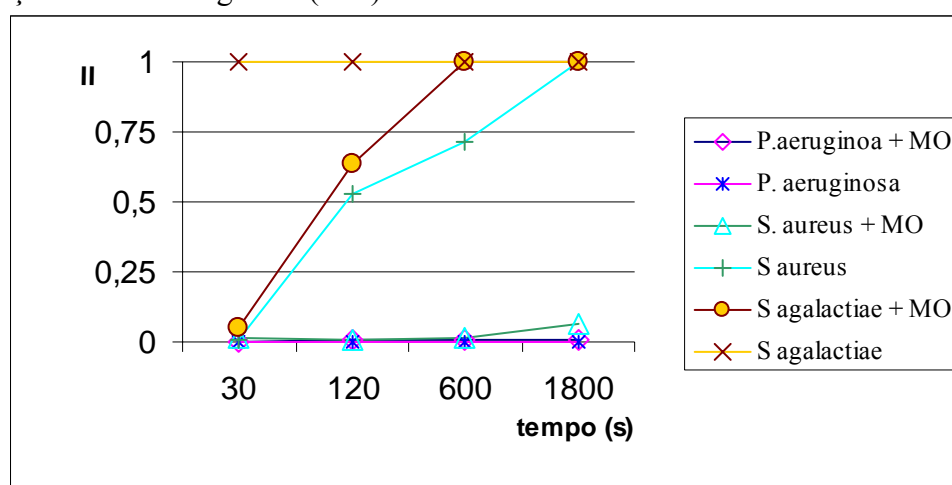
Sofreu influência da presença de leite a 20% ($p < 0,000$). Mas, foi capaz de inativar *S. agalactiae* após 10 minutos de contato, reduziu a contagem de *S. aureus* em até $10^{0,7}$ UFC/ml e não apresentou ação sobre a *P. aeruginosa* durante os 30 minutos de exposição, nesta condição experimental.

Figura 3: Cinética de inativação de três bactérias frente ao EHA de *Eucalyptus* spp expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO).



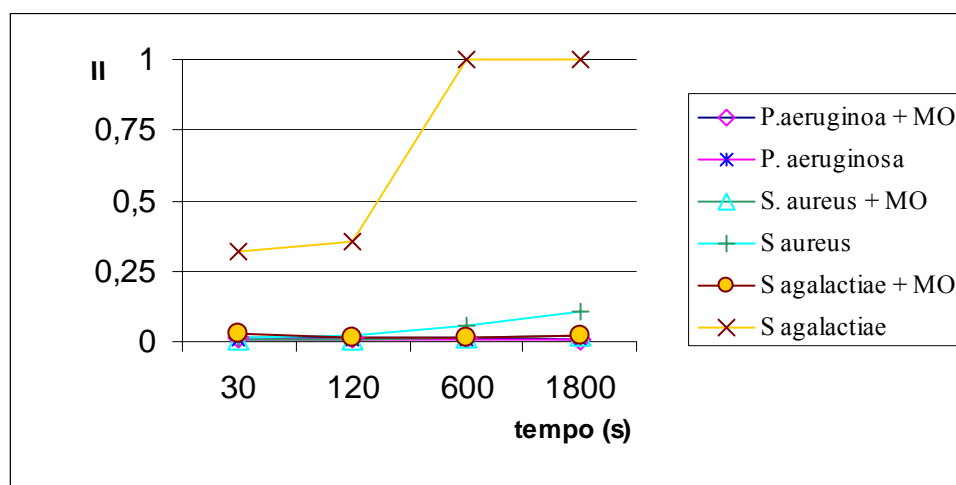
EHA – *Tagetes minuta*: Os resultados referentes a curva de inativação desta solução desinfetante são apresentados na Figura 4. Não foi identificada ação antibacteriana deste extrato sobre a *P. aeruginosa*. Foi capaz de eliminar todas as células de *S. agalactiae* em 30 segundos, tempo que foi ampliado para 10 minutos quando em presença de matéria orgânica. Inativou o *S. aureus* em 30 minutos. Em presença de matéria orgânica, apenas aos 30 minutos percebe-se uma pequena tendência de redução da contagem de células ($-10^{0,35}$ UFC/mL).

Figura 4: Cinética de inativação de três bactérias frente ao EHA de *Tagetes minuta* expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO).



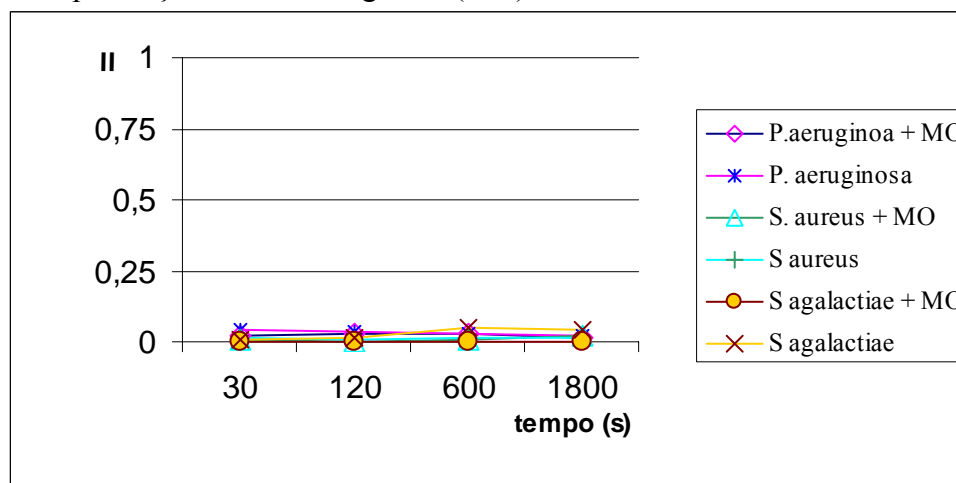
DEC *Eucalyptus spp.*: O decocto de *Eucalyptus spp* teve a capacidade de eliminar completamente o *S. agalactiae* em 10 minutos de contato. Também, reduziu em $10^{0,5}$ UFC/mL a contagem de *S. aureus*. Não apresentou ação sobre *P. aeruginosa* e nem sobre nenhuma das três bactérias em presença de matéria orgânica (Figura 5).

Figura 5: Cinética de inativação de três bactérias frente ao decocto de *Eucalyptus spp* expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO).



DEC *Tagetes minuta*: Esse extrato apresentou algum efeito antibacteriano sobre o *S. agalactiae*, reduzindo o número de células viáveis em $10^{0,3}$ UFC/mL. Sobre as outras bactérias e em presença de matéria orgânica não houve efeito antibacteriano detectável (Figura 6).

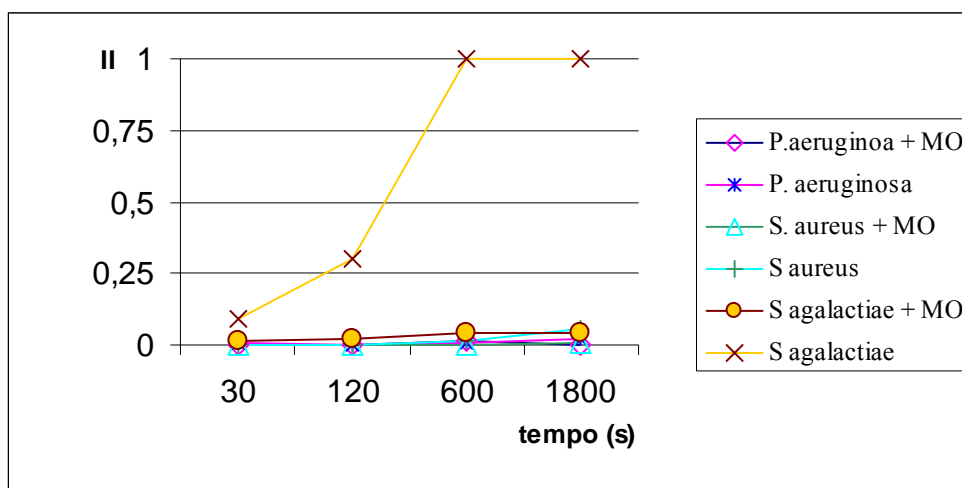
Figura 6: Cinética de inativação de três bactérias frente ao decocto de *Tagetes minuta* expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO).



DEC *Baccharis trimera*: Na Figura 7, pode-se observar que houve a inativação de *S. agalactiae* após 10 minutos de exposição a essa solução desinfetante. Também, foi encontrada uma tendência a redução da contagem de *S. aureus* aos 30 minutos de

contato de aproximadamente $10^{0,3}$ UFC/mL. *P. aeruginosa* sem matéria orgânica e nenhuma das três bactérias em presença de leite integral a 20% foram sensíveis a esse extrato.

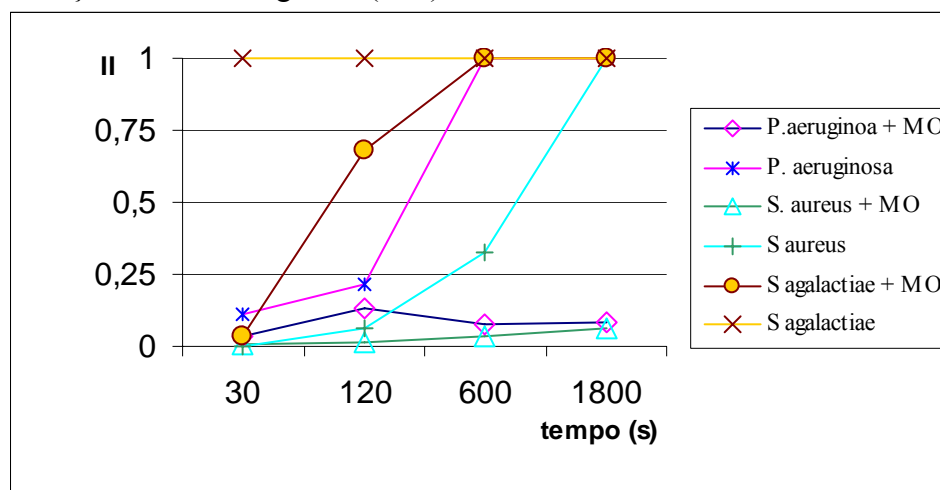
Figura 7: Cinética de inativação de três bactérias frente ao decocto de *Baccharis trimera* expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO).



EHA *Baccharis trimera*: Esta solução desinfetante apresentou ação antibacteriana sobre os três microrganismos testados, alcançando a inativação total de *S. agalactiae* em 30 segundos, *P. aeruginosa* em 10 minutos e *S. aureus* em 30 minutos (Figura 8).

Na presença de matéria orgânica, o EHA de *B. trimera* foi capaz de inativar o *S. agalactiae* em 10 minutos e reduzir a concentração de *S. aureus* em $10^{0,5}$ UFC/mL ao final do experimento. Nessas condições, esse extrato não demonstrou ação sobre a *P. aeruginosa* em 30 minutos de contato.

Figura 8: Cinética de inativação de três bactérias frente ao EHA de *Baccharis trimera* expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO).



4.3.2 Comparação da Atividade Antibacteriana

As médias do II, a significância da análise de variância e a comparação entre médias em função do padrão clorexidina a 0,55% das sete soluções desinfetantes analisadas, na presença ou ausência de matéria orgânica, estão expressas nas Tabelas 11, 12 e 13, divididas por microrganismo, respectivamente *S. agalactiae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

S. agalactiae: Na ausência de matéria orgânica, todos com exceção do decocto de *T. minuta*, apresentaram forte ação bactericida. Porém, somente os EHA não diferiram da clorexidina. Inclusive, os EHA das três plantas foram mais rápidos na inativação da bactéria do que o controle positivo.

Na presença de matéria orgânica, dois grupos distintos são formados quanto ao II. O controle e os três EHA não diferiram estatisticamente, apresentando a capacidade de inativar as mais de 10^5 UFC/mL em que estiveram em contato. O outro grupo, representado pelos decoctos das três plantas, não apresentaram ação sobre a bactéria em trinta minutos de exposição.

Tabela 11: Índice de Inibição (II)** médio das sete soluções desinfetantes sobre *S. agalactiae* em função do tempo e da presença de matéria orgânica (M.O.)

Solução Desinfetante	Presença de M.O.	Tempo				Controle Log UFC/mL
		30 s	2 min	10 min	30 min	
Clorexidina (Controle)	Não	0,343	1	1	1	6,090
	Sim	0,074	0,387	1	1	
DEC <i>Tagetes minuta</i>	Não *	0,009	0,015	0,048	0,042	5,341
	Sim *	0	0	0	0	
EHA <i>Tagetes minuta</i>	Não	1	1	1	1	5,011
	Sim	0,051	0,639	1	1	
DEC <i>Eucalyptus spp</i>	Não*	0,316	0,354	1	1	5,061
	Sim *	0,026	0,013	0,015	0,019	
EHA <i>Eucalyptus spp</i>	Não	1	1	1	1	5,315
	Sim	0,112	0,228	1	1	
DEC <i>Baccharis trimera</i>	Não*	0,094	0,299	1	1	5,025
	Sim *	0,011	0,019	0,042	0,040	
EHA <i>Baccharis trimera</i>	Não	1	1	1	1	5,097
	Sim	0,032	0,684	1	1	

Obs.: Tratamentos identificados com * diferiram do controle através do teste de Dunnett ($p < 0,05$), analisando-se separadamente a variável presença ou ausência matéria orgânica.

**II=1-[log (UFC/mL do tratamento+1) / log (UFC/mL do controle+1)]. Valores negativos foram igualados a 0.

S. aureus: O controle e os três EHA foram capazes de inativar a bactéria durante o período do experimento. Porém, o EHA de *B. trimera* assim como os três decoctos diferiram do controle. Com a adição de matéria orgânica, as soluções desinfetantes controle e EHAs demonstraram uma tendência à redução da contagem bacteriana e nenhum dos decoctos demonstrou ação antibacteriana em 30 minutos.

Tabela 12: Índice de Inibição (II) médio das sete soluções desinfetantes sobre *S. aureus* em função do tempo e da presença de matéria orgânica (M.O.).

Solução Desinfetante	Presença de M.O.	Tempo				Controle Log UFC/mL
		30 s	2 min	10 min	30 min	
Clorexidina	Não	0,139	0,678	1	1	5,279
	Sim	0,022	0,014	0,049	0,082	
DEC <i>Tagetes minuta</i>	Não *	0,012	0,005	0,014	0,015	5,705
	Sim	0,005	0,002	0,004	0,022	
EHA <i>Tagetes minuta</i>	Não	0,009	0,529	0,715	1	5,658
	Sim	0,011	0,009	0,017	0,065	
DEC <i>Eucalyptus spp</i>	Não *	0,013	0,019	0,054	0,104	5,488
	Sim	0,004	0,007	0,012	0,022	
EHA <i>Eucalyptus spp</i>	Não	0,055	0,224	1	1	5,727
	Sim	0,033	0,031	0,061	0,134	
DEC <i>Baccharis trimera</i>	Não *	0	0	0,016	0,057	5,138
	Sim	0	0	0,001	0,005	
EHA <i>Baccharis trimera</i>	Não*	0,002	0,065	0,324	1	5,392
	Sim	0,007	0,014	0,035	0,060	

Obs.: Tratamentos identificados com * diferiram do controle através do teste de Dunnett ($p < 0,05$) analisando-se separadamente a variável presença ou ausência matéria orgânica.

**II=1-[log (UFC/mL do tratamento+1) / log (UFC/mL do controle+1)]. Valores negativos foram igualados a 0.

P. aeruginosa: O controle teve rápida ação frente a essa bactéria na ausência de matéria orgânica, diferindo estatisticamente de todos os demais desinfetantes. Porém, não apresentou nenhuma ação na presença de matéria orgânica, assim como as demais soluções desinfetantes, não sendo realizada análise estatística nessas condições.

Tabela 13: Índice de Inibição (II) médio das sete soluções desinfetantes sobre *P. aeruginosa* em função do tempo e da presença de matéria orgânica (M.O.).

Solução Desinfetante	Presença de M.O.	Tempo				Controle Log UFC/mL
		30 s	2 min	10 min	30 min	
Clorexidina	Não	1	1	1	1	5,000
	Sim	0,024	0,018	0,032	0,032	
DEC <i>Tagetes minuta</i>	Não *	0,041	0,037	0,029	0,023	5,001
	Sim	0,020	0,030	0,031	0,016	
EHA <i>Tagetes minuta</i>	Não *	0	0,002	0,145	1	5,612
	Sim	0,002	0,005	0,006	0,009	
DEC <i>Eucalyptus spp</i>	Não *	0,008	0,010	0,010	0,004	5,344
	Sim	0,015	0,013	0,012	0,010	
EHA <i>Eucalyptus spp</i>	Não *	0,046	0,077	0,257	1	5,021
	Sim	0,030	0,040	0,047	0,037	
DEC <i>Baccharis trimera</i>	Não *	0,008	0	0,007	0,019	5,011
	Sim	0	0	0,011	0	
EHA <i>Baccharis trimera</i>	Não *	0,1133	0,2153	1	1	5,007
	Sim	0,032	0,135	0,076	0,086	

Obs.: Tratamentos identificados com * diferiram do controle através do teste de Dunnett ($p < 0,05$) analisando-se separadamente a variável presença ou ausência matéria orgânica.

**II=1-[log (UFC/mL do tratamento+1) / log (UFC/mL do controle+1)]. Valores negativos foram igualados a 0.

5. DISCUSSÃO

A base ética na realização deste tipo de pesquisa está bem expressa nos quatro princípios gerais de trabalho da rede de plantas medicinais do cone sul, quais sejam:

- “- rechaçar toda e qualquer forma de propriedade sobre a vida e o conhecimento;*
- compromisso com a utilização de metodologias participativas como instrumento de resgate ou geração de informação com as comunidades locais, ...;*
- compromisso de devolver as comunidades locais todos os resultados gerados pelo trabalho;*
- compromisso de trabalhar mecanismos que favoreçam a tomada de decisões a partir das comunidades locais, fomentando a descentralização das decisões e assegurar a autonomia de todas as partes envolvidas.”(PEREZ, 2004)*

O método etno-veterinário permite acumular e perpetuar conhecimentos desenvolvidos ao longo da História do homem. Além disso, permite obter informações que podem ser utilizadas pela ciência para obtenção de novos produtos e de novas tecnologias. Neste caso, podemos demonstrar a atividade antibacteriana de extratos de plantas informadas por agricultores familiares como anti-sépticos/desinfetantes.

A formação étnica do grupo de agricultores pesquisados é variada, com contribuição européia, africana e ameríndia, como a maior parte da população brasileira. Estavam assentados há aproximadamente 10 anos, a maioria originados da região alto Uruguai, noroeste do Rio Grande do Sul, e, após passar um período aproximado de 3 anos acampados, foram assentados em terra de uma antiga empresa agrícola (DA SILVA, 2005; MULLER et al. 2005).

Dessa forma, é esperado que os seus saberes tenham sido forjados na infância e juventude, a partir da cultura de seu local de emigração, e no processo de formação durante a sua peregrinação militante nos acampamentos ligados ao Movimento dos Trabalhadores Sem-Terra. Akabwai et al. (1997) entendem que a etnoveterinária é

dinâmica, sempre com o incremento de novas informações geradas localmente ou introduzidas e adaptadas localmente.

As plantas selecionadas são nativas (“picão-do-reino”, “carqueja”, “erva-de-bicho”, “picão-preto”) ou introduzidas (“eucalipto”) e apresentam referenciais na literatura para sua atividade antimicrobiana (MACHADO et al., 1988; PATTNAIK et al., 1996; TERESCHUK et al., 1997; AVANCINI et al., 1999; SOUZA et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2004; ROJAS et al., 2006).

Embora não seja uma bactéria típica de mastite contagiosa, a utilização de *P. aeruginosa* foi importante, pois é uma bactéria bastante resistente à ação de desinfetante e indicada para avaliação de sanitizantes para mastite (AUSTRALIAN PESTICIDES & VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2001). Quatro soluções desinfetantes foram capazes de inibir a bactéria (EHA *T. minuta*, *Eucalyptus* e *B. trimera* e DEC de *T. minuta*). Porém, somente o DEC de *T. minuta* foi capaz de inativar essa bactéria.

O EHA permite o armazenamento das plantas medicinais por longos períodos, tornando o seu uso independente da sazonalidade. Podemos demonstrar que os extratos EHA foram, em geral, mais ativos do que os DEC. A exceção foi o *T. minuta*, onde a habilidade do DEC em inativar as bactérias testadas foi superior, indicando que esta planta apresenta princípios ativos antibacterianos hidrossolúveis importantes para a eficácia do extrato bruto.

O processo de produção do decocto, em especial, o tempo e a quantidade de calor empregado, interfere na atividade do extrato obtido. Na prática dos agricultores informantes, são utilizados três minutos de cocção em recipiente tampado. Esse processo não pode ser utilizado na prática laboratorial, pois o índice de contaminação do sistema de avaliação “in vitro” é muito alto.

O método dos tubos múltiplos é adequado ao teste de extratos de plantas e a variação na concentração bacteriana permite avaliar a solução desinfetante frente a diferentes doses infectantes e situações-problema (AVANCINI et al., 2000). Johnston et al. (2000) chamam a atenção para o efeito da concentração do inóculo na avaliação dos desinfetantes. A diferença de 1 log resultou numa diferença muito significativa na interpretação do teste. O autor conclui que o nível de desinfecção alcançado pelo biocida está em função linear com a quantidade de inóculo e não uma função logarítmica, provavelmente devido a neutralização intrínseca do desinfetante pelo microrganismo. A dose de inóculo utilizada nos testes “in vitro” é muito superior ao que se encontra na natureza.

A adaptação à micro-técnica manteve a reprodutibilidade da técnica, economizando tempo e material para a sua realização, como preconizam outros pesquisadores (RIOS, 1988; SAHIN et al. 2003; SCHILACCI et al., 2003). Moraes (2006) comparou a micro-técnica com a técnica em tubos para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais e concluiu que esse método é mais sensível que em tubos, além de ser mais apropriado, pois requer pequenas quantidades de extrato.

Uma solução desinfetante deve ser adequada às situações problema na qual será empregada. Para ser utilizada na desinfecção de tetos na rotina de ordenha de bovinos, deve ser eficaz sobre os agentes envolvidos na mastite, com o tempo de ação compatível com o manejo a que os animais são submetidos e com pouca suscetibilidade aos fatores intervenientes como presença de matéria orgânica, pH e suporte. Além disso, não deve possuir efeito colateral sobre a pele do animal e não deixar resíduos no leite. Por outro lado, efeitos deletérios sobre a pele e a mucosa dos tetos pode favorecer a instalação de novas infecções intra-mamárias. Em geral, a concentração eficaz dos desinfetantes tradicionais é muito próxima a sua dose lesiva as estruturas de superfície do teto (BODDIE et al., 1997, OURA et al. 2002; PEDRINI & MARGATHO, 2003).

A desinfecção de tetos é uma prática incorporada na rotina de ordenha, sendo importante para o controle de mastite. Na fisiologia do úbere, o esfíncter do teto relaxa para a extração do leite devido à descarga de ocitoxina liberada quando o animal é estimulado e permanece relaxado em torno de 30 minutos após (SCHALM et al, 1971). A rapidez do efeito antibacteriano da solução empregada é essencial, pois o tempo de contato do desinfetante com o microrganismo no ambiente do teto é curto. O efeito comparável frente às bactérias Gram positivas, *S. aureus* e *S. agalactiae*, de algumas das soluções desinfetantes utilizadas quando comparadas ao produto comercial, dá suporte a indicação etnográfica de uso como desinfetantes/anti-séptico.

Neste trabalho optamos por utilizar a clorexidina como padrão para comparação com os extratos naturais. Esse biocida é uma biguanida de baixa toxicidade largamente utilizado como anti-séptico para pele e em produtos orais. Ela atua rompendo as membranas internas da célula e coagulando o citoplasma celular (McDONNELL & RUSSELL, 1999). Apesar das suas vantagens, a atividade da clorexidina sofre efeito do pH e da presença de matéria orgânica (RUSSELL & DAY, 1993).

Relatos da literatura para clorexidina em mastite têm sido contraditórios. Laroque et al. (1992) relata boa eficácia do acetato de clorexidina já aos 30 segundos de contato frente a *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*. Murdough & Pankey (1993) encontraram que 67% de 15 formulações comerciais desse desinfetante foram efetivas contra *S. agalactiae*, 9 destas foram efetivas frente a *S. aureus* e somente 17% dessas últimas foram efetivas contra *E. coli*. Nossos resultados cumprem com a expectativa expressa pelo fabricante do produto que indica que “o tempo de efeito eficaz é obtido a partir de 5 minutos” (Clorexidina – Cetrimida, Chemitec).

Nas condições deste trabalho, todas as soluções desinfetantes, inclusive o controle, apresentaram-se sensíveis à presença de matéria orgânica a 20%. Alguns autores descrevem boa atividade da clorexidina na presença de baixas concentrações de matéria orgânica (albumina sérica de bovino a 0,5%) (SASSONE et al., 2003). Sendo o leite integral a principal matéria orgânica que pode contaminar a solução desinfetante na situação-problema mastite bovina, parece importante que desinfetantes indicados para esses casos sejam avaliados na presença de leite integral.

Diferentes técnicas tem sido utilizadas para avaliar a atividade anti-séptica de produtos para mastite. Murdough & Pankey (1993) utilizaram a técnica de exposição do tecido do teto “in vitro” a solução desinfetante. Outros autores tem utilizado esta mesma técnica (BODDIE et al., 2002). Sears et al. (1992) e Peters et al. (2000) avaliaram a ação desinfetante na pele de tetos de animais vivos, através da contaminação do tetos com as soluções bacterianas a testar. Da mesma forma, avaliação da atividade antibacteriana de substâncias pode ser feita sem a utilização de tecido animal (LAROCQUE et al, 1992; LAMBERT et al., 1999). De uma forma geral, essas técnicas utilizam um inóculo de entre 10^{7-9} UFC/mL do microrganismo a testar, inoculado em uma proporção de 1:100 na solução desinfetante, com tempo mínimo de 30 segundos de avaliação, utilizando um agente neutralizante para parar a atividade do desinfetante e um método de quantificação que pode ser plaqueamento, membrana filtrante ou absorbância através de espectrofotometria (SEARS et al., 1992). A partir dessas premissas, montou-se a metodologia do teste de cinética de atividade das soluções desinfetantes nesse experimento, utilizando o plaqueamento e posterior contagem de UFC como leitura.

Há diferentes formas de expressão do resultado obtido nos trabalhos de cinética de atividade dos desinfetantes. Sears et al. (1992) utilizaram a diferença dos logaritmos de tetos expostos ao anti-séptico e não expostos como variável dependente.

Da mesma forma, Lambert et al. (1999) expressaram a variável dependente de seus experimentos com desinfetantes como o negativo do logaritmo da razão da amostra sob efeito do desinfetante e da amostra controle multiplicado, chamado CW. Nós optamos por transformar todos os dados em logaritmo e, após, calcular a razão da amostra submetida ao tratamento pelo controle e expressá-los como o valor restante para 1. Esse formato expressa o máximo efeito (nenhum microrganismo recuperado no plaqueamento) pelo valor 1, independente da variação do título do inóculo e permite a visualização comparativa mais clara entre os resultados (Figuras 2-9). Para confirmar a acurácia do método de cálculo, o resultado assim calculado foi comparado ao CW obtendo-se o coeficiente de correlação de Pearson $r=0,98$, considerada correlação muito forte (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

A transferência da informação obtida em experimentos “in vitro” para o seu “in vivo” precisa ser realizada com reservas. Diversos fatores controlados em condições laboratoriais são multivariados nas situações-problemas que se apresentam. Condições ambientais como temperatura e pH são determinantes para a eficácia do processo de anti-sepsia/desinfecção (McDONNELL & RUSSEL, 1999). O efeito de proteção de suportes onde o microrganismo adere tem sido claramente demonstrado (SCHLIESSER & STRAUCH, 1981; WIEST et al., 1982/83).

Condições inerentes aos microrganismos como a formação de biofilmes, restrição de nutrientes ou nível de crescimento interferem na resistência/suscetibilidade dos microrganismos. A fase estacionária da cultura bacteriana aumenta a sua resistência antimicrobiana, assim como o estresse de restrição de nutrientes, condições essas, esperadas a que bactérias em vida livre estejam submetidos (GILBERT et al. 1990). Em geral, as condições de realização dos testes antimicrobianos em laboratório seguem protocolos em que os microrganismos são cultivados em meios ricos e utilizados na sua fase exponencial, como foi o caso desse trabalho.

O biofilme é a multiplicação de bactérias em comunidades uni ou multi-espécie sobre superfícies (WEBB et al. 2003). Diversos mecanismos são implicados no aumentada resistência aos agentes antimicrobianos em biofilmes, entre eles a depleção de nutrientes, reduzido acesso do biocida as células do biofilme, interação química entre o biofilme e o biocida e a produção de enzimas ou químicos neutralizantes (BROWN & GILBERT, 1993; McDONNELL & RUSSELL, 1999; DRENKARD, 2003). Stickler et al (2002) demonstraram a resistência de bactérias Gram negativas em cateteres a

concentrações geralmente eficazes de clorexidina e iodo-povidina. Essa resistência pode chegar a 1000x maior que a bactéria isolada (NICKEL et al., 1985).

LeChevallier et al. (1987) demonstrou a variação da atividade de desinfetante a base de cloro a diferentes condições experimentais. Suporte, biofilme, idade do biofilme, encapsulação e efeito nutriente foram diretamente relacionados à eficácia do desinfetante.

Gilbert & McBain (2003) afirmam que a concentração inibitória ou bactericida mínima não é um valor fixo, mas reflete a adaptação da célula a um ambiente físico-químico específico. Não existem relatos do comportamento de extratos de plantas medicinais frente a microrganismos nessas condições adversas. Além disso, devido à composição química múltipla desses extratos, outros mecanismos de ação devem atuar quando são utilizados como anti-sépticos, por exemplo atividade imunomodulatória e antiinflamatória que concorrem para sua ação “in vivo”. Assim, avaliações em condições práticas dessa situação-problema precisam ser feitas para que se possa inferir sobre os efeitos benéficos ou não do uso deste tipo de desinfetantes/anti-sépticos na rotina de ordenha em bovinos.

Fenner et al. (2006) com base na bibliografia etnofarmacológica brasileira compuseram uma lista com 409 espécies de plantas com potencial antifúngico. Neste rol, encontram-se *B. trimera*, *Eucalyptus sp.*, *B. pilosa* e erva-de-bicho, referida somente como *P. acre*.

Em um estudo na Índia, Shahi et al. (1999) obtiveram a inativação de dermatófitos de interesse em 15-20s com óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* puro, enquanto que na concentração fungicida mínima o tempo necessário foi em torno de 4-6 horas, dependendo da espécie de dermatófito avaliada. Os autores concluem que o óleo de eucalipto é custo efetivo e não apresenta efeitos adversos. Vijayakumar et al. (2006) encontraram resultados semelhantes com óleo de *Eucalyptus globulus* frente a *Malassezia furfur*.

Feresin et al., (2001) encontraram atividade de extratos hexânicos de *B. grisebachii* frente a dermatófitos. No entanto, não encontraram nenhuma atividade do extrato metanólico. Prestes (2006) demonstrou CIM média de extratos etanólico, óleo e decocto de *Thymus vulgaris* de 20,83%, 81,25% e 0,875%, respectivamente, e *Origanum vulgare* de 6,83%, 0,96% e 57,25%, para cada uma das três formas de extração.

Como afirmam Araújo et al. (2005), o tratamento antifúngico convencional apresenta dificuldades relacionadas à toxicidade, especialmente em pacientes

imunodeprimidos. A fitoterapia pode representar novos – tradicionais métodos de atuação frente a esta situação. Nossos resultados estimulam a utilização de EHA em medidas de controle de dermatofitose como, por exemplo, a inclusão destes extratos em sabões, para aspersão em animais ou outros produtos de higiene pessoal.

6. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais utilizadas neste trabalho podemos concluir que:

- As plantas avaliadas (*Baccharis* grupo *trimera*, *Bidens pilosa*, *Eucalyptus* sp., *Polygonum punctatum*, *Tagetes minuta*), resgatadas de experiências de vida de agricultores assentados da reforma agrária, apresentam componentes antimicrobianos que podem ser extraídos por solvente aquoso ou etanólico com atividade frente a bactérias relacionadas à mastite contagiosa (*Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Streptococcus* spp), com exceção dos extratos de *P. punctatum* e o decocto de *Eucalyptus*. Aquelas plantas poderão vir a ser utilizadas em desinfecção/anti-sepsia em situações-problemas em que tais agentes bacterianos estejam envolvidos.

- No modelo experimental utilizado, obtivemos extratos naturais (extrato hidralcoólico *Eucalyptus* spp., extrato hidralcoólico *T. minuta* e extrato hidralcoólico *B. trimera*) que apresentaram atividade antibacteriana frente a microrganismos Gram positivos, os dois primeiros estatisticamente semelhante ao controle comercial clorexidina à 0,18% ($p > 0,05$). Estes resultados habilitam estas soluções desinfetantes a testes clínicos de uso na rotina de ordenha de gado de leite.

- Os extratos hidralcoólicos das plantas testadas (*B. trimera*, *B. pilosa*, *Eucalyptus* spp, *P. punctatum* e *T. minuta*) apresentaram atividade antifúngica frente a dermatófitos de interesse na saúde animal e humana com Concentração Inibitória Mínima média entre 5-19%, enquanto que somente os decoctos de *P. punctatum* e *T. minuta* apresentaram atividade antifúngica.

REFERÊNCIAS

- ABAIÑEH, D. & SINTAYEHU, A. Treatment trial of subclinical mastitis with the herb *Persicaria senegalense* (Polygonaceae). **Tropic. Anim. Health Prod.**, Edinburgh, v. 33, p. 511-519. 2001.
- ADORNES, R.; ESTIMA, E.; LADEIRA, S.L.; MARTINS, L.; SANTIAGO, V. Mastite e brucelose na bacia leiteira de Rio Grande, RS. In: Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianópolis, SC. 1995. p. 129.
- AKABWAY, D.; LEYLAND, T.; STEM, C. Provision of sustainable animal health delivery systems, which incorporate traditional livestock knowledge, to marginalized pastoralist areas. In: Ethnoveterinary Medicine: alternatives for livestock development. Proceedings of an International Conference held in Pune, India, v. 1, parte 4: Application of ethnoveterinary medicine. BAIF Development Research Foundation, Pune, India. 1997.
- AKERELE, O. Medicinal plants and primary health care: an agenda for action. **Fitoterapia**, Milano, v. 59, p. 355-363. 1988.
- ALBUQUERQUE, J.M. **Plantas medicinais de uso popular**. ABEAS/MEC, Brasília. 1989. 96 p.
- ALMEIDA, L.A.B.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PIRES, M.F.A.; BENITES, N.R. Tratamento de mastite clínica experimental por meio de ordenhas múltiplas em vacas leiteiras inoculadas com *Staphylococcus aureus*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, p. 1-6. 2005.
- ALMEIDA, R. M. A.; BIANCHI, M. Dermatófitos isolados de material clínico de cães, gatos e bovinos, provenientes do hospital veterinária da fundação Pinhalense de ensino, no período de 1995 a 1996. In: Anais do II Congresso de medicina veterinária do cone sul, CONBRAVET, Gramado (Brasil), 1997.
- ALTIERI, M. **Agroecology. The scientific basis of alternative agriculture.**: Westview Press, Boulder, Co. 1987. p. 210.
- ALVES, T.M.A.; RIBEIRO, F.L.; KLOOS, H.; ZANI, C.L. Polygodial, the fungitoxic component from the brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 831-833. 2001.
- AMARAL, L.A.; ISA, H.; DIAS, L.T.; ROSSI JR, O.D.; NADER FILHO, A. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 173-177. 2004.
- ANÔNIMO (Equipe CET-SUR). **Los efectos sociales de los enfoques de regulación sobre las plantas medicinales**. In: PÉREZ, I. O. Desde dónde hablan los saberes locales? Sustentabilidad, conservación, y conocimiento de la flora medicinal del cono sur. Editorial Virtual, Temuco, Chile. 2004.

ANÔNIMO. **Eucalyptus sp.** Disponível em:
<http://www.ansci.cornell.edu/plants/medicinal/eucalyp.html>. Acesso em: 07/01/2007.

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

ARAÚJO, C.R.F.; PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, J.V.; MARTINS, A.B. Atividade antifúngica in vitro da casca o *Anacardium occidentale* LINN. sobre leveduras do gênero *Candida*. **Arq. Odontol.**, Belo Horizonte, v. 41, p. 263-270. 2005

AUSTRALIAN PESTICIDES & VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, interim guidelines for data to support efficacy and safety of teat sanitizers. Disponível em: http://www.apvma.gov.au/guidelines/teat_sanitisers.shtml (2001). Acesso em 07/01/2007.

AVANCINI, C.A.M. Saneamento aplicado em saúde e produção animal: Etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Schlecht – Hyperiaceae (Guttiferae) – (“escadinha”/“sinapismo”) para uso como desinfetante e anti-séptico. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária – UFRGS. 2002. 299 p.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; IRGANG, B.; ALMEIDA, J.P.; MUNDSTOCK, E.C. Atividade biológica do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Schlecht. Hyperiaceae (Guttiferae)- escadinha/sinapismo- sobre bactérias de interesse na área de medicina veterinária. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 32, p. 237-245. 2002.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zoot.**, Belo Horizonte, v. 52, p. 230-234. 2000.

BALBACHAS, A. **As plantas curam**. Ed. Missionária “A verdade presente”, São Paulo. 1963. 438 p.

BARKER, A.R.; SCHRICK, F.N.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 81, p. 1285-1290. 1998.

BARROS, G.M.S.; JESUS, N.M.; SILVA, M.H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo c, comercializado na cidade de Salvador. **Rev. Bras. Saúde e Prod. Anim.**, Salvador, v. 2, p. 69-73. 2001.

BARTLETT, P.C. VAN WIJK, J.; WILSON, D.J. Milk production and somatic cell count in Michigan dairy herds. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 74, p. 1561-1572. 1991a.

BARTLETT, P.C.; VAN WIJK, J.; WILSON, D.J.; GREEN, C.D. MILLER, G.Y.; MAJEWSKI, G.A.; HEIDER, L.E. Temporal patterns of lost milk production

- following clinical mastitis in a large Michigan Holstein Herd. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 74, p. 1561-1572. 1991b.
- BEDIN, C., WALD, V. B., WIEST, J. M. Atividade antibacteriana in vitro do decocto de *Origanum applii* (Domin.) Boros - Labiatae (orégano, manjerona) sobre agentes de interesse em alimentos. **Arq. Faculd. Vet. UFRGS.**, Porto Alegre, v. 26, n.02, p.113 – 115. 1998.
- BENITES, N.R.; GUERRA, J.L.; MELVILLE, P.A.; da COSTA, E.O. Aetiology and histopathology of bovine mastitis of spontaneous occurrence. **J. Vet. Med. B**, Berlin, v. 49, p. 366-370. 2002.
- BERRY, E.A.; HILLERTON, J.E. The effect o an intramammary teat seal on new intramammary infection. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 85, p. 2512-2520. 2002.
- BII, C.C.; SIBOE, G.M.; MIBEY, R.K. Plant essential oils with promising antifungal activity. **East Afr. Med. J.**, Nairobi, v. 77, p. 319-322. 2000.
- BODDIE, R.L.; NICKERSON, S.C.; ADKINSON, R.W. Efficacies of teat germicides containing 0,5% chlorhexidine and 1% iodine during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 80, p. 2808-2814. 1997.
- BODDIE, R.L.; OWENS, W.E.; RAY, C.H.; NICKERSON, S.C.; BODDIE, N.T. Germicidal activities of representatives of five different teat dip classes against three bovine Mycoplams species using a modified excised teat model. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 85, p. 1909-1912. 2002.
- BODDIE; R.L.; WATTS, J.L.; NICKERSON, S.C. In vitro and in vivo evaluation of a 0,5% chlorhexidine gluconate teat dip. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Philadelphia, v. 196, p. 890-893. 1990.
- BORAL, D.; CHATTERJEE, S.; BHATTACHARYA, K. The occurrence and allergising potential of airborne pollen in west bengal, india. **Ann Agric Environ Med**, Lublin, v. 11, p. 45–52. 2004.
- BORTOLLINI, R.; GONÇALVES, A.R., GIROLLOMETTO, G.; WIEST, J.M. Concentrações inibitórias e bactericidas mínimas de *Cuphea mesostomom* Koehne (sete sangrias, guanxuma vermelha, erva de sangue) na perspectiva da desinfecção/anti-sepsia em saúde e produção animal na agroindústria familiar. In XV salão de iniciação Científica da UFRGS, 2003.
- BRAMLEY, A.; DODD, F. Reviews of the progress of dairy science: Mastitis control – progress and prospects. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 51, p.481-512. 1984.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 17 de 24/02/2000. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showact.php>. Acesso em: 07/01/2007.
- BRASIL, Presidência da República, MP 2.186-16 de 23 de agosto de 2001 – Regulamenta o Inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição, os arts. 1º, 8º alínea “j”, 10, alínea “c”, 15 e 16, alíneas 3 e 4 da Convenção sobre Diversidade

Biológica, dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. <http://www.planalto.gov.br/ccivil/MPV/2186-16.htm>, acesso em 25/01/2007.

BRASIL, Presidência da República, Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006 – Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, nº 119, seção 1. http://portalweb05.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/decreto_5813_fito.pdf. Acesso em: 07/01/2007.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T.; VEIGA, V.M.O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 51, p. . 1999.

BROWN, M.R.W. & GILBERT, P. Sensivity of biofilms to antimicrobial agents. **J. Appl. Microbiol.**, Washington, v. 74, p. 87S-97S. 1993.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M.; CUNHA, L.M. Macro and microscopical identification of four species of *Baccharis* from trimera group. **Rev. Bras. Farmacogn.**, Curitiba, v. 14, p. 42-43. 2003.

BUENO, N.R.; CASTILHO, R.O.; DA COSTA, R.B.; POTT, A.; POTT, V.J.; SCHEIDT, G.N.; BATISTA, M.S. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, v. 19, p. 39-44. 2005.

BURMEISTER, J.E.; FOX, L.K.; HILLERS, J.K.; HANCOCK, D.D. Effects of premilking and postmilking teat disinfectants on teat skin condiction. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 81, p. 1910-1916. 1998.

BUSATO, A.; TRACHSEL, P.; SCHALLIBAUM, M.; BLUM, J.W. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. **Prev. Vet. Medic.**, Amsterdam, v. 44, p. 205-220. 2000.

CABANES, F. J.; ABARCA, A. M. A. L.; BRAGULAT, M. A. R. Dermatophytes isolated from domestic animal in Barcelona, Spain. **Mycopathologia**, The Hague, v. 137, p. 107-113, 1997.

CABANES, F. J. Dermatofitosis Animales recientes avances. **Rev. Iberoameric. Micol.**, Barcelona, v. 17, p. 08-12, 2000.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciênc. & Cult.**, Campinas, v. 55, p. 37-39. 2003.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística. Princípios e aplicações**. Porto Alegre: ArtMed, 2003. v. 1. 255 p.

CAMPOS, E.P. Qualidade microbiológica , físico-química e pesquisa de resíduos de antibióticos e pesticidas no leite produzido pelo sistema convencional e pelo sistema

orgânico. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu. 2004, 58f.

CAPORAL, F. R. & COSTABEBER, J.A. Agroecologia. Enfoque científico e estratégico. **Agroecol. e Desenv. Rur. Sustent.**, Porto Alegre, v. 3, p. 13-16. 2002.

CAPORAL, F.R. & COSTABEBER, J.A. Agroecologia: conceitos e princípios para a construção de estilos de agriculturas sustentáveis. 2004. <http://www.planetaorganico.com.br/trabCaporalCostabeber.htm>. Acesso: 05/03/2007.

CARABALLO, A.; CARABALLO, B.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan Amazon. **Rev. Soc. Bras. Medic. Tropic.**, Brasília, v.37, p. 186-188. 2004.

CARVALHO, A.F.; COSTA, C.; NOVAES, D.M.; PINTO, M.P.A.; AROUCA, N.E. Agricultura urbana: alternativa de segurança alimentar e geração de renda, Viçosa, MG. Anais do 2^o Congresso Brasileiro de Extensão Rural, Belo Horizonte. 2004.

CARVALHO, H.H.C. Avaliação da atividade antibacteriana de plantas com indicativo etnográfico condimentar. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias / UFRGS, Porto Alegre. 2004. 200p.

CARVALHO, H.H.C.; CRUZ, F.T.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS, Brasil. **Rev. Bras. Plant. Medic.**, Botucatu, v. 7, p. 25-32. 2005.

CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik**. Stuttgart : Gustav Fischer Verlag, 1974. 145p.

CERDEIRAS, M.P.; FERNANDEZ, J.; SOUBES, M.; VERO, S.; FERREIRA, F.; MOYNA, P.; OLANO, I.; VÁZQUEZ, A. A new antibacterial compound from *Ibicella lútea*. **J. of Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 73, p. 521-525. 2000.

CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W.M.; PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; FORTES, I.C.P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus spp* em *Boophilus microplus*. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 39, p. 247-253. 2002.

CHALCHAT, J.C.; CHABARD, J.L.; GORUNOVIC, M.S.; DJERMANOVIC, V.; BULATOVIC, V.. Chemical composition of Eucalyptus globulus oils from the Montenegro coast and east coast of Spain. **J. Essent. Oil Res.**, Carol Stream, v. 7, p. 147-152. 1995.

CHALCHAT, J.C.; MUHAYIMANA, A.; HABIMANA, J.B.; CHABARD, J.L.. Aromatic plants of Rwanda. II. Chemical composition of essential oils of ten Eucalyptus species growing in Ruhande Arboretum, Butare, Rwanda. **J. Essent. Oil Res.**, Carol Stream, v. 9, p. 159-165. 1997.

CHIANG, L.C.; CHANG, J.S.; CHEN, C.C.; NG, L.T.; LIN, C.C. Anti-Herpes simplex virus activity of *Bidens pilosa* and *Houttunya cordata*. **Am. J. Chin. Med.**, Garden city, v. 31, p. 355-362. 2003.

COBOS, C.M.I.; RODRIGUEZ, J.L.; OLIVA, M.L.; DEMO, M.; FAILACCI, S.M.; ZYGADLO, J.A.. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserghila*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 67, p. 84-86. 2001.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.P.S.; von POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J. of Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 90, p. 135-143. 2004.

Conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo. **Systems and National Experiences for Protecting Traditional Knowledge, Innovations and Practices. Background Note by the UNCTAD Secretariat**. Genebra, Conferencias de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo, 2000 (documento de referencia TD/B/COM.1/EM.13/2).

CORDAZZO, C.V. & SEELIGER, U. **Guia ilustrado da vegetação costeira do extremo sul do Brasil**. Ed. FURG, Rio Grande, RS. 1988. 275 pp.

COTA, B.B.; OLIVEIRA, A.B.; SOUZA FILHO, J.D.; BRAGA, F.C. Antimicrobial activity and constituents of *Coccoloba acrostichoides*. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, p. 729-731. 2003.

CUNHA, A.P. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia. www.esalq.usp.br/siesalq/aspectos_historicos.pdf. 2003. Obtido em 27/12/2006.

COSTA, E. O. ; COSTA, E. O. ; BENITES, N. R. ; MELVILLE, P. A. ; PARDO, R. B. ; RIBEIRO, A. R. ; WATANABE, E. T. . Estudo etiológico da mastite clínica bovina.. **Rev. Bras. de Méd. Vet.**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 156-158, 1995.

CURRÁS, E. Aproximación sistêmica a la integración vertical de las ciencias. **Documentación de las Ciencias de la Información**, Madrid, v. 17, p 27-37. 1994.

da SILVA, P.L. Potencialidades e limites na produção de leite ecológico na Cooperativa e Produção Agropecuária Vista Alegre Piratini Ltda (COOPAVA). Monografia de conclusão de Curso de ensino médio na modalidade de educação jovens e adultos, ITERRA, Viamão. 2005. 19p.

DARBENE, T., COMINOS, B., LEE, C.T. Topical eucalyptus oil poisoning. **Australas. J. Dermatol.**, Sidney, v. 39, p. 265-267. 1998.

DATTA, B.K.; DATTA, S.K.; RASHID, M.A.; NASH, R.J.; SARKER, S.D. Asesquiterpene acid and flavonóides from *Polygonum viscosum*. **Phytochemistry**, New York, v. 54, p. 201-205. 2000.

DAY; L.M.; OZANNE-SMITH J.; PARSONS, B.J.; DOBBIN, M.; TIBBALLS, J. Eucalyptus oil poisoning among young children: mechanisms of access and the potential for prevention. **Aust. N. Z. J. Public Health.**, Melbourne, v. 21, p. 297-302. 1997.

- DECLARAÇÃO DE ADELAIDE. Segunda Conferência Internacional sobre Promoção à saúde. Adelaide, Austrália. 1988.
www.opas.org.br/coletiva/uploadArq/Adelaide.pdf. Acesso: em 07/01/2007.
- DECLARAÇÃO DE ALMA ATA. Conferência Internacional sobre Cuidados Primários em Saúde, Alma-Ata, URSS. 1978.
www.opas.org.br/coletiva/uploadArq/Alma-Ata.pdf. Acesso: em 07/01/2007.
- DEGRAVES, F.J.; FETROW, J. Economics of mastitis and mastitis control. **Vet. Clin. North Amer.: Food Anim. Pract.**, Philadelphia, v. 9, p. 421-434. 1993.
- DEL PALACIO A., GARAU M., CUÉTARA M.S. Current treatment of dermatophytosis. **Rev. Iberoameric. Micol.**, v. 19, p. 68-71, 2002.
- DEL VITTO, L.A.; PETENATTI, E.M.; PETENATTI, M.E. Recursos herbolários de San Luis (Argentina). Segunda parte: Plantas exóticas cultivadas, adventícias y/o naturalizadas. **Multequina**, Mendoza, v. 7, p. 29-48. 1998.
- DE MAAR, T.W. Qué contienen esas botellas? **CERES**, New York. v.136, p. 40-45. 1992.
- DICKEL, M.L.; RATES, S.M.K.; RITTER, M.R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, south Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 109, p. 60-71. 2006.
- DIECKMANN, A. M.; QUEVEDO, A. C.; RIBEIRO. V, L.; NOBRE, M. C. Isolation of dermatophytes from healthy dogs and cats from Niteroi, RJ, Brazil. **Rev Bras. Ciência Vet.**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 93-94, 1998.
- DIXON, R.A. Natural aspects and plants disease resistance. **Nature**, London, v. 411, p. 843-847. 2001.
- DOMINGO, D & LÓPEZ-BREA, M.L. Plantas con acción antimicrobiana. **Rev. Esp. Quimioterap.**, Barcelona, v. 16, p. 385-393. 2003.
- DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomona aeruginosa* biofilms. **Microbes and Infect.**, Paris, v. 5, p. 1213-1219. 2003.
- DVG, DEUTSCHE VETERINARMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT (Sociedade Alemã de Medicina Veterinária). **Richtlinie zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin** [Normas para os testes de desinfetantes químicos destinados à Medicina Veterinária]. Giessen, Alemanha Ocidental, 1977. p.47-55.
- EICHENBERG, M. L. ; BERG., Vanessa ; APPELT, C. E. ; MUSCHNER, A C ; NOBRE, M O ; MATTA, D. ; HARTZ ALVES, S H ; FERREIRO, L. . Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to Azole antifungals agents evaluated by a new Microdilution Method. **Acta Scientiae Veterinariae** (Online), Porto Alegre, v. 31, p. 75-80. 2003.

- EKMAN, T. Tratamiento y control de la mastitis en los países nórdicos. In: Proceedings of X Congresso Latinoamericano de Buiatria, Montevideo, Uruguay. 2002. p. 26-29.
- ELISABETSKY, E. & SOUZA, G.C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; de MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed da UFRGS/Ed. da UFSC. 2003. pp. 107-122.
- ERB, H.N.; SMITH, R.D.; OLTENACU, P.A. Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 68, p. 3337-3349. 1985.
- ESPIGARES, E.; BUENO, A.; FERNÁNDEZ-CREHUET, M.; ESPIGARES, M. Efficacy of some neutralizers in suspension tests determining the activity of disinfectants. **J. Hosp. Infect.**, New York, v. 55, p. 137-140. 2003.
- FAGUNDES, H. **Dissertação de mestrado**: Ocorrência de resíduos de antimicrobianos utilizados no tratamento de interrupção de lactação no início da lactação subsequente em animais com período seco recomendado. São Paulo: USP, Faculdade de Zootecnia, PPG em Zootecnia, área de concentração: Qualidade e produtividade animal. 2003. 76 p.
- FARIAS, N.A.R., dos SANTOS, T.R.B.; SCHUCH, L.F.D. Relatório de projeto de pesquisa “Implantação de novas tecnologias para a produção de leite ecológico”. Proc. N^o 00/2648.5, FAPERGS, Porto Alegre – RS. 2003.
- FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959.
- FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Rev. Bras. Cienc. Farmaceut.**, Araruama, v. 42, p. 369-394. 2006.
- FERESIN, G.E.; TAPIA, A.; GIMENEZ, A.; RAVELO, A.G.; ZACCHINO, S.; SORTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Constituents of the Argentinian medicinal plants *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. **J. of Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 89, p. 73-80. 2003.
- FERESIN, G.E.; TAPIA, A.; LÓPEZ, S.N.; ZACCHINO, S.A. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentina. **J. of Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 78, p. 103-107. 2001
- FERNANDEZ, X.S. ; GARCIA, D.D. Desenvolvimento rural sustentável: uma perspectiva agroecológica. **Agroecol. e Desenv. Rural Sustent.**, Porto Alegre, v. 3, n. 2, p. 17-25. 2001.
- FERREIRO, L.; FERREIRO, C.L.R.; BANGEL JR., J.J.; SOAES, H.C.; MOOJEN, V.; FERNANDES, J.C.T. Mastite bovina na grande Porto Alegre, RS – Brasil. 1. Agentes etiológicos isolados durante o período 1982 – 1985. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 31, p. 81-88. 1985.

FERREIRO L., FERREIRO C.L.R., SOARES H.C. Etiologia das dermatomicoses de animais domésticos, com especial ênfase nas dermatofitoses. Levantamento durante um período de três anos (1979-1982) no Laboratório de Doenças Infecciosas, da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 10, p. 85-92. 1983.

FOX, L.K. & GAY, J.M. Contagious mastitis. **Vet. Clin. North Amer.: Food Anim. Pract.**, Philadelphia, v. 9, p. 475-487. 1993.

FOX, L.K.; GRADLE, C.; DEE, A. Short communication: disinfectant containing a complex of skin. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 89, p. 2539-2541. 2006.

FRANCO, I.J. & FONTANA, V.L. **Ervas & plantas: a medicina dos simples**. 9^o Ed., Livraria Vida LTDA, Erechim, RS. 2004. 208 pp.

FUCK, S.B.; ATHANÁZIO, J.C.; LIM, C.B.; MING, L.C. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por moradores da área urbana de Bandeirantes, Pr, Brasil. **Semina: Cienc. Agr.**, Londrina, v. 27, p. 291-296. 2005.

GAMBALE, W.; LARSSON, C.E.; MORITAMI, M.M.; CORRÊA, B.; PAULA, C.R.; FRAMIL, V.M.S. Dermatophytes and other fungi of the haircoat of cats without dermatophytosis in the city of São Paulo, Brazil. **Feline Pract.-Fung. Parasitol.**, Santa Barbara, v. 21, p. 29-33, 1993.

GEISSBERGER, P.; SEQUIN, I.L. Constituents of *Bidens pilosa* L.: do the constituents found so far explain the use of this plant in traditional medicine? **Acta Trop.**, Amsterdam, v. 48, p.251-261. 1991.

GENE, R.M.; CARTANA, C.; ADZET, T.; MARTIN, E.; PARELLA, T.; CANIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 62, p. 232-235. 1996.

GHOTGE, N.S.; RAMDAS, S.R.; ASHALATA, S.; MATHUR, N.P.; BROOME, V.G.; SANYASI RAO, M.L. A social approach to the validation of traditional veterinary remedies – The Anthra project. **Tropic. Anim. Health Prod.**, Edinburgh, v. 34, p. 121-143. 2002.

GIL, R.; HOWARD, W.H.; LESLIE, K.E.; LISSEMORE, K. Economics of mastitis control. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 73, p. 3340-3348. 1990.

GILBERT, P. COLLIER, P.J.; BROWN, M.R.W. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 34, p. 1865-1868. 1990.

GILBERT, P. & MCBAIN, A.J. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotics resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 16, p. 189-208. 2003.

GOMES, F.R.; CARDOSO, C.M.; SILVA, V.S.; LADEIRA, S.L. Principais agentes etiológicos de mastite na bacia leiteira de Pelotas. V Congresso de Iniciação Científica, UFPEL, UCPEL e FURG, Rio Grande. 1996. In: Anais p. 172.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, p. 353-358. 2005.

GUARRERA, P.M.; SALERNO, G.; CANEVA, G. Folk phytotherapeutic plants from Maratea area (Basilicata, Italy). **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 99, p. 367-278. 2005.

GUERRA, M.P. & NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; de MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^a Ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed da UFRGS/Ed. da UFSC. 2003. pp. 13-29.

HAUSEN, B.M. & HELMKE, B. Butenylbithiophene, alpha-terthienyl and hydroxytremetone as contact allergens in cultivars of marigold (*Tagetes* sp.). **Contact Dermatitis.**, Copenhagen, v. 33, p. 33-37. 1995.

Health Canada. **Perspectives on Complementary and Alternative Health Care. A collection of papers Prepared for Health Canada**. Ottawa, Health Canada, 2001.

HEDGE, V.R.; PU, H.; PATEL, M.; BLACK, T.; SORIANO, A.; ZHAO, W.; GULLO, V.P.; CHAN, T.M. Two new bacterial DNA primase inhibitors from the plant *Polygonum cuspidatum*. **Bioorg. & Medic. Chem. Lett.**, Oxford, v. 14, p. 2275-2277. 2004.

HILLERTON, J.E. & BERRY, E.A. Decision tree analysis to evaluate dry cow strategies. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 71, p. 409-418. 2004.

HILLERTON, J.E. & BERRY, E.A. Treating mastitis cow – a tradition or an archaism. **J. of Applied Microbiol.**, Washington, v. 98, p. 1250-1255. 2005.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1027-1031. 2002.

HORN, J.S. **Medicina chinesa: A experiência para milhões**. Ed. Civilização Brasileira, Rio de Janeiro. 1969. 280 p.

HOU, A.; LIU, Y.Z.; YANG, H.; LIN, Z.W.; SUN, H.D. Hydrolyzable tannins and related polyphenols from *Eucalyptus globules*. **J. Asian Nat. Prod. Res.**, London, v. 2, p. 205-212. 2000.

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

- HU, S.H.; CONCHA, C.; JOHANNISSON, A.; MEGLIA, G.; WALLER, K.P. Effect of subcutaneous injection of ginseng on cows with subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. **J. Vet. Med. B Infect. Dis.: Vet. Public Health**, Berlin, v. 48, p. 519-528. 2001.
- HU, S.H.; CONCHA, C.; LIU, F.; WALLER, K.P. Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunization against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 10, p. 29-37. 2003.
- HU, S.H.; DU, A.F. Treatment of bovine mastitis with houttuynin sodium bisulphate. **Zentralbl Veterin. B**, Berlin, v. 44, p. 365-370. 1997.
- IMRIE, R. Ethnoveterinary Medicine: “Ethnoscience or just anti-science? A review of Dr. Constance McCorkle’s chapter 41: “Ehnoveterinary Medicine”. <http://www.vet-task-force.com/SW41mr.htm>. Acesso em 02/01/2007.
- INGAWA, K.H.; ADKINSON, R.W.; GOUGH, R.H. evaluation of a gel teat cleaning and sanitizing compound for premilking hygiene. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 75, p. 1224-1232. 1992.
- INSTITUTO BIODINÂMICO. Diretrizes para o padrão de qualidade Orgânico - Instituto Biodinâmico. 12ª Ed., Associação de certificação Biodinâmico, Botucatu, São Paulo. 2004. 88p.
- JÁCOME, R. L. R. P.; LOPES, D. E. S.; RECIO, R A; MACEDO, J F; OLIVEIRA, A. B. Caracterização farmacognóstica de *Polygonum hydropiperoides* Michaux e *P. spectabile* (Mart.) (Polygonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 14, n. 1, p. 21-27, 2004.
- JOHNSTON, M.D; SIMMONS, E.A.; LAMBERT, R.J.W. One explanation for the variability of the bacterial suspension test. **J. Appl. Microbiol.**, Washington, v. 88, p.237-244. 2000.
- JORGE, S.S.A. & MORAIS, R.G. Etnobotânica de plantas medicinais. In: I Seminário Mato Grossense de etnobiologia e etnoecologia, II Seminário Centro-Oeste de plantas medicinais, 2002, Cuiabá. Anais... Cuiabá: UFMT: FAMEV. 2002. 17p.
- JUNGERMAN, P.F., SCHWARTZMAN, R.M. **Veterinary Medical Micology**. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia.. 1972. p. 3-28
- KARAM, K.F. A Agricultura Orgânica como Estratégia de Novas Ruralidades: um estudo de caso na Região Metropolitana de Curitiba. Anais do V Encontro da Sociedade Brasileira de Sistemas Produção. Florianópolis, p. 1-22. 2002.
- KING, J.O.L. The effects of different bacterial infections causing mastitis on the yield and quality of cow’s milk. **Brit. Vet. J.**, London, v. 125, p. 57-62. 1969.
- KRUGER, E.L. Uma abordagem sistêmica da atual crise ambiental. **Rev. Educ. e Tecnol.**, Curitiba, v. 8, p. 98-106. 2004.

- KRUZE, J. La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. **Arch. Med. Vet.**, Valdivia, v. 30, p. 7-16. 1998.
- KUMAR, A.; SHARMA, V.D.; SING, A.K.; SING, K. Antibacterial properties of some Eucalyptus oils. **Fitoterapia**, Milano, v. 59, p. 141-144. 1988.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACARI, E.M.; MELO, N.T. **Fungos, Actinomicetos e Algas de interesse médico**. São Paulo: Ed. Savier, 1998. p. 130.
- LADEIRA, S.L. **Mastite bovina**. In: Riet-Correa, F.; Schild, A.L.; Méndez, M.C. Doenças dos ruminantes e equinos. Pelotas, Ed. Universitária/UFPEL. 2001. p. 248-261.
- LAMBERT, R.J.W.; JOHNSON, M.D.; SIMONS, E.A. A kinetic study of the effect of hydrogen peroxide and peracetic acid against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* using the bioscreen disinfection method. **J. Appl. Microbiol.**, Washington, v. 87, p.782-786. 1999.
- LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J.; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J. Appl. Microbiol.**, Washington, v. 91, p. 453-462. 2001.
- LANS, C. & BROWN, G. Ethnoveterinary medicines used for ruminants in Trinidad and Tobago. **Prev. Vet. Medic.**, Amsterdam, v. 35, p. 149-163. 1998.
- LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. ; LIMA-LANDMAN, M. T. R. ; DE LIMA, T. C. M. . Validation of Medicinal Plants in Latin America: reasons and goals. In: ECHEVERRI, L.; QUIÑONES, W.. (Org.). **Temas en productos naturales: la biodiversidad como fuente de activos**. Medellín, Impresos Begon, 1997. p. 223-229.
- LARANJA, L.F. & MACHADO, P.F. Avaliação da efetividade de um programa de controle de mastite bovina em fazenda produtoras de leite B do Estado de São Paulo. **Sci. Agric.**, Piracicaba, v. 51, p. 569-577. 1994.
- LAROCQUE, L.; MALIK, S.S.; LANDRY, D.A.; PRESSEAU, S.; SVED, S.; MATULA, T. In vitro germicidal activity of teat dips against *Nocardia asteroides* and other udder pathogens. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 75, p. 1233-1240. 1992.
- LARSSON, C. E.; NAHAS, C. R.; LEDON, A. L. B. P.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORREA, B. Ringworm in domestic cats in São Paulo, Brazil, between 1981-1990. **Feline Prat.-Dermatol.**, Santa Barbara, v. 22, 11-14, 1994.
- LEBEL, J. **Health: an ecosystem approach**. IDRC, Ottawa, Canadá. 2003. 85 p.
- LeCHEVALLIER, M.W.; CAWTHON, C.D.; LEE, R.G. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. **Appl. and Environm. Microbiol.**, Washington, v. 649-654. 1988.

LOGUÉRCIO, A.P.; BATTITIN, A.; VARGA, A.C., HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 371-376. 2005.

LOPES, D. E. S. ; JÁCOME, R. L. R. P. ; RECIO, R. A. ; BRANDÃO, M. ; OLIVEIRA, A. B. . Padronização de extratos de *Polygonum sp.* In: III Semana da Pós-Graduação da UFMG, 2001, Belo Horizonte. Anais da III Semana da Pós-Graduação da UFMG. Belo Horizonte : UFMG, 2002.

LOPES, J.O., ALVES, S.H., BENEVENGA, J.P. Human dermatophytosis in Rio Grande do Sul (Brazil): 1988-1992. **Rev. Med. Trop.**, Brasília, v. 36, p. 115-119. 1994.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil – terrestres aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3ª Ed., Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP. 2000. 640 pp.

LORENZI, H & MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP. 2002. 544 p.

LOURENZANI, A.E.B.S.; LOURENZANI, W.L.; BATALHA, M.O. Barreiras e oportunidades na comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. **Informações econômicas**, São Paulo, v. 34, p. 15-25. 2004.

LUIZE, P.S.; TIUMAN, T.S.; MORELLO, L.G.; MAZA, P.K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.D.; CORTEZ, D.A.G.; DE MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Braz. J. Pharmaceut. Sc.**, São Paulo, v. 41, 85-94, 2005.

MACHADO, J.O.; SANTOS, E.; LEFÉVRE, AF. Atividade antibacteriana de extratos de *Bidens pilosa* L. **Rev. Cienc. Farm.**, Araraquara, v. 10, p. 55-62. 1988.

MARKUS, R. **Elementos de Estatística Aplicada**. Faculdade de Agronomia da UFRGS, Porto Alegre. 1973. 329pp.

MARTIN, J.G. **Ethnobotany, A “people and plants” conservation Manual**. London, Chapman and Hall, 1996. pp. 268.

MATHEWS, K.R.; HARMOS, R.J.; LANGLOIS, B.E. Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 75, p. 1835-1839.

MATHIAS, E. Ethnoveterinary medicine: A resource for development. In: New Agriculturist, reporting Agriculture for the 21st Century: Livestock Health. <http://www.new-agri.co.uk/00-6/focuson/focuson3.html>, 2000. Acesso em 10/11/2006.

McDONNELL, G. & RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinic. Microbiol. Reviews**, Wahington, v. 12, p. 147-179. 1999.

- McGAW, L.J.; VAN DER MERWE, D.; ELOFF, J.N. In Vitro antihelminthic, antibacterial and cytotoxic effects of extracts from plants used in South African ethnoveterinary medicine. **The Vet. J.**, Paris, v. , p. , 2005.
- McLEOD, D.H.; WILSON, S.M. Milk yield in relation to infection with *Streptococcus agalactiae*. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 18, p. 235-239. 1951.
- MEDEIROS, L.C.M. & CABRAL, I.E. O cuidar com plantas medicinais: uma modalidade de atenção à criança pelas mães e enfermeira-educadora. **Rev. Lat-Am. Enferm.**, v. 9, p. 18-26. 2001.
- MEDEIROS, M.F.T.; FONSECA, V.S.; ANDREATA, R.H.P. Plantas medicinais e seus usos pelos sítiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, v. 18, p. 391-399. 2004.
- MENA, A.J.A. Las plantas en la cultura tradicional de salud mesoamericana. **Rev. Antropol. Exprim.**, Jaen, v. 5, Texto 5. 2005. 9p. <http://www.ujaen.es/huesped/rae/cuerpo.html>. Acesso em: 7/1/2007.
- MÉNDEZ, V.E. & GLIESSMAN, S.R. Un enfoque interdisciplinario para la investigación en agroecología y desarrollo rural en el tropico latinamericano. **Manejo Integ. de Plagas y Agroecol.**, Costa Rica, v. 64, p. 5-16. 2002.
- MERESTA, L.; MERESTA, T. Sensivity of bovine mastitis bactéria to própolis in vitro. **Medyc. Wet.**, Warsovia, v. 41, p. 489-492. 1985.
- MERESTA, L.; MERESTA, T.; BURDZINSKI, J.; CHMURZYNSKI, P. On the antimicrobial activity of propolis and propolis constituents. **Méd.Wet.**, Warsovia, v. 45, p. 392-395. 1989.
- MIGNON, B. R.; LOSSON, B. J. Prevalence and characterization of *Microsporium canis in cats*. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 249-256, 1997.
- MINAYO, A.M.C.S.; DESLANDES, S.F.; NETO, D.C.; GOMES, R. **Pesquisa social**. Ed. Vozes, Petrópolis, RJ. 1994. 80 p.
- MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. *In*: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP. 230p. p.69-86. 1995.
- MIZRAHI, I.; TRAVERSO, J.; RODRIGUEZ, M.A.; JUAREZ, A.L.; BANDONI, L.; MUSCHIETTI, C.. Composition of the essential oil of *Eucalyptus dunnii* Maiden growing in Argentina. **J. of Essent. Oil Res.**, Carol Stream, v. 9, p. 715-717. 1997.
- MORAES, H.P. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de extratos de *Byrsonima* e *Alchornea spp*: estudo comparativo entre as técnicas de diluição em tubos e microplacas. Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2006. 94 f.
- MOREIRA, R.M., CARMO, M.S. Agroecologia na construção do desenvolvimento rural sustentável. **Agric. São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 2, p. 37-56. 2004.

MORIN, E. Da necessidade de um pensamento complexo. In: **Para navegar no Século XXI**. 2ª Ed. Porto Alegre: Sulina/EDIPUCRS, 2000. p. 19-42.

MUHAMMAD, G.; KHAN, M.G.; HUSSEIN, M.H.; IQBAL, Z.; IKBAL, M.; ATHAR, M. Veterinary practices of owners of pneumatic-cart pulling camels in Faisalabad City (Pakistan). **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 97, p. 241-246. 2005.

MUKHERJEE, R.; DASH, P.K.; RAM, G.C. Immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* in bovine subclinical mastitis. **Res. Vet. Sci.**, Amsterdam, p. 37-43. 2005.

MULLOWNEY P.C., FADOK A.V. Dermatologic Diseases of Horses. Part III. Fungal Skin Diseases. **The Compend. Contin. Educ.**, Princeton Junction, v. 6, p. 324-331. 1984.

MULLER, M.M.U.; TAVARES, J.C.; AUED, I.M. Os elementos da construção do espaço transitório na COOPAVA. **Rev. Disc. Exp. Geograf.**, Florianópolis v. 1, p. 72-85. 2005.

MURDOUGH, P.A. & PANKEY, J.W. Evaluation of 57 teat sanitizers using excised cow teats. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 76, p. 2033-2038. 1993.

NASCENTE, P.S. Malassezia pachydermatis em cães e gatos: estudo da frequência e avaliação de sensibilidade aos antifúngicos cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Dissertação de mestrado – PPG em Veterinária. UFPel, 2001. 84p.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 14, p. 119-124. 2001.

NAVARRO, M.G.M.; Agroecologia: bases teóricas para uma Historia Agrária alternativa. **Agroecol. Y Desenvolv.: Rev. CLADES**, Santiago, n. esp. 4, 1992. <http://www.clades.org/r4-3.htm>. Acesso obtido em 10/09/2006.

NATZKE, R.P. Elements of mastitis control. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 64, p. 1431-1436. 1981.

NCCLS – **National Comitee for clinical Laboratory Standards**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. M27 – A, v. 17, n. 9. 1997.

NICKELL, J.C.; RUSESKA, I.; WRIGHT, J.B.; COSTERTON, J.W. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilms on urinary catheter material. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 27, p. 619-624. 1985.

NICKERSON, S.C.; OWENS, W.E.; FOX, L.K.; SCHEIFINGER, C.C.; SHRYOCK, T.R.; SPIKE, T.E. Comparison of Tilmicosin and Cephapirin as a therapeutics for *Staphylococcus aureus* mastitis at dry-off. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 82, p. 696-703. 1999.

NICKERSON, S.C.; WATTS, J.L.; BODDIE, R.L.; RAY, C.H. Effect of postmilking teat antiseptics on teat canal infections in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 73, p. 373-380. 1990.

NISHIMURA, H. & CALVIN, M. Essential oil of *Eucalyptus globulus* in California. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 27, p. 432-434. 1979.

NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; CORDEIRO, J. M. C. Epidemia familiar por *Microsporium canis* transmitido por felino. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, Salvador (Brasil), 1999.

O'DONOVAN, J.; DODD, F.H.; NEAVE, F.K. The effect of udder infections on the lactation yield of milk and milk solids. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 27, p. 115-120. 1960.

OGARA, E.A.; HILL, D.J.; MASLIN, D.J. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v. 66, p. 2269-2273. 2000.

OLANO, L.; ALONSO PAZ, E.; CERDEIRAS, M.P.; FERNANDEZ, J.; FERREIRA, F.; MOYNA, P.; SOUBES, M. VÁZQUEZ, A.; VERO, S.; BASSAGODA, M.J. Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. **J. of Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 53, p. 111-115. 1996.

OLIVEIRA, F.Q.; ANDRADE-NETO, V.; KRETTLI, A.U.; BRANDÃO, M.G.L. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. **J. of Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 93, p. 39-42. 2004.

OLIVER, S.P.; GILLESPIE, B.E.; LEWIS, M.J.; IVEY, S.J.; ALMEIDA, R.A.; LUTHER, D.A.; JOHNSON, MD.L.; LAMAR, K.C.; MOOREHEAD, H.; DOWLEN, H.H. Efficacy of a new premilking teat disinfectant containing a phenolic combination for the prevention of mastitis. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 84, p. 1545-1549. 2001.

OLIVER, S.P.; KING, S.H.; LEWIS, M.J.; TORRE, P.M.; MATTHEWS, K.R.; DOWLEN, H.H. Efficacy of chlorhexidine as a postmilking teat disinfectant for the prevention of bovine mastitis during lactation. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 73, p. 2230-2235. 1990.

Organización Mundial de la Salud. **Traditional, Complementary and Alternative Medicines and Therapies**. Washington DC, Oficina Regional de la OMS para las Américas/Organización Panamericana de la Salud (grupo de trabajo OPS/OMS), 1999.

OURA, L.Y.; FOX, L.K.; WARF, C.C.; KEMP, G.K. Efficacy of two acidified chlorite postmilking teat disinfectants with sodium dodecylbenzene sulfonic acid on prevention of contagious mastitis using an experimental challenge protocol. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 85, p. 252-257. 2002.

PAGES, N., FOURNIER, G. ; LE LUYER, F. ; MARQUES, M.C.. Essential oils and their teratogenic potential: essential oil of *Eucalyptus globulus*. Preliminary study on mice. **Plantes Medicin. et Phytother.**, Paris, v. 24, p. 21-26. 1990.

PALOMBO, E.A.; SEMPLE, S.J. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. **J. of Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 77, p. 151-157. 2001.

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAN, V.R.; KOLE, C, Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. **Microbios.**, Cambridge, v. 86, p. 237-246. 1996.

PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L.F.F.. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.70, n.4, p.391-395, 2003.

PETERS, R.R.; KOMARAGIRI, S.; PAAPE, M.J.; DOUGLASS, L.W. Evaluation of 1,6% phenol as a premilking and postmilking teat dip preventing new bovine intramammary infections. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 83, p. 1750-1757. 2000.

PEREIRA, R.S.; SUMITA, T.C.; FURLAN, M.R.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinárias. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, v. 38, p. 326-328. 2004.

PÉREZ, I. O. **La experiencia de la red de plantas medicinales del cono sur**. In: PÉREZ, I. O. Desde dónde hablan los saberes locales? Sustentabilidad, conservación, y conocimiento de la flora medicinal del cono sur. Editorial Virtual, Temuco, Chile. 2004.

PÉREZ, R.E. & CALDERON, N.A. Etnoveterinaria: hablemos de integración. **<http://www.PortalVeterinaria.com>**. Publicado em 24/03/2003. Acesso em 04/03/2004.

PIERONI, A. HOWARD, P.; VOLPATO, G.; SANTORO, R.F. Natural remedies and nutraceuticals used in ethnoveterinary practices in inland southern Italy. **Vet Res. Commun.**, Amsterdam, v. 28, p. 55-80. 2004.

PINTO, M.R.R.; LADEIRA, S.L.; CARDOSO, C.M.; GOMES, F.R. Mastite bovina: Ocorrência de agentes etiológicos e resistência a antimicrobianos. In: Anais XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado – RS. 1997. p. 162

PINTO, M.S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSSO, M.M. Efeito do extrato de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 38, p. 278-283. 2001.

POSEY, D.A. Etnobiologia: teoria e prática. In: RIBEIRO, D. **Suma Etnológica Brasileira**, v. 1, Etnobiologia. Belém-Pa: Ed. Universitária, UFPA. 1987. p. 27-32.

PRESTES, L.S. Dissertação de Mestrado. Avaliação “in vitro” de diferentes extratos de *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* frente a microrganismos de importância veterinária. Programa de Pós Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. 2006. 47p.

QUINN, P.J.; CARTES, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Ed. Wolfe, Londres, 1998. 648p.

QUIROGA, E.M.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **J. of Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 74, p.89-96. 2001.

RACE, T.; van STADEN, J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 56, p. 81-87. 1997.

RADOSTITS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. Mastitis. In: **Veterinary Medicine**. Bailliere Tindal, London. 1994. pp. 563-627.

RAHMAN I, GOGOI I, DOLUI AK, HANDIQUE R. Toxicological study of plant extracts on termite and laboratory animals. **J. Environ. Biol.**, Muzaffarnagar, v. 26, p. 239-41. 2005

RASMUSSEN, M.D.; GALTON, D.M.; PETERSSON. Effects of premilking teat preparation on spores of anaerobes, bacteria, and iodine residues in milk. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 74, p. 2472-2478. 1991.

REIS, M.S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação das plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^a Ed. UFRGS Editora, Porto Alegre, 2003. pp. 45-74.

REYBROUCK, G. Efficacy of inactivators against 14 disinfectant substances. **Zent. Bakteriol. Hyg., I Abteilung Originale B**, Berlin, v. 168, p. 480-492. 1979.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Antimicrobial activity of selected plants employed in the spanish mediterranean area. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 21, p. 139-152. 1987.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 23, p. 127-149. 1988.

RIVERA, L.M. & BRUGAROLAS, M. Estrategias comerciales para los productos ecológicos. **Distribución y Consumo**, Madrid, Enero-Febrero, 15-22.2003

RODRIGUES, V.E.G. & CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande – Minas Gerais. **Cienc. Agrotec.**, Lavras, v. 25, p. 102-123. 2001.

ROHALISON, L.; BENATHAN, M.; MONOD, M.; FRENK, E.; GUPTA, M.P.; SOLIS, P.N.; FUZZATI, N.; HOSTETTMANN, K. Antifungal principles of *Baccharis pedunculata*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 61, p. 360-362. 1995.

ROJAS, J.J.; OCHOA, V.J.; OCAMPO, S.A.; MUÑOZ, J.F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complement. Altern. Medic.**, London, v. 6, p. 30-36. 2006.

ROMANO, C.; VALENTI, L.; BARBARA, R. Dermatophytes isolated from asymptomatic stray cats. **Mycoses**, Berlin, v. 40, p. 471-472. 1997.

RUSSELL, A.D. & DAY, M.J. Antibacterial activity of chlorhexidine. **J. Hosp. Infect.**, New York, v. 25, p. 229-238. 1993.

RYCROFT, A. N.; MCLAY, C. Desinfectants in the control of small animal ringworm due to *Microsporium canis*. **Vet. Rec.**, London, v. 129, p. 239-241, 1991.

SAHIN, F.; KARAMAN, I.; GÜLLÜCE, M.; ÖGÜTÇÜ, H.; ENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A.; ÖZTÜRK, S.; KOTAN, R. Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 87, p. 61-65. 2003.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 275-280. 2004.

SASSONE, L.M.; FIDEL, R.; FIDEL, S.; VIEIRA, M. HIRATA Jr, R. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine in vitro. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 36, p. 848-852. 2003.

SCARPA, G.F. Plantas empleadas contra trastornos digestivos en la medicina tradicional criolla del chaco noroccidental. **Dominguezia**, Buenos Aires. V. 18, p. 36-50. 2002.

SCHALLER, M. & KORTING, H. C.; Allergic airborne contact dermatitis from essential oils used in aromatherapy. **Clin. Exp. Dermatol.**, Oxford, v. 20, p. 143. 1995.

SCHALM, O.W.; CARROLL, E.J.; JAIN, N.C. **Bovine Mastitis**. Lea & Fabiger, Philadelphia. 1971. 360 p.

SCHILACCI, D.; VENTURELLA, F.; VENUTTI, F.; PLESCIA, F. Antimicrobial and antiproliferative activity of *Peucedanum nebrodense* (Guss.) Strohl. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 87, p. 99-101. 2003.

SCHLIESSER, H.T.; STRAUCH, D. **Desinfektion in tierhaltung, fleisch und milchwirtschaft**. Eike, Stuttgart. 1981. 455 p.

SCHMIDT, A.L.; OLIVER, S.P.; FYDENKEVEZ, M.E. Germicidal persistence of teat dips by modified excised teat procedure. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v.68, p. 158-164. 1985.

SCHMID, T, V. & WIEST, J.M. A desinfecção química na profilaxia na colibacilose suína. **Arq. Fac. Vet., UFRGS**, Porto Alegre, v. 17, p. 103-113, 1989.

SCHRICK, F.N.; HOCKETT, M.E.; SAXTON, A.M.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 84, p. 1407-1412. 2001.

SCHUKKEN, Y.H.; ZADOKS, R.N.; TIKOFSKY, L.; DOGAN, B.; KLAESSIG, S.; SIMPSON, K.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. Epidemiology of mastitis: paradigms, pattern and parables. In: Proceedings 23rd World Buiatrics Congress, Quebec City, Canada,. 2004. p. 45-50.

SEARS, P.M.; GONZÁLEZ, R.N.; WILSON, D.J.; HAN, H.R. Procedures for mastitis diagnosis control. **Vet. Clin. North Amer.: Food Anim. Pract.**, Philadelphia, v. 9, p. 445-468. 1993.

SEARS, P.M.; SMITH, B.S.; STEWART, W.K.; GONZALEZ, R.N.; RUBINO, S.D.; GUSIK, S.A.; KULISEK, E.S.; PROJAN, S.J.; BLACKBURN, P. Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 75, p. 3185-3190. 1992.

SEVILLA-GUZMAN, E. Uma estratégia de sustentabilidade a partir da agroecologia. **Agroecol. e Desenv. Rural Sustent.**, Porto Alegre, v. 2, p. 35-45. 2001.

SHAHI, S.K.; SHUKLA, A.C.; BAJAJ, A.K.; MEDGELY, G.; DIKSHIT, A. Broad spectrum antimycotic drug for the control of fungal infection in human beings. 1999.

SHERRY, E.; BOECK, H.; WARNKE, P.H. Topical aplication of a new formulation of eucalyptus oil phytochemical clears methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Am. J. Infect. Control**, St. Louis, v. 29, p. 346. 2001.

SILVA, S.R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L.H.; MARTINS, M.V.M. Plantas medicinais do Brasil: Aspectos gerais sobre Legislação e comércio. 2004. www.traffic.org/content/439.pdf. Acesso em 07/01/2007.

SILVEIRA, E.S.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. *Trichophyton verrucosum* e *Trichophyton equinum* em pele hígida de bovinos e eqüinos. In: Anais do XIV Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 14, Gramado, RS. 1999. p. 219.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; de MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^a Ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed da UFRGS/Ed. da UFSC. 2003.

SMITH, K.L. & HOGAN, J.S. Environmental mastitis. **Vet Clin. Of North Am.: Food Anim Pract.**, Philadelphia, v. 9, p. 489-498. 1993.

SMOLARZ, H.D. Comparative studies on the free flavonoid aglycones in herbs of different species of *Polygonum* L. **Acta Pol Pharm.**, Warszawa, v. 59, p. 145-148. 2002.

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. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 37, p. 429-433. 2000.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; BRITO, M.A.V.P.; BASTOS, R.R. Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do

tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 57, supl. 2, p. 251-260. 2005.

STICKLER, D.J. Suscetibility of antibiotic-resistan gram-negatives bactéria a biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. **J. Appl. Mircobiol. (Suppl.)**, Washington, v. 92, p. 163S-170S. 2002.

SWANSON, E.W.; MILLER, J.K.; MUELLER, F.J.; PATTON, C.S.; BACON, J.A.; RAMSEY, N. Iodine in milk and meat dairy cows fed different amounts of potassium iodide or ethylenediamine dihydroiodide. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 73, p. 398-405. 1990.

TABUTI, J.R.S.; DHILLION, S.S.; LYE, K.A. Ethnoveterinary medicines for cattle (*Bos indicus*) in Bulamogi county, Uganda: plant species and mode of use. **J. of Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 88, p. 279-286. 2003.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculate*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 39, p. 60-64. 2004.

TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N.; HONMA, K.; OKUDA, K.; KATO, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essentials oils against oral pathogens. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 19, p. 61-64. 2004.

TERESCHUK, M.L.; RIERA, M.V.Q.; CASTRO, G.R.; ABDALA, L.R. Antimicrobial activity of flavonóides from leaves of *Tagetes minuta*. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 56, p. 227-232. 1997.

TERESCHUK, M.L.; BAIGORI, M.D.; ABDALA, L.R. Antibacterial activity of *Tagetes terniflora*. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, p. 404-406. 2003.

TRINIDAD, P.; NICKERSON, S.C.; ALLEY, T.K. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigavid dairy heifers. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 73, p. 107-114. 1990.

VAN DER MERWE, D.; SWAN, G.F; BOTHA, C.J. Use of ethnoveterinary medicinal plants in cattle by Setswana-speaking people in the Madikwe area of the North West Province of South Africa. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, Pretoria, v. 72, p. 189-196. 2001.

VAN LEEUWEN, R. Métodos etnoveterinarios: conocimiento campesino en El Salvador.2001. www.ethnovetweb.com/leeuwen_annex.16.pdf. Acesso em 10/10/2005.

VIEGI, L.; PIERONI, A.; GUARRERA, P.M.; VANGELISTI, R. A review of plants used in folk veterinary medicina in Italy as basis for a databank. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 89, p. 221-244.2003.

VIEIRA, R.H.S.F.; RODRIGUES, D.P.; GONÇALVES, F.A.; MENEZES, F.G.R.; ARAGÃO, J.S.; SOUSA, O.V. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* LINN. And *Carica papaya* LINN.) upon bactéria isolated from

fish muscle and known to induce diarrhea in children. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 43, p. 145-148. 2001.

VIJAYAKUMAR, R. MUTHUKUMAR, C.; KUMAR, T.; SARAVANOMUTHU, R. Characterization of *Malassezia furfur* and its control by using plant extracts. **Indian J. Dermatol.**, Mumbai, v. 51, p. 145-148. 2006.

VISBISKI, V.N.; WEIRICH NETO, P.H.; dos SANTOS, A.L. Uso popular das plantas medicinais no assentamento Guanabara, Imbau-Pr. **Publ. UEPG Cienc. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.**, Ponta Grossa, v. 9, p. 13-20. 2003.

WANZALA, W.; ZESSIN, K.W.; KYULE, N.M.; BAUMANN, M.P.O.; MATHIAS, E.; HASSANALI, A. Ethnoveterinary medicine: a critical review of its evolution, perception, understanding and the way forward. **Livest. Res. for Rural Develop.**, Cali, v. 17, artigo 117. 2005. <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/11/wanz17119.htm>. Acesso em: 07/01/2007.

WEBB, J.S.; GIVSKOV, M.; KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Curr. Opin. in Microbiol.**, London, v. 6, p. 578-585. 2003.

WELLENBERG, G.J.; VAN DER POEL, W.H.M.; VAN OIRSHOT, J.T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 88, p. 27-45. 2002.

WHITMAN, B.W. AND H. GHAZIZADEH. Eucalyptus oil [from *Eucalyptus spp.* including *E. globulus*]: therapeutic and toxic aspects of pharmacology in humans and animals. **J. of Paediatr. and Child Health**, Melbourne, v. 30, p. 190-191. 1994.

WHO, World Health Organization. Health for all in the 21th century: overview. <http://www.who.int/hfa/>. Acesso em 04/03/2004.

WIEST, J.M. Bovinocultura de leite: resistência de patógenos da glândula mamária desinfecção e a variações do potencial de hidrogênio. **Arq. Fac. Vet., UFRGS**, Porto Alegre, v. 12, p. 57-69. 1984.

WIEST, J.M.; NONNEMACHER, G.M.; LECKE, M.O. Eficácia de desinfetantes derivados do fenol em saúde animal. **Arq. Fac. Vet., UFRGS**, Porto Alegre, v. 10-11, p. 45-55. 1982/83.

WIEST, J.M. & SCHMIDT, V. Controle do fator material orgânica nos testes de eficácia de desinfetantes hipocloritos. **Arq. Fac. Vet., UFRGS**, Porto Alegre, v. 17, p. 97-102. 1989.

WIEST, J. M. & FENSTERSEIFER, L. M. Considerações Sobre O Processo de Desinfecção. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.13, p.75 – 79. 1985.

WIEST, J.M. & GUTKOSKI, S.B. Atividade antibacteriana “in vitro” do decocto de *Casearia sylvestris* Swartz-Flacourtiaceae (chá-de-bugre, guaçatonga) sobre agentes de interesse em saúde animal e saúde coletiva. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 27, p. 105-106. 1999.

WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; CASE, K.L.; GARRISON, L.L.; GRÖHN, Y.T. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 82, p. 1664-1670. 1999.

WILLMS; R.U.; FUNK, P.; WALTHER, C. Local tolerability of two preparations with eucalyptus oil and pine-needle oil. **MMW Fortschr Med.**, Munchen, Suppl. 3, p. 109-12. 2005

ZECCONI, A.; BRONZO, V.; CASULA, A.; LUZZAGO, C.; MORONI, P.; PICCININI, P.; SPREAFICO, G. Efficacy of a biological response modifier in preventing *Staphylococcus aureus* intramammary infections after calving. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 82, p. 2101-2107. 1999.

ZHANG, X. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. <http://www.who.int>. Acesso em 15/09/2003.

APÊNDICE A – IINIB e IINAB de todas as repetições dos Testes de Diluição

planta	extrato	conc	bact	iinib	iinab	planta	extrato	conc	bact	iinib	iinab
1	1	4	1	0	0	1	2	4	1	0	0
1	1	4	1	0	0	1	2	4	1	0	0
1	1	5	1	0	0	1	2	5	1	0	0
1	1	5	1	0	0	1	2	5	1	0	0
1	1	10	1	0	0	1	2	10	1	0	0
1	1	10	1	0	0	1	2	10	1	0	0
1	1	20	1	0	0	1	2	20	1	0	0
1	1	20	1	0	0	1	2	20	1	0	0
1	1	30	1	0	0	1	2	30	1	7	0
1	1	30	1	0	0	1	2	30	1	7	0
1	1	50	1	3	0	1	2	50	1	8	0
1	1	50	1	3	0	1	2	50	1	8	0
1	1	4	2	0	0	1	2	4	2	0	0
1	1	4	2	0	0	1	2	4	2	0	0
1	1	5	2	0	0	1	2	5	2	0	0
1	1	5	2	0	0	1	2	5	2	0	0
1	1	10	2	0	0	1	2	10	2	0	0
1	1	10	2	0	0	1	2	10	2	0	0
1	1	20	2	0	0	1	2	20	2	0	0
1	1	20	2	0	0	1	2	20	2	0	0
1	1	30	2	0	0	1	2	30	2	8	0
1	1	30	2	0	0	1	2	30	2	8	0
1	1	50	2	1	0	1	2	50	2	8	0
1	1	50	2	1	0	1	2	50	2	8	0
1	1	4	3	0	0	1	2	4	3	0	0
1	1	4	3	0	0	1	2	4	3	0	0
1	1	5	3	0	0	1	2	5	3	0	0
1	1	5	3	0	0	1	2	5	3	0	0
1	1	10	3	0	0	1	2	10	3	0	0
1	1	10	3	0	0	1	2	10	3	0	0
1	1	20	3	0	0	1	2	20	3	0	0
1	1	20	3	0	0	1	2	20	3	0	0
1	1	30	3	0	0	1	2	30	3	2	0
1	1	30	3	0	0	1	2	30	3	2	0
1	1	50	3	0	0	1	2	50	3	8	0
1	1	50	3	0	0	1	2	50	3	8	0
1	1	4	4	0	0	1	2	4	4	0	0
1	1	4	4	0	0	1	2	4	4	0	0
1	1	5	4	0	0	1	2	5	4	0	0
1	1	5	4	0	0	1	2	5	4	0	0
1	1	10	4	0	0	1	2	10	4	0	0
1	1	10	4	0	0	1	2	10	4	0	0
1	1	20	4	0	0	1	2	20	4	0	0
1	1	20	4	0	0	1	2	20	4	0	0
1	1	30	4	0	0	1	2	30	4	8	0
1	1	30	4	0	0	1	2	30	4	8	0
1	1	50	4	0	0	1	2	50	4	8	6
1	1	50	4	0	0	1	2	50	4	8	6
1	1	4	5	0	0	1	2	4	5	0	0
1	1	4	5	0	0	1	2	4	5	0	0
1	1	5	5	0	0	1	2	5	5	0	0
1	1	5	5	0	0	1	2	5	5	0	0

1	1	10	5	0	0	1	2	10	5	0	0
1	1	10	5	0	0	1	2	10	5	0	0
1	1	20	5	1	0	1	2	20	5	0	0
1	1	20	5	1	0	1	2	20	5	0	0
1	1	30	5	5	0	1	2	30	5	4	0
1	1	30	5	5	0	1	2	30	5	4	0
1	1	50	5	5	0	1	2	50	5	7	0
1	1	50	5	5	0	1	2	50	5	7	0
1	1	4	6	0	0	1	2	4	6	0	0
1	1	4	6	0	0	1	2	4	6	0	0
1	1	5	6	0	0	1	2	5	6	0	0
1	1	5	6	0	0	1	2	5	6	0	0
1	1	10	6	0	0	1	2	10	6	0	0
1	1	10	6	0	0	1	2	10	6	0	0
1	1	20	6	0	0	1	2	20	6	3	0
1	1	20	6	0	0	1	2	20	6	5	0
1	1	30	6	0	0	1	2	30	6	7	0
1	1	30	6	0	0	1	2	30	6	7	0
1	1	50	6	6	0	1	2	50	6	8	7
1	1	50	6	6	0	1	2	50	6	8	7
1	1	4	7	0	0	1	2	4	7	0	0
1	1	4	7	0	0	1	2	4	7	0	0
1	1	5	7	0	0	1	2	5	7	0	0
1	1	5	7	0	0	1	2	5	7	0	0
1	1	10	7	0	0	1	2	10	7	0	0
1	1	10	7	0	0	1	2	10	7	0	0
1	1	20	7	5	0	1	2	20	7	0	0
1	1	20	7	5	0	1	2	20	7	0	0
1	1	30	7	7	0	1	2	30	7	0	0
1	1	30	7	7	0	1	2	30	7	0	0
1	1	50	7	5	0	1	2	50	7	7	0
1	1	50	7	5	0	1	2	50	7	7	0
1	1	4	8	0	0	1	2	4	8	0	0
1	1	4	8	0	0	1	2	4	8	0	0
1	1	5	8	0	0	1	2	5	8	0	0
1	1	5	8	0	0	1	2	5	8	0	0
1	1	10	8	0	0	1	2	10	8	0	0
1	1	10	8	0	0	1	2	10	8	0	0
1	1	20	8	0	0	1	2	20	8	0	0
1	1	20	8	0	0	1	2	20	8	0	0
1	1	30	8	0	0	1	2	30	8	0	0
1	1	30	8	0	0	1	2	30	8	0	0
1	1	50	8	5	0	1	2	50	8	0	0
1	1	50	8	5	0	1	2	50	8	0	0
1	1	4	9	0	0	1	2	4	9	0	0
1	1	4	9	0	0	1	2	4	9	0	0
1	1	5	9	0	0	1	2	5	9	0	0
1	1	5	9	0	0	1	2	5	9	0	0
1	1	10	9	0	0	1	2	10	9	0	0
1	1	10	9	0	0	1	2	10	9	0	0
1	1	20	9	0	0	1	2	20	9	0	0
1	1	20	9	0	0	1	2	20	9	0	0
1	1	30	9	0	0	1	2	30	9	0	0
1	1	30	9	0	0	1	2	30	9	0	0
1	1	50	9	2	0	1	2	50	9	5	0

1	1	50	9	2	0	1	2	50	9	3	0
1	1	4	10	0	0	1	2	4	10	0	0
1	1	4	10	0	0	1	2	4	10	0	0
1	1	5	10	0	0	1	2	5	10	0	0
1	1	5	10	0	0	1	2	5	10	0	0
1	1	10	10	0	0	1	2	10	10	0	0
1	1	10	10	0	0	1	2	10	10	0	0
1	1	20	10	0	0	1	2	20	10	0	0
1	1	20	10	0	0	1	2	20	10	0	0
1	1	30	10	0	0	1	2	30	10	2	0
1	1	30	10	0	0	1	2	30	10	3	0
1	1	50	10	0	0	1	2	50	10	7	0
1	1	50	10	0	0	1	2	50	10	7	0
1	1	4	11	0	0	1	2	4	11	0	0
1	1	4	11	0	0	1	2	4	11	0	0
1	1	5	11	0	0	1	2	5	11	0	0
1	1	5	11	0	0	1	2	5	11	0	0
1	1	10	11	0	0	1	2	10	11	0	0
1	1	10	11	0	0	1	2	10	11	0	0
1	1	20	11	0	0	1	2	20	11	0	0
1	1	20	11	0	0	1	2	20	11	0	0
1	1	30	11	0	0	1	2	30	11	3	0
1	1	30	11	0	0	1	2	30	11	3	0
1	1	50	11	4	0	1	2	50	11	6	4
1	1	50	11	4	0	1	2	50	11	6	4
1	1	4	12	0	0	1	2	4	12	0	0
1	1	4	12	0	0	1	2	4	12	0	0
1	1	5	12	0	0	1	2	5	12	0	0
1	1	5	12	0	0	1	2	5	12	0	0
1	1	10	12	0	0	1	2	10	12	0	0
1	1	10	12	0	0	1	2	10	12	0	0
1	1	20	12	0	0	1	2	20	12	0	0
1	1	20	12	0	0	1	2	20	12	0	0
1	1	30	12	2	0	1	2	30	12	4	0
1	1	30	12	2	0	1	2	30	12	5	0
1	1	50	12	2	0	1	2	50	12	8	0
1	1	50	12	2	0	1	2	50	12	7	0
1	1	4	13	0	0	1	2	4	13	0	0
1	1	4	13	0	0	1	2	4	13	0	0
1	1	5	13	0	0	1	2	5	13	0	0
1	1	5	13	0	0	1	2	5	13	0	0
1	1	10	13	0	0	1	2	10	13	0	0
1	1	10	13	0	0	1	2	10	13	0	0
1	1	20	13	0	0	1	2	20	13	0	0
1	1	20	13	0	0	1	2	20	13	0	0
1	1	30	13	1	0	1	2	30	13	0	0
1	1	30	13	1	0	1	2	30	13	0	0
1	1	50	13	4	0	1	2	50	13	7	0
1	1	50	13	4	0	1	2	50	13	7	0
1	1	4	14	0	0	1	2	4	14	0	0
1	1	4	14	0	0	1	2	4	14	0	0
1	1	5	14	0	0	1	2	5	14	0	0
1	1	5	14	0	0	1	2	5	14	0	0
1	1	10	14	0	0	1	2	10	14	0	0
1	1	10	14	0	0	1	2	10	14	0	0

1	1	20	14	0	0	1	2	20	14	0	0
1	1	20	14	0	0	1	2	20	14	0	0
1	1	30	14	5	0	1	2	30	14	0	0
1	1	30	14	5	0	1	2	30	14	0	0
1	1	50	14	5	0	1	2	50	14	0	0
1	1	50	14	5	0	1	2	50	14	0	0
1	1	4	15	0	0	1	2	4	15	0	0
1	1	4	15	0	0	1	2	4	15	0	0
1	1	5	15	0	0	1	2	5	15	0	0
1	1	5	15	0	0	1	2	5	15	0	0
1	1	10	15	0	0	1	2	10	15	0	0
1	1	10	15	0	0	1	2	10	15	0	0
1	1	20	15	0	0	1	2	20	15	0	0
1	1	20	15	0	0	1	2	20	15	0	0
1	1	30	15	5	0	1	2	30	15	0	0
1	1	30	15	5	0	1	2	30	15	0	0
1	1	50	15	5	0	1	2	50	15	0	0
1	1	50	15	5	0	1	2	50	15	0	0
1	1	4	16	0	0	1	2	4	16	0	0
1	1	4	16	0	0	1	2	4	16	0	0
1	1	5	16	0	0	1	2	5	16	0	0
1	1	5	16	0	0	1	2	5	16	0	0
1	1	10	16	0	0	1	2	10	16	0	0
1	1	10	16	0	0	1	2	10	16	0	0
1	1	20	16	0	0	1	2	20	16	0	0
1	1	20	16	0	0	1	2	20	16	0	0
1	1	30	16	6	0	1	2	30	16	0	0
1	1	30	16	6	0	1	2	30	16	0	0
1	1	50	16	7	0	1	2	50	16	7	0
1	1	50	16	7	0	1	2	50	16	7	0
1	1	4	21	0	0	1	2	4	21	0	0
1	1	4	21	0	0	1	2	4	21	0	0
1	1	5	21	0	0	1	2	5	21	0	0
1	1	5	21	0	0	1	2	5	21	0	0
1	1	10	21	0	0	1	2	10	21	0	0
1	1	10	21	0	0	1	2	10	21	0	0
1	1	20	21	0	0	1	2	20	21	0	0
1	1	20	21	0	0	1	2	20	21	0	0
1	1	30	21	0	0	1	2	30	21	0	0
1	1	30	21	0	0	1	2	30	21	0	0
1	1	50	21	0	0	1	2	50	21	8	0
1	1	50	21	0	0	1	2	50	21	8	0
1	1	4	22	0	0	1	2	4	22	0	0
1	1	4	22	0	0	1	2	4	22	0	0
1	1	5	22	0	0	1	2	5	22	0	0
1	1	5	22	0	0	1	2	5	22	0	0
1	1	10	22	0	0	1	2	10	22	0	0
1	1	10	22	0	0	1	2	10	22	0	0
1	1	20	22	0	0	1	2	20	22	0	0
1	1	20	22	0	0	1	2	20	22	0	0
1	1	30	22	0	0	1	2	30	22	0	0
1	1	30	22	0	0	1	2	30	22	0	0
1	1	50	22	0	0	1	2	50	22	8	0
1	1	50	22	0	0	1	2	50	22	8	0
1	1	4	23	0	0	1	2	4	23	0	0

1	1	4	23	0	0	1	2	4	23	0	0
1	1	5	23	0	0	1	2	5	23	0	0
1	1	5	23	0	0	1	2	5	23	0	0
1	1	10	23	0	0	1	2	10	23	0	0
1	1	10	23	0	0	1	2	10	23	0	0
1	1	20	23	0	0	1	2	20	23	0	0
1	1	20	23	0	0	1	2	20	23	0	0
1	1	30	23	0	0	1	2	30	23	0	0
1	1	30	23	0	0	1	2	30	23	0	0
1	1	50	23	0	0	1	2	50	23	8	0
1	1	50	23	0	0	1	2	50	23	8	0
1	1	4	24	0	0	1	2	4	24	0	0
1	1	4	24	0	0	1	2	4	24	0	0
1	1	5	24	0	0	1	2	5	24	0	0
1	1	5	24	0	0	1	2	5	24	0	0
1	1	10	24	0	0	1	2	10	24	0	0
1	1	10	24	0	0	1	2	10	24	0	0
1	1	20	24	0	0	1	2	20	24	0	0
1	1	20	24	0	0	1	2	20	24	0	0
1	1	30	24	0	0	1	2	30	24	0	0
1	1	30	24	0	0	1	2	30	24	0	0
1	1	50	24	0	0	1	2	50	24	7	0
1	1	50	24	0	0	1	2	50	24	7	0
1	1	4	25	0	0	1	2	4	25	0	0
1	1	4	25	0	0	1	2	4	25	0	0
1	1	5	25	0	0	1	2	5	25	0	0
1	1	5	25	0	0	1	2	5	25	0	0
1	1	10	25	0	0	1	2	10	25	0	0
1	1	10	25	0	0	1	2	10	25	0	0
1	1	20	25	0	0	1	2	20	25	0	0
1	1	20	25	0	0	1	2	20	25	0	0
1	1	30	25	0	0	1	2	30	25	0	0
1	1	30	25	0	0	1	2	30	25	0	0
1	1	50	25	0	0	1	2	50	25	8	0
1	1	50	25	0	0	1	2	50	25	8	0
1	1	4	26	0	0	1	2	4	26	0	0
1	1	4	26	0	0	1	2	4	26	0	0
1	1	5	26	0	0	1	2	5	26	0	0
1	1	5	26	0	0	1	2	5	26	0	0
1	1	10	26	0	0	1	2	10	26	0	0
1	1	10	26	0	0	1	2	10	26	0	0
1	1	20	26	0	0	1	2	20	26	0	0
1	1	20	26	0	0	1	2	20	26	0	0
1	1	30	26	0	0	1	2	30	26	0	0
1	1	30	26	0	0	1	2	30	26	0	0
1	1	50	26	0	0	1	2	50	26	8	0
1	1	50	26	0	0	1	2	50	26	8	0
1	1	4	27	0	0	1	2	4	27	0	0
1	1	4	27	0	0	1	2	4	27	0	0
1	1	5	27	0	0	1	2	5	27	0	0
1	1	5	27	0	0	1	2	5	27	0	0
1	1	10	27	0	0	1	2	10	27	0	0
1	1	10	27	0	0	1	2	10	27	0	0
1	1	20	27	0	0	1	2	20	27	0	0
1	1	20	27	0	0	1	2	20	27	0	0

1	1	30	27	0	0	1	2	30	27	0	0
1	1	30	27	0	0	1	2	30	27	0	0
1	1	50	27	0	0	1	2	50	27	0	0
1	1	50	27	0	0	1	2	50	27	0	0
1	1	4	28	0	0	1	2	4	28	0	0
1	1	4	28	0	0	1	2	4	28	0	0
1	1	5	28	0	0	1	2	5	28	0	0
1	1	5	28	0	0	1	2	5	28	0	0
1	1	10	28	0	0	1	2	10	28	0	0
1	1	10	28	0	0	1	2	10	28	0	0
1	1	20	28	0	0	1	2	20	28	0	0
1	1	20	28	0	0	1	2	20	28	0	0
1	1	30	28	0	0	1	2	30	28	0	0
1	1	30	28	0	0	1	2	30	28	0	0
1	1	50	28	0	0	1	2	50	28	8	0
1	1	50	28	0	0	1	2	50	28	8	0
1	1	4	30	0	0	1	2	4	30	0	0
1	1	4	30	0	0	1	2	4	30	0	0
1	1	5	30	0	0	1	2	5	30	0	0
1	1	5	30	0	0	1	2	5	30	0	0
1	1	10	30	0	0	1	2	10	30	0	0
1	1	10	30	0	0	1	2	10	30	0	0
1	1	20	30	0	0	1	2	20	30	0	0
1	1	20	30	0	0	1	2	20	30	0	0
1	1	30	30	0	0	1	2	30	30	0	0
1	1	30	30	0	0	1	2	30	30	0	0
1	1	50	30	0	0	1	2	50	30	0	0
1	1	50	30	0	0	1	2	50	30	0	0
2	1	4	1	0	0	2	2	4	1	0	0
2	1	4	1	0	0	2	2	4	1	0	0
2	1	5	1	0	0	2	2	5	1	0	0
2	1	5	1	0	0	2	2	5	1	0	0
2	1	10	1	1	0	2	2	10	1	8	0
2	1	10	1	1	0	2	2	10	1	8	0
2	1	20	1	6	0	2	2	20	1	8	6
2	1	20	1	6	0	2	2	20	1	8	3
2	1	30	1	8	0	2	2	30	1	8	7
2	1	30	1	8	0	2	2	30	1	8	7
2	1	50	1	8	0	2	2	50	1	8	8
2	1	50	1	8	2	2	2	50	1	8	8
2	1	4	2	0	0	2	2	4	2	0	0
2	1	4	2	0	0	2	2	4	2	0	0
2	1	5	2	0	0	2	2	5	2	0	0
2	1	5	2	0	0	2	2	5	2	0	0
2	1	10	2	0	0	2	2	10	2	8	0
2	1	10	2	0	0	2	2	10	2	8	0
2	1	20	2	7	0	2	2	20	2	8	8
2	1	20	2	7	0	2	2	20	2	8	8
2	1	30	2	8	0	2	2	30	2	8	8
2	1	30	2	8	0	2	2	30	2	8	8
2	1	50	2	8	0	2	2	50	2	8	8
2	1	50	2	8	2	2	2	50	2	8	8
2	1	4	3	0	0	2	2	4	3	0	0
2	1	4	3	0	0	2	2	4	3	0	0

2	1	5	3	0	0	2	2	5	3	0	0
2	1	5	3	0	0	2	2	5	3	0	0
2	1	10	3	0	0	2	2	10	3	5	0
2	1	10	3	0	0	2	2	10	3	5	0
2	1	20	3	6	0	2	2	20	3	8	8
2	1	20	3	6	0	2	2	20	3	8	8
2	1	30	3	2	0	2	2	30	3	8	8
2	1	30	3	2	0	2	2	30	3	8	8
2	1	50	3	8	2	2	2	50	3	8	8
2	1	50	3	8	2	2	2	50	3	8	8
2	1	4	4	0	0	2	2	4	4	0	0
2	1	4	4	0	0	2	2	4	4	0	0
2	1	5	4	0	0	2	2	5	4	0	0
2	1	5	4	0	0	2	2	5	4	0	0
2	1	10	4	0	0	2	2	10	4	5	0
2	1	10	4	0	0	2	2	10	4	4	0
2	1	20	4	6	0	2	2	20	4	8	8
2	1	20	4	6	0	2	2	20	4	8	8
2	1	30	4	7	4	2	2	30	4	8	8
2	1	30	4	7	4	2	2	30	4	8	8
2	1	50	4	7	7	2	2	50	4	8	8
2	1	50	4	7	7	2	2	50	4	8	8
2	1	4	5	0	0	2	2	4	5	0	0
2	1	4	5	0	0	2	2	4	5	0	0
2	1	5	5	0	0	2	2	5	5	0	0
2	1	5	5	0	0	2	2	5	5	0	0
2	1	10	5	0	0	2	2	10	5	2	0
2	1	10	5	0	0	2	2	10	5	1	0
2	1	20	5	7	0	2	2	20	5	8	8
2	1	20	5	7	0	2	2	20	5	8	8
2	1	30	5	7	4	2	2	30	5	8	8
2	1	30	5	7	4	2	2	30	5	8	8
2	1	50	5	8	7	2	2	50	5	8	8
2	1	50	5	8	7	2	2	50	5	8	8
2	1	4	6	0	0	2	2	4	6	0	0
2	1	4	6	0	0	2	2	4	6	0	0
2	1	5	6	0	0	2	2	5	6	0	0
2	1	5	6	0	0	2	2	5	6	0	0
2	1	10	6	0	0	2	2	10	6	8	0
2	1	10	6	0	0	2	2	10	6	8	0
2	1	20	6	7	0	2	2	20	6	8	8
2	1	20	6	7	0	2	2	20	6	8	8
2	1	30	6	7	1	2	2	30	6	8	8
2	1	30	6	7	3	2	2	30	6	8	8
2	1	50	6	8	8	2	2	50	6	8	8
2	1	50	6	8	8	2	2	50	6	8	8
2	1	4	7	0	0	2	2	4	7	0	0
2	1	4	7	0	0	2	2	4	7	0	0
2	1	5	7	0	0	2	2	5	7	0	0
2	1	5	7	0	0	2	2	5	7	0	0
2	1	10	7	0	0	2	2	10	7	6	0
2	1	10	7	0	0	2	2	10	7	6	0
2	1	20	7	6	0	2	2	20	7	8	8

2	1	20	7	6	0	2	2	20	7	8	8
2	1	30	7	8	4	2	2	30	7	8	8
2	1	30	7	8	4	2	2	30	7	8	8
2	1	50	7	8	7	2	2	50	7	8	8
2	1	50	7	8	8	2	2	50	7	8	8
2	1	4	8	0	0	2	2	4	8	0	0
2	1	4	8	0	0	2	2	4	8	0	0
2	1	5	8	0	0	2	2	5	8	0	0
2	1	5	8	0	0	2	2	5	8	0	0
2	1	10	8	0	0	2	2	10	8	8	0
2	1	10	8	0	0	2	2	10	8	8	0
2	1	20	8	1	0	2	2	20	8	8	7
2	1	20	8	1	0	2	2	20	8	8	6
2	1	30	8	7	0	2	2	30	8	8	8
2	1	30	8	7	0	2	2	30	8	8	8
2	1	50	8	8	3	2	2	50	8	8	8
2	1	50	8	8	3	2	2	50	8	8	8
2	1	4	9	0	0	2	2	4	9	0	0
2	1	4	9	0	0	2	2	4	9	0	0
2	1	5	9	0	0	2	2	5	9	0	0
2	1	5	9	0	0	2	2	5	9	0	0
2	1	10	9	0	0	2	2	10	9	1	0
2	1	10	9	0	0	2	2	10	9	1	0
2	1	20	9	5	0	2	2	20	9	7	8
2	1	20	9	5	0	2	2	20	9	8	8
2	1	30	9	6	0	2	2	30	9	8	8
2	1	30	9	6	0	2	2	30	9	8	8
2	1	50	9	8	1	2	2	50	9	8	8
2	1	50	9	8	1	2	2	50	9	8	8
2	1	4	10	0	0	2	2	4	10	0	0
2	1	4	10	0	0	2	2	4	10	0	0
2	1	5	10	0	0	2	2	5	10	0	0
2	1	5	10	0	0	2	2	5	10	0	0
2	1	10	10	0	0	2	2	10	10	0	0
2	1	10	10	0	0	2	2	10	10	0	0
2	1	20	10	5	0	2	2	20	10	8	8
2	1	20	10	5	0	2	2	20	10	8	8
2	1	30	10	7	0	2	2	30	10	8	8
2	1	30	10	7	0	2	2	30	10	8	8
2	1	50	10	6	3	2	2	50	10	8	8
2	1	50	10	6	3	2	2	50	10	8	8
2	1	4	11	0	0	2	2	4	11	0	0
2	1	4	11	0	0	2	2	4	11	0	0
2	1	5	11	0	0	2	2	5	11	0	0
2	1	5	11	0	0	2	2	5	11	0	0
2	1	10	11	0	0	2	2	10	11	5	0
2	1	10	11	0	0	2	2	10	11	6	0
2	1	20	11	7	0	2	2	20	11	8	8
2	1	20	11	7	0	2	2	20	11	8	8
2	1	30	11	7	0	2	2	30	11	8	8
2	1	30	11	7	0	2	2	30	11	8	8
2	1	50	11	7	2	2	2	50	11	8	8
2	1	50	11	7	2	2	2	50	11	8	8

2	1	4	12	0	0	2	2	4	12	0	0
2	1	4	12	0	0	2	2	4	12	0	0
2	1	5	12	0	0	2	2	5	12	0	0
2	1	5	12	0	0	2	2	5	12	0	0
2	1	10	12	0	0	2	2	10	12	0	0
2	1	10	12	0	0	2	2	10	12	0	0
2	1	20	12	7	0	2	2	20	12	3	8
2	1	20	12	7	0	2	2	20	12	2	8
2	1	30	12	7	0	2	2	30	12	6	8
2	1	30	12	7	0	2	2	30	12	7	8
2	1	50	12	7	2	2	2	50	12	8	8
2	1	50	12	7	2	2	2	50	12	8	8
2	1	4	13	0	0	2	2	4	13	0	0
2	1	4	13	0	0	2	2	4	13	0	0
2	1	5	13	0	0	2	2	5	13	0	0
2	1	5	13	0	0	2	2	5	13	0	0
2	1	10	13	0	0	2	2	10	13	5	0
2	1	10	13	0	0	2	2	10	13	5	0
2	1	20	13	4	0	2	2	20	13	8	8
2	1	20	13	4	0	2	2	20	13	8	8
2	1	30	13	8	0	2	2	30	13	8	8
2	1	30	13	8	0	2	2	30	13	8	8
2	1	50	13	8	4	2	2	50	13	8	8
2	1	50	13	8	4	2	2	50	13	8	8
2	1	4	14	0	0	2	2	4	14	0	0
2	1	4	14	0	0	2	2	4	14	0	0
2	1	5	14	0	0	2	2	5	14	0	0
2	1	5	14	0	0	2	2	5	14	0	0
2	1	10	14	0	0	2	2	10	14	4	0
2	1	10	14	0	0	2	2	10	14	7	0
2	1	20	14	7	0	2	2	20	14	8	8
2	1	20	14	7	0	2	2	20	14	8	8
2	1	30	14	8	0	2	2	30	14	8	8
2	1	30	14	8	0	2	2	30	14	8	8
2	1	50	14	8	8	2	2	50	14	8	8
2	1	50	14	8	8	2	2	50	14	8	8
2	1	4	15	0	0	2	2	4	15	0	0
2	1	4	15	0	0	2	2	4	15	0	0
2	1	5	15	0	0	2	2	5	15	0	0
2	1	5	15	0	0	2	2	5	15	0	0
2	1	10	15	0	0	2	2	10	15	5	0
2	1	10	15	0	0	2	2	10	15	5	0
2	1	20	15	5	0	2	2	20	15	8	8
2	1	20	15	5	0	2	2	20	15	8	8
2	1	30	15	5	1	2	2	30	15	8	8
2	1	30	15	5	3	2	2	30	15	8	8
2	1	50	15	8	8	2	2	50	15	8	8
2	1	50	15	8	8	2	2	50	15	8	8
2	1	4	16	0	0	2	2	4	16	0	0
2	1	4	16	0	0	2	2	4	16	0	0
2	1	5	16	0	0	2	2	5	16	0	0
2	1	5	16	0	0	2	2	5	16	0	0
2	1	10	16	0	0	2	2	10	16	7	0

2	1	10	16	0	0	2	2	10	16	6	0
2	1	20	16	7	0	2	2	20	16	8	5
2	1	20	16	7	0	2	2	20	16	8	3
2	1	30	16	7	2	2	2	30	16	8	8
2	1	30	16	7	3	2	2	30	16	8	8
2	1	50	16	8	7	2	2	50	16	8	8
2	1	50	16	8	7	2	2	50	16	8	8
2	1	4	21	0	0	2	2	4	21	0	0
2	1	4	21	0	0	2	2	4	21	0	0
2	1	5	21	0	0	2	2	5	21	0	0
2	1	5	21	0	0	2	2	5	21	0	0
2	1	10	21	0	0	2	2	10	21	8	0
2	1	10	21	0	0	2	2	10	21	8	0
2	1	20	21	0	0	2	2	20	21	8	5
2	1	20	21	0	0	2	2	20	21	8	5
2	1	30	21	0	0	2	2	30	21	8	8
2	1	30	21	0	0	2	2	30	21	8	8
2	1	50	21	7	0	2	2	50	21	8	8
2	1	50	21	7	0	2	2	50	21	8	8
2	1	4	22	0	0	2	2	4	22	0	0
2	1	4	22	0	0	2	2	4	22	0	0
2	1	5	22	0	0	2	2	5	22	0	0
2	1	5	22	0	0	2	2	5	22	0	0
2	1	10	22	0	0	2	2	10	22	5	0
2	1	10	22	0	0	2	2	10	22	6	0
2	1	20	22	0	0	2	2	20	22	8	4
2	1	20	22	0	0	2	2	20	22	8	3
2	1	30	22	0	0	2	2	30	22	8	8
2	1	30	22	0	0	2	2	30	22	8	8
2	1	50	22	7	0	2	2	50	22	8	8
2	1	50	22	7	0	2	2	50	22	8	8
2	1	4	23	0	0	2	2	4	23	0	0
2	1	4	23	0	0	2	2	4	23	0	0
2	1	5	23	0	0	2	2	5	23	0	0
2	1	5	23	0	0	2	2	5	23	0	0
2	1	10	23	0	0	2	2	10	23	6	0
2	1	10	23	0	0	2	2	10	23	6	0
2	1	20	23	0	0	2	2	20	23	8	0
2	1	20	23	0	0	2	2	20	23	8	0
2	1	30	23	0	0	2	2	30	23	8	8
2	1	30	23	0	0	2	2	30	23	8	7
2	1	50	23	7	0	2	2	50	23	8	8
2	1	50	23	7	0	2	2	50	23	8	8
2	1	4	24	0	0	2	2	4	24	0	0
2	1	4	24	0	0	2	2	4	24	0	0
2	1	5	24	0	0	2	2	5	24	0	0
2	1	5	24	0	0	2	2	5	24	0	0
2	1	10	24	0	0	2	2	10	24	8	0
2	1	10	24	0	0	2	2	10	24	7	0
2	1	20	24	8	0	2	2	20	24	8	4
2	1	20	24	8	0	2	2	20	24	8	4
2	1	30	24	8	6	2	2	30	24	8	8
2	1	30	24	8	7	2	2	30	24	8	8

2	1	50	24	8	8	2	2	50	24	8	8
2	1	50	24	8	8	2	2	50	24	8	8
2	1	4	25	0	0	2	2	4	25	0	0
2	1	4	25	0	0	2	2	4	25	0	0
2	1	5	25	0	0	2	2	5	25	0	0
2	1	5	25	0	0	2	2	5	25	0	0
2	1	10	25	0	0	2	2	10	25	7	0
2	1	10	25	0	0	2	2	10	25	7	0
2	1	20	25	8	0	2	2	20	25	8	3
2	1	20	25	8	0	2	2	20	25	8	4
2	1	30	25	8	8	2	2	30	25	8	8
2	1	30	25	8	8	2	2	30	25	8	8
2	1	50	25	8	8	2	2	50	25	8	8
2	1	50	25	8	8	2	2	50	25	8	8
2	1	4	26	0	0	2	2	4	26	0	0
2	1	4	26	0	0	2	2	4	26	0	0
2	1	5	26	0	0	2	2	5	26	0	0
2	1	5	26	0	0	2	2	5	26	0	0
2	1	10	26	0	0	2	2	10	26	8	0
2	1	10	26	0	0	2	2	10	26	8	0
2	1	20	26	8	0	2	2	20	26	8	8
2	1	20	26	8	0	2	2	20	26	8	8
2	1	30	26	8	4	2	2	30	26	8	8
2	1	30	26	8	3	2	2	30	26	8	8
2	1	50	26	8	8	2	2	50	26	8	8
2	1	50	26	8	8	2	2	50	26	8	8
2	1	4	27	0	0	2	2	4	27	0	0
2	1	4	27	0	0	2	2	4	27	0	0
2	1	5	27	0	0	2	2	5	27	0	0
2	1	5	27	0	0	2	2	5	27	0	0
2	1	10	27	0	0	2	2	10	27	4	0
2	1	10	27	0	0	2	2	10	27	4	0
2	1	20	27	8	0	2	2	20	27	8	6
2	1	20	27	8	0	2	2	20	27	8	7
2	1	30	27	8	5	2	2	30	27	8	8
2	1	30	27	8	6	2	2	30	27	8	8
2	1	50	27	8	8	2	2	50	27	8	8
2	1	50	27	8	8	2	2	50	27	8	8
2	1	4	28	0	0	2	2	4	28	0	0
2	1	4	28	0	0	2	2	4	28	0	0
2	1	5	28	0	0	2	2	5	28	0	0
2	1	5	28	0	0	2	2	5	28	0	0
2	1	10	28	0	0	2	2	10	28	8	0
2	1	10	28	0	0	2	2	10	28	8	0
2	1	20	28	8	0	2	2	20	28	8	8
2	1	20	28	8	0	2	2	20	28	8	8
2	1	30	28	8	6	2	2	30	28	8	8
2	1	30	28	8	6	2	2	30	28	8	8
2	1	50	28	8	8	2	2	50	28	8	8
2	1	50	28	8	8	2	2	50	28	8	8
2	1	4	30	0	0	2	2	4	30	0	0
2	1	4	30	0	0	2	2	4	30	0	0
2	1	5	30	0	0	2	2	5	30	0	0

2	1	5	30	0	0	2	2	5	30	0	0
2	1	10	30	0	0	2	2	10	30	0	0
2	1	10	30	0	0	2	2	10	30	0	0
2	1	20	30	0	0	2	2	20	30	0	0
2	1	20	30	0	0	2	2	20	30	0	0
2	1	30	30	0	0	2	2	30	30	5	0
2	1	30	30	0	0	2	2	30	30	4	0
2	1	50	30	0	0	2	2	50	30	7	0
2	1	50	30	0	0	2	2	50	30	6	0
3	1	4	1	0	0	3	2	4	1	0	0
3	1	4	1	0	0	3	2	4	1	0	0
3	1	5	1	0	0	3	2	5	1	0	0
3	1	5	1	0	0	3	2	5	1	0	0
3	1	10	1	2	0	3	2	10	1	0	0
3	1	10	1	2	0	3	2	10	1	0	0
3	1	20	1	0	0	3	2	20	1	5	0
3	1	20	1	0	0	3	2	20	1	5	0
3	1	30	1	6	6	3	2	30	1	8	0
3	1	30	1	6	6	3	2	30	1	8	0
3	1	50	1	8	6	3	2	50	1	8	6
3	1	50	1	8	6	3	2	50	1	8	6
3	1	4	2	0	0	3	2	4	2	0	0
3	1	4	2	0	0	3	2	4	2	0	0
3	1	5	2	0	0	3	2	5	2	0	0
3	1	5	2	0	0	3	2	5	2	0	0
3	1	10	2	0	0	3	2	10	2	1	0
3	1	10	2	0	0	3	2	10	2	0	0
3	1	20	2	0	0	3	2	20	2	8	0
3	1	20	2	0	0	3	2	20	2	8	0
3	1	30	2	6	6	3	2	30	2	8	0
3	1	30	2	6	6	3	2	30	2	8	0
3	1	50	2	8	6	3	2	50	2	8	8
3	1	50	2	8	6	3	2	50	2	8	8
3	1	4	3	0	0	3	2	4	3	0	0
3	1	4	3	0	0	3	2	4	3	0	0
3	1	5	3	0	0	3	2	5	3	0	0
3	1	5	3	0	0	3	2	5	3	0	0
3	1	10	3	0	0	3	2	10	3	0	0
3	1	10	3	0	0	3	2	10	3	0	0
3	1	20	3	0	0	3	2	20	3	3	0
3	1	20	3	0	0	3	2	20	3	3	0
3	1	30	3	1	4	3	2	30	3	7	2
3	1	30	3	1	4	3	2	30	3	8	2
3	1	50	3	8	8	3	2	50	3	8	6
3	1	50	3	8	8	3	2	50	3	8	7
3	1	4	4	0	0	3	2	4	4	0	0
3	1	4	4	0	0	3	2	4	4	0	0
3	1	5	4	0	0	3	2	5	4	0	0
3	1	5	4	0	0	3	2	5	4	0	0
3	1	10	4	0	0	3	2	10	4	0	0
3	1	10	4	0	0	3	2	10	4	1	0
3	1	20	4	0	0	3	2	20	4	3	0
3	1	20	4	0	0	3	2	20	4	4	0

3	1	30	4	5	0	3	2	30	4	7	3
3	1	30	4	5	0	3	2	30	4	8	3
3	1	50	4	7	6	3	2	50	4	8	7
3	1	50	4	7	6	3	2	50	4	8	7
3	1	4	5	0	0	3	2	4	5	0	0
3	1	4	5	0	0	3	2	4	5	0	0
3	1	5	5	0	0	3	2	5	5	0	0
3	1	5	5	0	0	3	2	5	5	0	0
3	1	10	5	1	0	3	2	10	5	0	0
3	1	10	5	1	0	3	2	10	5	0	0
3	1	20	5	7	5	3	2	20	5	1	0
3	1	20	5	7	5	3	2	20	5	0	0
3	1	30	5	7	8	3	2	30	5	5	0
3	1	30	5	7	8	3	2	30	5	5	0
3	1	50	5	8	8	3	2	50	5	8	8
3	1	50	5	8	8	3	2	50	5	8	8
3	1	4	6	0	0	3	2	4	6	0	0
3	1	4	6	0	0	3	2	4	6	0	0
3	1	5	6	0	0	3	2	5	6	0	0
3	1	5	6	0	0	3	2	5	6	0	0
3	1	10	6	0	0	3	2	10	6	0	0
3	1	10	6	0	0	3	2	10	6	0	0
3	1	20	6	2	2	3	2	20	6	8	0
3	1	20	6	2	2	3	2	20	6	8	0
3	1	30	6	7	8	3	2	30	6	8	0
3	1	30	6	7	8	3	2	30	6	8	0
3	1	50	6	8	8	3	2	50	6	8	8
3	1	50	6	8	8	3	2	50	6	8	8
3	1	4	7	0	0	3	2	4	7	0	0
3	1	4	7	0	0	3	2	4	7	0	0
3	1	5	7	0	0	3	2	5	7	0	0
3	1	5	7	0	0	3	2	5	7	0	0
3	1	10	7	5	0	3	2	10	7	0	0
3	1	10	7	5	0	3	2	10	7	0	0
3	1	20	7	7	4	3	2	20	7	4	0
3	1	20	7	7	4	3	2	20	7	4	0
3	1	30	7	8	8	3	2	30	7	6	4
3	1	30	7	8	8	3	2	30	7	6	5
3	1	50	7	8	8	3	2	50	7	6	6
3	1	50	7	8	8	3	2	50	7	6	6
3	1	4	8	0	0	3	2	4	8	0	0
3	1	4	8	0	0	3	2	4	8	0	0
3	1	5	8	0	0	3	2	5	8	0	0
3	1	5	8	0	0	3	2	5	8	0	0
3	1	10	8	1	0	3	2	10	8	0	0
3	1	10	8	1	0	3	2	10	8	0	0
3	1	20	8	3	0	3	2	20	8	6	0
3	1	20	8	3	0	3	2	20	8	6	0
3	1	30	8	6	3	3	2	30	8	8	4
3	1	30	8	6	4	3	2	30	8	8	3
3	1	50	8	7	7	3	2	50	8	8	6
3	1	50	8	7	7	3	2	50	8	8	7
3	1	4	9	0	0	3	2	4	9	0	0

3	1	4	9	0	0	3	2	4	9	0	0
3	1	5	9	0	0	3	2	5	9	0	0
3	1	5	9	0	0	3	2	5	9	0	0
3	1	10	9	0	0	3	2	10	9	0	0
3	1	10	9	0	0	3	2	10	9	0	0
3	1	20	9	5	0	3	2	20	9	2	0
3	1	20	9	5	0	3	2	20	9	2	0
3	1	30	9	6	4	3	2	30	9	6	0
3	1	30	9	6	4	3	2	30	9	6	0
3	1	50	9	8	7	3	2	50	9	8	3
3	1	50	9	8	7	3	2	50	9	8	3
3	1	4	10	0	0	3	2	4	10	0	0
3	1	4	10	0	0	3	2	4	10	0	0
3	1	5	10	0	0	3	2	5	10	0	0
3	1	5	10	0	0	3	2	5	10	0	0
3	1	10	10	0	0	3	2	10	10	0	0
3	1	10	10	0	0	3	2	10	10	0	0
3	1	20	10	5	0	3	2	20	10	1	0
3	1	20	10	5	0	3	2	20	10	1	0
3	1	30	10	7	4	3	2	30	10	6	0
3	1	30	10	7	4	3	2	30	10	6	0
3	1	50	10	8	7	3	2	50	10	8	5
3	1	50	10	8	7	3	2	50	10	8	6
3	1	4	11	0	0	3	2	4	11	0	0
3	1	4	11	0	0	3	2	4	11	0	0
3	1	5	11	0	0	3	2	5	11	0	0
3	1	5	11	0	0	3	2	5	11	0	0
3	1	10	11	5	0	3	2	10	11	0	0
3	1	10	11	5	0	3	2	10	11	0	0
3	1	20	11	4	0	3	2	20	11	0	0
3	1	20	11	4	0	3	2	20	11	0	0
3	1	30	11	7	3	3	2	30	11	8	1
3	1	30	11	7	3	3	2	30	11	7	2
3	1	50	11	6	6	3	2	50	11	8	4
3	1	50	11	6	6	3	2	50	11	8	6
3	1	4	12	0	0	3	2	4	12	0	0
3	1	4	12	0	0	3	2	4	12	0	0
3	1	5	12	0	0	3	2	5	12	0	0
3	1	5	12	0	0	3	2	5	12	0	0
3	1	10	12	0	0	3	2	10	12	4	0
3	1	10	12	0	0	3	2	10	12	5	0
3	1	20	12	4	0	3	2	20	12	7	0
3	1	20	12	4	0	3	2	20	12	8	0
3	1	30	12	7	5	3	2	30	12	8	0
3	1	30	12	7	5	3	2	30	12	8	0
3	1	50	12	8	7	3	2	50	12	8	3
3	1	50	12	8	7	3	2	50	12	8	3
3	1	4	13	0	0	3	2	4	13	0	0
3	1	4	13	0	0	3	2	4	13	0	0
3	1	5	13	0	0	3	2	5	13	0	0
3	1	5	13	0	0	3	2	5	13	0	0
3	1	10	13	0	0	3	2	10	13	0	0
3	1	10	13	0	0	3	2	10	13	0	0

3	1	20	13	6	0	3	2	20	13	1	0
3	1	20	13	6	0	3	2	20	13	1	0
3	1	30	13	7	4	3	2	30	13	8	0
3	1	30	13	7	4	3	2	30	13	8	0
3	1	50	13	8	4	3	2	50	13	8	8
3	1	50	13	8	5	3	2	50	13	8	8
3	1	4	14	0	0	3	2	4	14	0	0
3	1	4	14	0	0	3	2	4	14	0	0
3	1	5	14	0	0	3	2	5	14	0	0
3	1	5	14	0	0	3	2	5	14	0	0
3	1	10	14	6	0	3	2	10	14	0	0
3	1	10	14	6	0	3	2	10	14	0	0
3	1	20	14	7	4	3	2	20	14	3	0
3	1	20	14	7	5	3	2	20	14	4	0
3	1	30	14	8	8	3	2	30	14	7	0
3	1	30	14	8	8	3	2	30	14	8	0
3	1	50	14	8	8	3	2	50	14	8	8
3	1	50	14	8	8	3	2	50	14	8	8
3	1	4	15	0	0	3	2	4	15	0	0
3	1	4	15	0	0	3	2	4	15	0	0
3	1	5	15	0	0	3	2	5	15	0	0
3	1	5	15	0	0	3	2	5	15	0	0
3	1	10	15	6	0	3	2	10	15	0	0
3	1	10	15	6	0	3	2	10	15	0	0
3	1	20	15	7	4	3	2	20	15	3	0
3	1	20	15	7	4	3	2	20	15	4	0
3	1	30	15	8	8	3	2	30	15	7	0
3	1	30	15	8	8	3	2	30	15	7	0
3	1	50	15	8	8	3	2	50	15	8	8
3	1	50	15	8	8	3	2	50	15	8	8
3	1	4	16	0	0	3	2	4	16	0	0
3	1	4	16	0	0	3	2	4	16	0	0
3	1	5	16	0	0	3	2	5	16	0	0
3	1	5	16	0	0	3	2	5	16	0	0
3	1	10	16	1	0	3	2	10	16	0	0
3	1	10	16	1	0	3	2	10	16	0	0
3	1	20	16	6	0	3	2	20	16	6	0
3	1	20	16	6	0	3	2	20	16	5	0
3	1	30	16	7	4	3	2	30	16	7	8
3	1	30	16	7	5	3	2	30	16	7	8
3	1	50	16	7	8	3	2	50	16	7	8
3	1	50	16	7	7	3	2	50	16	7	8
3	1	4	21	0	0	3	2	4	21	0	0
3	1	4	21	0	0	3	2	4	21	0	0
3	1	5	21	0	0	3	2	5	21	3	0
3	1	5	21	0	0	3	2	5	21	2	0
3	1	10	21	0	0	3	2	10	21	8	0
3	1	10	21	0	0	3	2	10	21	7	0
3	1	20	21	0	0	3	2	20	21	8	0
3	1	20	21	0	0	3	2	20	21	8	0
3	1	30	21	0	0	3	2	30	21	8	8
3	1	30	21	0	0	3	2	30	21	8	8
3	1	50	21	0	0	3	2	50	21	8	8

3	1	50	21	0	0	3	2	50	21	8	8
3	1	4	22	0	0	3	2	4	22	0	0
3	1	4	22	0	0	3	2	4	22	0	0
3	1	5	22	0	0	3	2	5	22	0	0
3	1	5	22	0	0	3	2	5	22	0	0
3	1	10	22	0	0	3	2	10	22	5	0
3	1	10	22	0	0	3	2	10	22	5	0
3	1	20	22	0	0	3	2	20	22	8	0
3	1	20	22	0	0	3	2	20	22	8	0
3	1	30	22	0	0	3	2	30	22	8	8
3	1	30	22	0	0	3	2	30	22	8	8
3	1	50	22	0	0	3	2	50	22	8	8
3	1	50	22	0	0	3	2	50	22	8	8
3	1	4	23	0	0	3	2	4	23	0	0
3	1	4	23	0	0	3	2	4	23	0	0
3	1	5	23	0	0	3	2	5	23	0	0
3	1	5	23	0	0	3	2	5	23	0	0
3	1	10	23	0	0	3	2	10	23	7	0
3	1	10	23	0	0	3	2	10	23	8	0
3	1	20	23	0	0	3	2	20	23	8	0
3	1	20	23	0	0	3	2	20	23	8	0
3	1	30	23	0	0	3	2	30	23	8	8
3	1	30	23	0	0	3	2	30	23	8	8
3	1	50	23	0	0	3	2	50	23	8	8
3	1	50	23	0	0	3	2	50	23	8	8
3	1	4	24	0	0	3	2	4	24	0	0
3	1	4	24	0	0	3	2	4	24	0	0
3	1	5	24	0	0	3	2	5	24	0	0
3	1	5	24	0	0	3	2	5	24	0	0
3	1	10	24	0	0	3	2	10	24	3	0
3	1	10	24	0	0	3	2	10	24	2	0
3	1	20	24	0	0	3	2	20	24	7	0
3	1	20	24	0	0	3	2	20	24	7	0
3	1	30	24	2	3	3	2	30	24	8	8
3	1	30	24	2	3	3	2	30	24	8	8
3	1	50	24	8	4	3	2	50	24	8	8
3	1	50	24	7	5	3	2	50	24	8	8
3	1	4	25	0	0	3	2	4	25	0	0
3	1	4	25	0	0	3	2	4	25	0	0
3	1	5	25	0	0	3	2	5	25	0	0
3	1	5	25	0	0	3	2	5	25	0	0
3	1	10	25	0	0	3	2	10	25	3	0
3	1	10	25	0	0	3	2	10	25	3	0
3	1	20	25	0	0	3	2	20	25	8	0
3	1	20	25	0	0	3	2	20	25	8	0
3	1	30	25	3	3	3	2	30	25	8	7
3	1	30	25	3	3	3	2	30	25	8	8
3	1	50	25	8	8	3	2	50	25	8	8
3	1	50	25	8	8	3	2	50	25	8	8
3	1	4	26	0	0	3	2	4	26	0	0
3	1	4	26	0	0	3	2	4	26	0	0
3	1	5	26	0	0	3	2	5	26	0	0
3	1	5	26	0	0	3	2	5	26	0	0

3	1	10	26	0	0	3	2	10	26	8	0
3	1	10	26	0	0	3	2	10	26	8	0
3	1	20	26	1	0	3	2	20	26	8	8
3	1	20	26	1	0	3	2	20	26	8	8
3	1	30	26	5	0	3	2	30	26	8	8
3	1	30	26	5	0	3	2	30	26	8	8
3	1	50	26	8	4	3	2	50	26	8	8
3	1	50	26	8	6	3	2	50	26	8	8
3	1	4	27	0	0	3	2	4	27	0	0
3	1	4	27	0	0	3	2	4	27	0	0
3	1	5	27	0	0	3	2	5	27	0	0
3	1	5	27	0	0	3	2	5	27	0	0
3	1	10	27	0	0	3	2	10	27	6	0
3	1	10	27	0	0	3	2	10	27	7	0
3	1	20	27	0	0	3	2	20	27	8	6
3	1	20	27	0	0	3	2	20	27	8	6
3	1	30	27	6	6	3	2	30	27	8	8
3	1	30	27	6	6	3	2	30	27	8	8
3	1	50	27	8	8	3	2	50	27	8	8
3	1	50	27	8	8	3	2	50	27	8	8
3	1	4	28	0	0	3	2	4	28	0	0
3	1	4	28	0	0	3	2	4	28	0	0
3	1	5	28	0	0	3	2	5	28	0	0
3	1	5	28	0	0	3	2	5	28	0	0
3	1	10	28	0	0	3	2	10	28	8	0
3	1	10	28	0	0	3	2	10	28	6	0
3	1	20	28	0	0	3	2	20	28	8	5
3	1	20	28	0	0	3	2	20	28	8	5
3	1	30	28	6	0	3	2	30	28	8	8
3	1	30	28	3	0	3	2	30	28	8	8
3	1	50	28	8	7	3	2	50	28	8	8
3	1	50	28	8	7	3	2	50	28	8	8
3	1	4	30	0	0	3	2	4	30	0	0
3	1	4	30	0	0	3	2	4	30	0	0
3	1	5	30	0	0	3	2	5	30	0	0
3	1	5	30	0	0	3	2	5	30	0	0
3	1	10	30	0	0	3	2	10	30	0	0
3	1	10	30	0	0	3	2	10	30	0	0
3	1	20	30	0	0	3	2	20	30	0	0
3	1	20	30	0	0	3	2	20	30	0	0
3	1	30	30	0	0	3	2	30	30	0	0
3	1	30	30	0	0	3	2	30	30	0	0
3	1	50	30	0	0	3	2	50	30	0	0
3	1	50	30	0	0	3	2	50	30	0	0
4	1	4	1	0	0	4	2	4	1	0	0
4	1	4	1	0	0	4	2	4	1	0	0
4	1	5	1	0	0	4	2	5	1	0	0
4	1	5	1	0	0	4	2	5	1	0	0
4	1	10	1	0	0	4	2	10	1	3	0
4	1	10	1	0	0	4	2	10	1	3	0
4	1	20	1	7	0	4	2	20	1	8	0
4	1	20	1	7	0	4	2	20	1	8	0
4	1	30	1	8	7	4	2	30	1	8	0

4	1	30	1	8	7	4	2	30	1	8	0
4	1	50	1	8	7	4	2	50	1	8	0
4	1	50	1	8	7	4	2	50	1	8	0
4	1	4	2	0	0	4	2	4	2	0	0
4	1	4	2	0	0	4	2	4	2	0	0
4	1	5	2	0	0	4	2	5	2	0	0
4	1	5	2	0	0	4	2	5	2	0	0
4	1	10	2	0	0	4	2	10	2	8	0
4	1	10	2	0	0	4	2	10	2	8	0
4	1	20	2	8	0	4	2	20	2	8	0
4	1	20	2	8	0	4	2	20	2	8	0
4	1	30	2	8	8	4	2	30	2	8	0
4	1	30	2	8	8	4	2	30	2	8	0
4	1	50	2	8	8	4	2	50	2	8	0
4	1	50	2	8	8	4	2	50	2	8	0
4	1	4	3	0	0	4	2	4	3	0	0
4	1	4	3	0	0	4	2	4	3	0	0
4	1	5	3	0	0	4	2	5	3	0	0
4	1	5	3	0	0	4	2	5	3	0	0
4	1	10	3	0	0	4	2	10	3	7	0
4	1	10	3	0	0	4	2	10	3	7	0
4	1	20	3	8	0	4	2	20	3	8	0
4	1	20	3	8	0	4	2	20	3	8	0
4	1	30	3	8	7	4	2	30	3	8	0
4	1	30	3	8	7	4	2	30	3	8	0
4	1	50	3	8	8	4	2	50	3	8	0
4	1	50	3	8	8	4	2	50	3	8	0
4	1	4	4	0	0	4	2	4	4	0	0
4	1	4	4	0	0	4	2	4	4	0	0
4	1	5	4	0	0	4	2	5	4	0	0
4	1	5	4	0	0	4	2	5	4	0	0
4	1	10	4	0	0	4	2	10	4	5	0
4	1	10	4	0	0	4	2	10	4	5	0
4	1	20	4	7	0	4	2	20	4	8	0
4	1	20	4	7	0	4	2	20	4	8	0
4	1	30	4	8	7	4	2	30	4	8	0
4	1	30	4	8	7	4	2	30	4	8	0
4	1	50	4	8	8	4	2	50	4	8	0
4	1	50	4	8	8	4	2	50	4	8	0
4	1	4	5	0	0	4	2	4	5	0	0
4	1	4	5	0	0	4	2	4	5	0	0
4	1	5	5	0	0	4	2	5	5	0	0
4	1	5	5	0	0	4	2	5	5	0	0
4	1	10	5	5	0	4	2	10	5	0	0
4	1	10	5	5	0	4	2	10	5	0	0
4	1	20	5	8	0	4	2	20	5	0	0
4	1	20	5	8	0	4	2	20	5	0	0
4	1	30	5	8	8	4	2	30	5	7	0
4	1	30	5	8	8	4	2	30	5	7	0
4	1	50	5	8	8	4	2	50	5	8	0
4	1	50	5	8	8	4	2	50	5	8	0
4	1	4	6	0	0	4	2	4	6	0	0
4	1	4	6	0	0	4	2	4	6	0	0

4	1	5	6	0	0	4	2	5	6	0	0
4	1	5	6	0	0	4	2	5	6	0	0
4	1	10	6	4	0	4	2	10	6	3	0
4	1	10	6	4	0	4	2	10	6	3	0
4	1	20	6	8	0	4	2	20	6	7	0
4	1	20	6	8	0	4	2	20	6	7	0
4	1	30	6	8	7	4	2	30	6	8	0
4	1	30	6	8	7	4	2	30	6	8	0
4	1	50	6	8	8	4	2	50	6	8	4
4	1	50	6	8	8	4	2	50	6	8	3
4	1	4	7	0	0	4	2	4	7	0	0
4	1	4	7	0	0	4	2	4	7	0	0
4	1	5	7	0	0	4	2	5	7	0	0
4	1	5	7	0	0	4	2	5	7	0	0
4	1	10	7	7	0	4	2	10	7	5	0
4	1	10	7	7	0	4	2	10	7	5	0
4	1	20	7	8	0	4	2	20	7	8	0
4	1	20	7	8	0	4	2	20	7	8	0
4	1	30	7	8	7	4	2	30	7	8	0
4	1	30	7	8	7	4	2	30	7	8	0
4	1	50	7	8	8	4	2	50	7	8	4
4	1	50	7	8	8	4	2	50	7	8	4
4	1	4	8	0	0	4	2	4	8	0	0
4	1	4	8	0	0	4	2	4	8	0	0
4	1	5	8	0	0	4	2	5	8	0	0
4	1	5	8	0	0	4	2	5	8	0	0
4	1	10	8	6	0	4	2	10	8	0	0
4	1	10	8	6	0	4	2	10	8	0	0
4	1	20	8	8	0	4	2	20	8	6	0
4	1	20	8	8	0	4	2	20	8	6	0
4	1	30	8	8	7	4	2	30	8	8	0
4	1	30	8	8	7	4	2	30	8	8	0
4	1	50	8	8	8	4	2	50	8	8	0
4	1	50	8	8	8	4	2	50	8	8	0
4	1	4	9	0	0	4	2	4	9	0	0
4	1	4	9	0	0	4	2	4	9	0	0
4	1	5	9	0	0	4	2	5	9	0	0
4	1	5	9	0	0	4	2	5	9	0	0
4	1	10	9	5	0	4	2	10	9	0	0
4	1	10	9	5	0	4	2	10	9	0	0
4	1	20	9	8	2	4	2	20	9	4	0
4	1	20	9	8	2	4	2	20	9	4	0
4	1	30	9	8	8	4	2	30	9	7	0
4	1	30	9	8	8	4	2	30	9	7	0
4	1	50	9	8	8	4	2	50	9	8	0
4	1	50	9	8	8	4	2	50	9	8	0
4	1	4	10	0	0	4	2	4	10	0	0
4	1	4	10	0	0	4	2	4	10	0	0
4	1	5	10	0	0	4	2	5	10	0	0
4	1	5	10	0	0	4	2	5	10	0	0
4	1	10	10	6	0	4	2	10	10	0	0
4	1	10	10	6	0	4	2	10	10	0	0
4	1	20	10	8	1	4	2	20	10	6	0

4	1	20	10	8	1	4	2	20	10	6	0
4	1	30	10	8	8	4	2	30	10	8	0
4	1	30	10	8	8	4	2	30	10	8	0
4	1	50	10	8	8	4	2	50	10	8	0
4	1	50	10	8	8	4	2	50	10	8	0
4	1	4	11	0	0	4	2	4	11	0	0
4	1	4	11	0	0	4	2	4	11	0	0
4	1	5	11	0	0	4	2	5	11	0	0
4	1	5	11	0	0	4	2	5	11	0	0
4	1	10	11	6	0	4	2	10	11	0	0
4	1	10	11	6	0	4	2	10	11	0	0
4	1	20	11	8	5	4	2	20	11	6	0
4	1	20	11	8	5	4	2	20	11	6	0
4	1	30	11	8	8	4	2	30	11	8	0
4	1	30	11	8	8	4	2	30	11	8	0
4	1	50	11	8	8	4	2	50	11	8	0
4	1	50	11	8	8	4	2	50	11	8	0
4	1	4	12	0	0	4	2	4	12	0	0
4	1	4	12	0	0	4	2	4	12	0	0
4	1	5	12	0	0	4	2	5	12	0	0
4	1	5	12	0	0	4	2	5	12	0	0
4	1	10	12	5	0	4	2	10	12	0	0
4	1	10	12	5	0	4	2	10	12	0	0
4	1	20	12	8	4	4	2	20	12	7	0
4	1	20	12	8	4	4	2	20	12	7	0
4	1	30	12	8	8	4	2	30	12	8	0
4	1	30	12	8	8	4	2	30	12	8	0
4	1	50	12	8	8	4	2	50	12	8	0
4	1	50	12	8	8	4	2	50	12	8	0
4	1	4	13	0	0	4	2	4	13	0	0
4	1	4	13	0	0	4	2	4	13	0	0
4	1	5	13	0	0	4	2	5	13	0	0
4	1	5	13	0	0	4	2	5	13	0	0
4	1	10	13	5	0	4	2	10	13	5	0
4	1	10	13	5	0	4	2	10	13	5	0
4	1	20	13	8	0	4	2	20	13	8	0
4	1	20	13	8	0	4	2	20	13	8	0
4	1	30	13	8	5	4	2	30	13	8	0
4	1	30	13	8	5	4	2	30	13	8	0
4	1	50	13	8	8	4	2	50	13	8	0
4	1	50	13	8	8	4	2	50	13	8	0
4	1	4	14	0	0	4	2	4	14	0	0
4	1	4	14	0	0	4	2	4	14	0	0
4	1	5	14	0	0	4	2	5	14	0	0
4	1	5	14	0	0	4	2	5	14	0	0
4	1	10	14	6	0	4	2	10	14	2	0
4	1	10	14	6	0	4	2	10	14	2	0
4	1	20	14	8	0	4	2	20	14	7	0
4	1	20	14	8	0	4	2	20	14	7	0
4	1	30	14	8	8	4	2	30	14	8	0
4	1	30	14	8	8	4	2	30	14	8	0
4	1	50	14	8	8	4	2	50	14	8	0
4	1	50	14	8	8	4	2	50	14	8	0

4	1	4	15	0	0	4	2	4	15	0	0
4	1	4	15	0	0	4	2	4	15	0	0
4	1	5	15	0	0	4	2	5	15	0	0
4	1	5	15	0	0	4	2	5	15	0	0
4	1	10	15	0	0	4	2	10	15	4	0
4	1	10	15	0	0	4	2	10	15	4	0
4	1	20	15	8	0	4	2	20	15	7	0
4	1	20	15	8	0	4	2	20	15	7	0
4	1	30	15	8	7	4	2	30	15	8	0
4	1	30	15	8	7	4	2	30	15	8	0
4	1	50	15	8	8	4	2	50	15	8	0
4	1	50	15	8	8	4	2	50	15	8	0
4	1	4	16	0	0	4	2	4	16	0	0
4	1	4	16	0	0	4	2	4	16	0	0
4	1	5	16	0	0	4	2	5	16	0	0
4	1	5	16	0	0	4	2	5	16	0	0
4	1	10	16	7	0	4	2	10	16	0	0
4	1	10	16	7	0	4	2	10	16	0	0
4	1	20	16	8	0	4	2	20	16	6	0
4	1	20	16	8	0	4	2	20	16	6	0
4	1	30	16	8	7	4	2	30	16	8	2
4	1	30	16	8	5	4	2	30	16	8	3
4	1	50	16	8	8	4	2	50	16	8	8
4	1	50	16	8	8	4	2	50	16	8	8
4	1	4	21	0	0	4	2	4	21	0	0
4	1	4	21	0	0	4	2	4	21	0	0
4	1	5	21	0	0	4	2	5	21	0	0
4	1	5	21	0	0	4	2	5	21	0	0
4	1	10	21	6	0	4	2	10	21	5	0
4	1	10	21	6	0	4	2	10	21	5	0
4	1	20	21	8	7	4	2	20	21	8	0
4	1	20	21	8	5	4	2	20	21	8	0
4	1	30	21	8	8	4	2	30	21	8	0
4	1	30	21	8	8	4	2	30	21	8	0
4	1	50	21	8	8	4	2	50	21	8	8
4	1	50	21	8	8	4	2	50	21	8	8
4	1	4	22	0	0	4	2	4	22	0	0
4	1	4	22	0	0	4	2	4	22	0	0
4	1	5	22	0	0	4	2	5	22	0	0
4	1	5	22	0	0	4	2	5	22	0	0
4	1	10	22	3	0	4	2	10	22	5	0
4	1	10	22	5	0	4	2	10	22	5	0
4	1	20	22	8	8	4	2	20	22	8	0
4	1	20	22	8	7	4	2	20	22	8	0
4	1	30	22	8	8	4	2	30	22	8	0
4	1	30	22	8	8	4	2	30	22	8	0
4	1	50	22	8	8	4	2	50	22	8	8
4	1	50	22	8	8	4	2	50	22	8	8
4	1	4	23	0	0	4	2	4	23	0	0
4	1	4	23	0	0	4	2	4	23	0	0
4	1	5	23	1	0	4	2	5	23	0	0
4	1	5	23	1	0	4	2	5	23	2	0
4	1	10	23	6	0	4	2	10	23	5	0

4	1	10	23	6	0	4	2	10	23	5	0
4	1	20	23	8	4	4	2	20	23	8	2
4	1	20	23	8	5	4	2	20	23	8	1
4	1	30	23	8	8	4	2	30	23	8	8
4	1	30	23	8	8	4	2	30	23	8	7
4	1	50	23	8	8	4	2	50	23	8	8
4	1	50	23	8	8	4	2	50	23	8	8
4	1	4	24	0	0	4	2	4	24	3	0
4	1	4	24	0	0	4	2	4	24	4	0
4	1	5	24	0	0	4	2	5	24	8	0
4	1	5	24	0	0	4	2	5	24	8	0
4	1	10	24	0	0	4	2	10	24	8	0
4	1	10	24	0	0	4	2	10	24	8	0
4	1	20	24	8	0	4	2	20	24	8	8
4	1	20	24	8	0	4	2	20	24	8	8
4	1	30	24	8	7	4	2	30	24	8	8
4	1	30	24	8	7	4	2	30	24	8	8
4	1	50	24	8	8	4	2	50	24	8	8
4	1	50	24	8	8	4	2	50	24	8	8
4	1	4	25	0	0	4	2	4	25	0	0
4	1	4	25	0	0	4	2	4	25	0	0
4	1	5	25	0	0	4	2	5	25	8	0
4	1	5	25	0	0	4	2	5	25	8	0
4	1	10	25	2	0	4	2	10	25	8	0
4	1	10	25	2	0	4	2	10	25	8	0
4	1	20	25	8	0	4	2	20	25	8	6
4	1	20	25	8	0	4	2	20	25	8	7
4	1	30	25	8	8	4	2	30	25	8	8
4	1	30	25	8	7	4	2	30	25	8	8
4	1	50	25	8	8	4	2	50	25	8	8
4	1	50	25	8	8	4	2	50	25	8	8
4	1	4	26	0	0	4	2	4	26	5	0
4	1	4	26	0	0	4	2	4	26	4	0
4	1	5	26	0	0	4	2	5	26	8	0
4	1	5	26	0	0	4	2	5	26	8	0
4	1	10	26	6	0	4	2	10	26	8	0
4	1	10	26	6	0	4	2	10	26	8	0
4	1	20	26	8	3	4	2	20	26	8	6
4	1	20	26	8	3	4	2	20	26	8	5
4	1	30	26	8	8	4	2	30	26	8	8
4	1	30	26	8	8	4	2	30	26	8	8
4	1	50	26	8	8	4	2	50	26	8	8
4	1	50	26	8	8	4	2	50	26	8	8
4	1	4	27	0	0	4	2	4	27	6	0
4	1	4	27	0	0	4	2	4	27	7	0
4	1	5	27	0	0	4	2	5	27	8	0
4	1	5	27	0	0	4	2	5	27	8	0
4	1	10	27	0	0	4	2	10	27	8	0
4	1	10	27	0	0	4	2	10	27	8	0
4	1	20	27	6	0	4	2	20	27	8	8
4	1	20	27	5	0	4	2	20	27	8	8
4	1	30	27	8	7	4	2	30	27	8	8
4	1	30	27	8	7	4	2	30	27	8	8

4	1	50	27	8	8	4	2	50	27	8	8
4	1	50	27	8	8	4	2	50	27	8	8
4	1	4	28	0	0	4	2	4	28	8	0
4	1	4	28	0	0	4	2	4	28	8	0
4	1	5	28	0	0	4	2	5	28	8	0
4	1	5	28	0	0	4	2	5	28	8	0
4	1	10	28	0	0	4	2	10	28	8	0
4	1	10	28	0	0	4	2	10	28	8	0
4	1	20	28	5	0	4	2	20	28	8	8
4	1	20	28	5	0	4	2	20	28	8	8
4	1	30	28	8	8	4	2	30	28	8	8
4	1	30	28	8	8	4	2	30	28	8	8
4	1	50	28	8	8	4	2	50	28	8	8
4	1	50	28	8	8	4	2	50	28	8	8
4	1	4	30	0	0	4	2	4	30	0	0
4	1	4	30	0	0	4	2	4	30	0	0
4	1	5	30	0	0	4	2	5	30	0	0
4	1	5	30	0	0	4	2	5	30	0	0
4	1	10	30	0	0	4	2	10	30	0	0
4	1	10	30	0	0	4	2	10	30	0	0
4	1	20	30	0	0	4	2	20	30	0	0
4	1	20	30	0	0	4	2	20	30	0	0
4	1	30	30	1	0	4	2	30	30	0	0
4	1	30	30	1	0	4	2	30	30	0	0
4	1	50	30	7	2	4	2	50	30	4	0
4	1	50	30	7	1	4	2	50	30	4	0
5	1	4	1	0	0	5	2	4	1	8	0
5	1	4	1	0	0	5	2	4	1	8	0
5	1	5	1	0	0	5	2	5	1	8	0
5	1	5	1	0	0	5	2	5	1	8	0
5	1	10	1	0	0	5	2	10	1	8	0
5	1	10	1	0	0	5	2	10	1	8	0
5	1	20	1	0	0	5	2	20	1	8	0
5	1	20	1	0	0	5	2	20	1	8	0
5	1	30	1	0	0	5	2	30	1	8	8
5	1	30	1	0	0	5	2	30	1	8	8
5	1	50	1	0	0	5	2	50	1	8	8
5	1	50	1	0	0	5	2	50	1	8	8
5	1	4	2	0	0	5	2	4	2	8	0
5	1	4	2	0	0	5	2	4	2	8	0
5	1	5	2	0	0	5	2	5	2	8	2
5	1	5	2	0	0	5	2	5	2	8	2
5	1	10	2	0	0	5	2	10	2	8	8
5	1	10	2	0	0	5	2	10	2	8	8
5	1	20	2	0	0	5	2	20	2	8	8
5	1	20	2	0	0	5	2	20	2	8	8
5	1	30	2	0	0	5	2	30	2	8	8
5	1	30	2	0	0	5	2	30	2	8	8
5	1	50	2	0	0	5	2	50	2	8	8
5	1	50	2	0	0	5	2	50	2	8	8
5	1	4	3	0	0	5	2	4	3	8	0
5	1	4	3	0	0	5	2	4	3	8	0
5	1	5	3	0	0	5	2	5	3	8	1

5	1	5	3	0	0	5	2	5	3	8	1
5	1	10	3	0	0	5	2	10	3	8	8
5	1	10	3	0	0	5	2	10	3	8	8
5	1	20	3	0	0	5	2	20	3	8	8
5	1	20	3	0	0	5	2	20	3	8	8
5	1	30	3	0	0	5	2	30	3	8	8
5	1	30	3	0	0	5	2	30	3	8	8
5	1	50	3	2	0	5	2	50	3	8	8
5	1	50	3	2	0	5	2	50	3	8	8
5	1	4	4	0	0	5	2	4	4	0	0
5	1	4	4	0	0	5	2	4	4	0	0
5	1	5	4	0	0	5	2	5	4	6	4
5	1	5	4	0	0	5	2	5	4	6	2
5	1	10	4	0	0	5	2	10	4	8	8
5	1	10	4	0	0	5	2	10	4	8	8
5	1	20	4	0	0	5	2	20	4	8	8
5	1	20	4	0	0	5	2	20	4	8	8
5	1	30	4	0	0	5	2	30	4	8	8
5	1	30	4	0	0	5	2	30	4	8	8
5	1	50	4	1	0	5	2	50	4	8	8
5	1	50	4	1	0	5	2	50	4	8	8
5	1	4	5	0	0	5	2	4	5	0	0
5	1	4	5	0	0	5	2	4	5	0	0
5	1	5	5	0	0	5	2	5	5	0	0
5	1	5	5	0	0	5	2	5	5	0	0
5	1	10	5	0	0	5	2	10	5	8	8
5	1	10	5	0	0	5	2	10	5	8	8
5	1	20	5	0	0	5	2	20	5	8	8
5	1	20	5	0	0	5	2	20	5	8	8
5	1	30	5	3	0	5	2	30	5	8	8
5	1	30	5	3	0	5	2	30	5	8	8
5	1	50	5	4	0	5	2	50	5	8	8
5	1	50	5	4	0	5	2	50	5	8	8
5	1	4	6	0	0	5	2	4	6	8	0
5	1	4	6	0	0	5	2	4	6	8	0
5	1	5	6	0	0	5	2	5	6	8	0
5	1	5	6	0	0	5	2	5	6	8	0
5	1	10	6	0	0	5	2	10	6	8	0
5	1	10	6	0	0	5	2	10	6	8	0
5	1	20	6	0	0	5	2	20	6	8	6
5	1	20	6	0	0	5	2	20	6	8	8
5	1	30	6	0	0	5	2	30	6	8	8
5	1	30	6	0	0	5	2	30	6	8	8
5	1	50	6	0	0	5	2	50	6	8	8
5	1	50	6	0	0	5	2	50	6	8	8
5	1	4	7	0	0	5	2	4	7	8	0
5	1	4	7	0	0	5	2	4	7	8	0
5	1	5	7	0	0	5	2	5	7	8	0
5	1	5	7	0	0	5	2	5	7	8	0
5	1	10	7	0	0	5	2	10	7	8	2
5	1	10	7	0	0	5	2	10	7	8	2
5	1	20	7	0	0	5	2	20	7	8	8
5	1	20	7	0	0	5	2	20	7	8	8

5	1	30	7	0	0	5	2	30	7	8	8
5	1	30	7	0	0	5	2	30	7	8	8
5	1	50	7	6	0	5	2	50	7	8	8
5	1	50	7	6	0	5	2	50	7	8	8
5	1	4	8	0	0	5	2	4	8	0	0
5	1	4	8	0	0	5	2	4	8	0	0
5	1	5	8	0	0	5	2	5	8	0	0
5	1	5	8	0	0	5	2	5	8	0	0
5	1	10	8	0	0	5	2	10	8	6	0
5	1	10	8	0	0	5	2	10	8	6	0
5	1	20	8	0	0	5	2	20	8	8	4
5	1	20	8	0	0	5	2	20	8	8	8
5	1	30	8	0	0	5	2	30	8	8	8
5	1	30	8	0	0	5	2	30	8	8	8
5	1	50	8	0	0	5	2	50	8	8	8
5	1	50	8	0	0	5	2	50	8	8	8
5	1	4	9	0	0	5	2	4	9	0	0
5	1	4	9	0	0	5	2	4	9	0	0
5	1	5	9	0	0	5	2	5	9	0	0
5	1	5	9	0	0	5	2	5	9	0	0
5	1	10	9	0	0	5	2	10	9	4	0
5	1	10	9	0	0	5	2	10	9	4	0
5	1	20	9	0	0	5	2	20	9	8	4
5	1	20	9	0	0	5	2	20	9	5	4
5	1	30	9	0	0	5	2	30	9	8	6
5	1	30	9	0	0	5	2	30	9	8	6
5	1	50	9	0	0	5	2	50	9	8	8
5	1	50	9	0	0	5	2	50	9	8	8
5	1	4	10	0	0	5	2	4	10	0	0
5	1	4	10	0	0	5	2	4	10	0	0
5	1	5	10	0	0	5	2	5	10	0	0
5	1	5	10	0	0	5	2	5	10	0	0
5	1	10	10	0	0	5	2	10	10	0	0
5	1	10	10	0	0	5	2	10	10	0	0
5	1	20	10	0	0	5	2	20	10	8	0
5	1	20	10	0	0	5	2	20	10	8	2
5	1	30	10	0	0	5	2	30	10	8	5
5	1	30	10	0	0	5	2	30	10	8	6
5	1	50	10	0	0	5	2	50	10	8	8
5	1	50	10	0	0	5	2	50	10	8	8
5	1	4	11	0	0	5	2	4	11	0	0
5	1	4	11	0	0	5	2	4	11	0	0
5	1	5	11	0	0	5	2	5	11	0	0
5	1	5	11	0	0	5	2	5	11	0	0
5	1	10	11	0	0	5	2	10	11	8	0
5	1	10	11	0	0	5	2	10	11	7	0
5	1	20	11	0	0	5	2	20	11	8	4
5	1	20	11	0	0	5	2	20	11	8	4
5	1	30	11	0	0	5	2	30	11	8	7
5	1	30	11	0	0	5	2	30	11	8	8
5	1	50	11	0	0	5	2	50	11	8	8
5	1	50	11	0	0	5	2	50	11	8	8
5	1	4	12	0	0	5	2	4	12	0	0

5	1	4	12	0	0	5	2	4	12	0	0
5	1	5	12	0	0	5	2	5	12	0	0
5	1	5	12	0	0	5	2	5	12	0	0
5	1	10	12	0	0	5	2	10	12	0	0
5	1	10	12	0	0	5	2	10	12	0	0
5	1	20	12	0	0	5	2	20	12	8	0
5	1	20	12	0	0	5	2	20	12	8	2
5	1	30	12	0	0	5	2	30	12	8	6
5	1	30	12	0	0	5	2	30	12	8	6
5	1	50	12	0	0	5	2	50	12	8	8
5	1	50	12	0	0	5	2	50	12	8	8
5	1	4	13	0	0	5	2	4	13	5	0
5	1	4	13	0	0	5	2	4	13	5	0
5	1	5	13	0	0	5	2	5	13	6	0
5	1	5	13	0	0	5	2	5	13	6	0
5	1	10	13	0	0	5	2	10	13	8	0
5	1	10	13	0	0	5	2	10	13	8	0
5	1	20	13	0	0	5	2	20	13	8	1
5	1	20	13	0	0	5	2	20	13	8	3
5	1	30	13	0	0	5	2	30	13	8	8
5	1	30	13	0	0	5	2	30	13	8	8
5	1	50	13	0	0	5	2	50	13	8	8
5	1	50	13	0	0	5	2	50	13	8	8
5	1	4	14	0	0	5	2	4	14	0	0
5	1	4	14	0	0	5	2	4	14	0	0
5	1	5	14	0	0	5	2	5	14	0	0
5	1	5	14	0	0	5	2	5	14	0	0
5	1	10	14	0	0	5	2	10	14	0	0
5	1	10	14	0	0	5	2	10	14	0	0
5	1	20	14	0	0	5	2	20	14	8	8
5	1	20	14	0	0	5	2	20	14	8	8
5	1	30	14	0	0	5	2	30	14	8	8
5	1	30	14	0	0	5	2	30	14	8	8
5	1	50	14	0	0	5	2	50	14	8	8
5	1	50	14	0	0	5	2	50	14	8	8
5	1	4	15	0	0	5	2	4	15	0	0
5	1	4	15	0	0	5	2	4	15	0	0
5	1	5	15	0	0	5	2	5	15	0	0
5	1	5	15	0	0	5	2	5	15	0	0
5	1	10	15	0	0	5	2	10	15	4	0
5	1	10	15	0	0	5	2	10	15	5	0
5	1	20	15	0	0	5	2	20	15	6	8
5	1	20	15	0	0	5	2	20	15	6	8
5	1	30	15	0	0	5	2	30	15	8	8
5	1	30	15	0	0	5	2	30	15	8	8
5	1	50	15	0	0	5	2	50	15	8	8
5	1	50	15	0	0	5	2	50	15	8	8
5	1	4	16	0	0	5	2	4	16	0	0
5	1	4	16	0	0	5	2	4	16	0	0
5	1	5	16	0	0	5	2	5	16	6	0
5	1	5	16	0	0	5	2	5	16	6	0
5	1	10	16	0	0	5	2	10	16	8	1
5	1	10	16	0	0	5	2	10	16	8	0

5	1	20	16	0	0	5	2	20	16	8	6
5	1	20	16	0	0	5	2	20	16	8	6
5	1	30	16	0	0	5	2	30	16	8	8
5	1	30	16	0	0	5	2	30	16	8	8
5	1	50	16	4	0	5	2	50	16	8	8
5	1	50	16	4	0	5	2	50	16	8	8
5	1	4	21	0	0	5	2	4	21	0	0
5	1	4	21	0	0	5	2	4	21	0	0
5	1	5	21	0	0	5	2	5	21	0	0
5	1	5	21	0	0	5	2	5	21	0	0
5	1	10	21	0	0	5	2	10	21	8	0
5	1	10	21	0	0	5	2	10	21	8	0
5	1	20	21	0	0	5	2	20	21	8	8
5	1	20	21	0	0	5	2	20	21	8	8
5	1	30	21	0	0	5	2	30	21	8	8
5	1	30	21	0	0	5	2	30	21	8	8
5	1	50	21	0	0	5	2	50	21	8	8
5	1	50	21	0	0	5	2	50	21	8	8
5	1	4	22	0	0	5	2	4	22	0	0
5	1	4	22	0	0	5	2	4	22	0	0
5	1	5	22	0	0	5	2	5	22	0	0
5	1	5	22	0	0	5	2	5	22	0	0
5	1	10	22	0	0	5	2	10	22	8	0
5	1	10	22	0	0	5	2	10	22	8	0
5	1	20	22	0	0	5	2	20	22	8	8
5	1	20	22	0	0	5	2	20	22	8	7
5	1	30	22	0	0	5	2	30	22	8	8
5	1	30	22	0	0	5	2	30	22	8	8
5	1	50	22	0	0	5	2	50	22	8	8
5	1	50	22	2	0	5	2	50	22	8	8
5	1	4	23	0	0	5	2	4	23	0	0
5	1	4	23	0	0	5	2	4	23	0	0
5	1	5	23	0	0	5	2	5	23	0	0
5	1	5	23	0	0	5	2	5	23	0	0
5	1	10	23	0	0	5	2	10	23	8	0
5	1	10	23	0	0	5	2	10	23	8	0
5	1	20	23	0	0	5	2	20	23	8	0
5	1	20	23	0	0	5	2	20	23	8	0
5	1	30	23	0	0	5	2	30	23	8	8
5	1	30	23	0	0	5	2	30	23	8	8
5	1	50	23	1	0	5	2	50	23	8	8
5	1	50	23	0	0	5	2	50	23	8	8
5	1	4	24	0	0	5	2	4	24	0	0
5	1	4	24	0	0	5	2	4	24	0	0
5	1	5	24	0	0	5	2	5	24	8	0
5	1	5	24	0	0	5	2	5	24	8	0
5	1	10	24	0	0	5	2	10	24	8	0
5	1	10	24	0	0	5	2	10	24	8	0
5	1	20	24	0	0	5	2	20	24	8	4
5	1	20	24	0	0	5	2	20	24	8	4
5	1	30	24	0	0	5	2	30	24	8	8
5	1	30	24	0	0	5	2	30	24	8	8
5	1	50	24	4	0	5	2	50	24	8	8

5	1	50	24	4	0	5	2	50	24	8	8
5	1	4	25	0	0	5	2	4	25	2	0
5	1	4	25	0	0	5	2	4	25	2	0
5	1	5	25	0	0	5	2	5	25	8	0
5	1	5	25	0	0	5	2	5	25	8	0
5	1	10	25	0	0	5	2	10	25	8	0
5	1	10	25	0	0	5	2	10	25	8	0
5	1	20	25	0	0	5	2	20	25	8	7
5	1	20	25	0	0	5	2	20	25	8	7
5	1	30	25	0	0	5	2	30	25	8	8
5	1	30	25	0	0	5	2	30	25	8	8
5	1	50	25	0	0	5	2	50	25	8	8
5	1	50	25	0	0	5	2	50	25	8	8
5	1	4	26	0	0	5	2	4	26	2	0
5	1	4	26	0	0	5	2	4	26	0	0
5	1	5	26	0	0	5	2	5	26	8	0
5	1	5	26	0	0	5	2	5	26	8	0
5	1	10	26	0	0	5	2	10	26	8	6
5	1	10	26	0	0	5	2	10	26	8	6
5	1	20	26	0	0	5	2	20	26	8	8
5	1	20	26	0	0	5	2	20	26	8	8
5	1	30	26	0	0	5	2	30	26	8	8
5	1	30	26	0	0	5	2	30	26	8	8
5	1	50	26	1	0	5	2	50	26	8	8
5	1	50	26	0	0	5	2	50	26	8	8
5	1	4	27	0	0	5	2	4	27	0	0
5	1	4	27	0	0	5	2	4	27	0	0
5	1	5	27	0	0	5	2	5	27	7	0
5	1	5	27	0	0	5	2	5	27	7	0
5	1	10	27	0	0	5	2	10	27	8	0
5	1	10	27	0	0	5	2	10	27	8	0
5	1	20	27	0	0	5	2	20	27	8	0
5	1	20	27	0	0	5	2	20	27	8	0
5	1	30	27	0	0	5	2	30	27	8	8
5	1	30	27	0	0	5	2	30	27	8	8
5	1	50	27	3	4	5	2	50	27	8	8
5	1	50	27	0	0	5	2	50	27	8	8
5	1	4	28	0	0	5	2	4	28	2	0
5	1	4	28	0	0	5	2	4	28	0	0
5	1	5	28	0	0	5	2	5	28	8	0
5	1	5	28	0	0	5	2	5	28	8	0
5	1	10	28	0	0	5	2	10	28	8	0
5	1	10	28	0	0	5	2	10	28	8	0
5	1	20	28	0	0	5	2	20	28	8	0
5	1	20	28	0	0	5	2	20	28	8	0
5	1	30	28	0	0	5	2	30	28	8	8
5	1	30	28	0	0	5	2	30	28	8	8
5	1	50	28	3	0	5	2	50	28	8	8
5	1	50	28	3	0	5	2	50	28	8	8
5	1	4	30	0	0	5	2	4	30	0	0
5	1	4	30	0	0	5	2	4	30	0	0
5	1	5	30	0	0	5	2	5	30	0	0
5	1	5	30	0	0	5	2	5	30	0	0

5	1	10	30	0	0	5	2	10	30	0	0
5	1	10	30	0	0	5	2	10	30	0	0
5	1	20	30	0	0	5	2	20	30	0	0
5	1	20	30	0	0	5	2	20	30	0	0
5	1	30	30	0	0	5	2	30	30	6	0
5	1	30	30	0	0	5	2	30	30	5	0
5	1	50	30	0	0	5	2	50	30	7	0
5	1	50	30	0	0	5	2	50	30	7	0

Legenda:

Planta 1: *P. hydropiper*

Planta 2: *B. trimera*

Planta 3: *B. pilosa*

Planta 4: *T. minuta*

Planta 5: *Eucalyptus*

Extrato 1: Decocto

Extrato 2: EHA

Conc: Concentração do extrato em %

Bactérias 1, 2, 9, 10, 11, 12, 13, 14: *Staphylococcus* coagulase positiva

Bactéria 16: *S. aureus*, ATCC 12600

Bactérias 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15: *Staphylococcus* coagulase negativa

Bactérias 20, 21, 22, 26, 27: *Streptococcus agalactiae*

Bactérias 23, 24: *S. dysgalactiae*

Bactéria 25: *S. uberis*

Bactéria 30: *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 10145

IINIB: – Índice de inibição que um desinfetante a correspondente concentração foi capaz de inibir o crescimento bacteriano.

IINAB: índice de inativação que um desinfetante a correspondente concentração foi capaz de inativar a amostra bacteriana.

APÊNDICE B - Cinética de inativação de Microrganismos relacionados a mastite bovina:

Leituras e cálculo do Índice de Inativação.

TEMPO	desinfetante	bactéria	mat organica	contagem 1	contagem 2	contagem 3	média	LOG	indice II
controle	1	1	1	390	513	575	492,67	6,09	0,000
30	1	1	1	5	2	9	5,33	4,12	0,323
120	1	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
600	1	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	1	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	1	1	1	3	2	4	3	3,88	0,364
120	1	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
600	1	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	1	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	1	1	2	162	245	195	200,67	5,70	0,064
120	1	1	2	1	4	2	2,33	3,77	0,382
600	1	1	2	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	1	1	2	0	0	0	0	0,00	1,000
30	1	1	2	160	140	157	152,33	5,58	0,084
120	1	1	2	0	3	3	2	3,70	0,393
600	1	1	2	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	1	1	2	0	0	0	0	0,00	1,000
controle	1	2	1	80	69	79	76	5,28	0,000
30	1	2	1	17	17	11	15	4,57	0,133
120	1	2	1	1	0	2	1	3,40	0,356
600	1	2	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	1	2	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	1	2	1	11	13	15	13	4,51	0,145
120	1	2	1	0	0	0	0	0,00	1,000
600	1	2	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	1	2	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	1	2	2	57	74	49	60	5,18	0,019
120	1	2	2	63	63	70	65,33	5,21	0,012
600	1	2	2	45	43	30	39,33	4,99	0,054
1800	1	2	2	25	21	16	20,67	4,71	0,107
30	1	2	2	54	52	63	56,33	5,15	0,025
120	1	2	2	67	57	63	62,33	5,19	0,016
600	1	2	2	35	41	59	45	5,05	0,043
1800	1	2	2	38	36	40	38	4,98	0,057
controle	1	3	1	33	47	40	40	5,00	0,000
30	1	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
120	1	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
600	1	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	1	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	1	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
120	1	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
600	1	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	1	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	1	3	2	32	36	20	29,33	4,87	0,027
120	1	3	2	25	36	36	32,33	4,91	0,018
600	1	3	2	27	31	25	27,67	4,84	0,032
1800	1	3	2	25	25	28	26	4,81	0,037
30	1	3	2	27	33	35	31,67	4,90	0,020
120	1	3	2	35	30	33	32,67	4,91	0,018

600	1	3	2	21	26	37	28	4,85	0,031
1800	1	3	2	33	32	23	29,33	4,87	0,027
controle	2	1	1	85	86	77	82,67	5,32	0,000
30	2	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
120	2	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
600	2	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	2	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	2	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
120	2	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
600	2	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	2	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	2	1	2	27	22	31	26,67	4,82	0,092
120	2	1	2	7	3	8	6	4,18	0,214
600	2	1	2	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	2	1	2	0	0	0	0	0,00	1,000
30	2	1	2	15	20	15	16,67	4,62	0,131
120	2	1	2	4	6	3	4,33	4,03	0,241
600	2	1	2	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	2	1	2	0	0	0	0	0,00	1,000
controle	2	2	1	241	198	201	213,33	5,73	0,000
30	2	2	1	87	104	116	102,33	5,41	0,056
120	2	2	1	6	18	32	18,67	4,67	0,185
600	2	2	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	2	2	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	2	2	1	96	107	109	104	5,41	0,054
120	2	2	1	6	7	7	6,67	4,22	0,263
600	2	2	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
1800	2	2	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
30	2	2	2	169	115	132	138,67	5,54	0,033
120	2	2	2	142	149	145	145,33	5,56	0,029
600	2	2	2	82	83	89	84,67	5,33	0,070
1800	2	2	2	44	29	38	37	4,97	0,133
30	2	2	2	145	138	132	138,33	5,54	0,033
120	2	2	2	162	123	132	139	5,54	0,032
600	2	2	2	101	100	126	109	5,44	0,051
1800	2	2	2	44	33	30	35,67	4,95	0,136
controle	2	3	1	46	44	36	42	5,02	0,000
30	2	3	1	24	36	39	33	4,92	0,021
120	2	3	1	27	27	10	21,33	4,73	0,059
600	2	3	1	1	3	3	2,33	3,77	0,250
1800	2	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	2	3	1	21	18	16	18,33	4,66	0,072
120	2	3	1	13	14	15	14	4,54	0,095
600	2	3	1	2	0	4	2	3,70	0,263
1800	2	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	2	3	2	33	24	22	26,33	4,82	0,040
120	2	3	2	13	26	39	26	4,81	0,041
600	2	3	2	22	24	32	26	4,81	0,041
1800	2	3	2	22	22	36	26,67	4,82	0,039
30	2	3	2	26	30	45	33,67	4,93	0,019
120	2	3	2	23	31	27	27	4,83	0,038
600	2	3	2	20	24	25	23	4,76	0,052
1800	2	3	2	25	30	30	28,33	4,85	0,034
controle	3	1	1	42	46	35	41,00	5,01	0,000

30	3	1	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
120	3	1	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
600	3	1	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
1800	3	1	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
30	3	1	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
120	3	1	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
600	3	1	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
1800	3	1	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
30	3	1	2	18	22	22	20,67	4,71	0,059
120	3	1	2	2	2	1	1,67	3,62	0,278
600	3	1	2	0	0	0	0,00	0,00	1,000
1800	3	1	2	0	0	0	0,00	0,00	1,000
30	3	1	2	24	27	25	25,33	4,80	0,042
120	3	1	2	0	0	0	0,00	0,00	1,000
600	3	1	2	0	0	0	0,00	0,00	1,000
1800	3	1	2	0	0	0	0,00	0,00	1,000
controle	3	2	1	151	208	187	182,00	5,66	0,000
30	3	2	1	161	168	157	162,00	5,61	0,009
120	3	2	1	75	97	84	85,33	5,33	0,058
600	3	2	1	1	0	1	0,67	3,22	0,431
1800	3	2	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
30	3	2	1	142	166	178	162,00	5,61	0,009
120	3	2	1	63	64	67	64,67	5,21	0,079
600	3	2	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
1800	3	2	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
30	3	2	2	171	173	172	172,00	5,63	0,004
120	3	2	2	170	163	152	161,67	5,61	0,009
600	3	2	2	162	142	126	143,33	5,55	0,018
1800	3	2	2	89	84	82	85,00	5,33	0,058
30	3	2	2	147	139	145	143,67	5,56	0,018
120	3	2	2	135	173	184	164,00	5,61	0,008
600	3	2	2	154	140	154	149,33	5,57	0,015
1800	3	2	2	59	71	84	71,33	5,25	0,072
controle	3	3	1	172	166	153	163,67	5,61	0,000
30	3	3	1	185	170	175	176,67	5,65	-0,006
120	3	3	1	160	170	157	162,33	5,61	0,001
600	3	3	1	20	18	28	22,00	4,74	0,155
1800	3	3	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
30	3	3	1	162	153	172	162,33	5,61	0,001
120	3	3	1	139	157	178	158,00	5,60	0,003
600	3	3	1	28	23	35	28,67	4,86	0,135
1800	3	3	1	0	0	0	0,00	0,00	1,000
30	3	3	2	153	165	176	164,67	5,61	0,000
120	3	3	2	167	176	144	162,33	5,61	0,001
600	3	3	2	162	164	151	159,00	5,60	0,002
1800	3	3	2	159	160	150	156,33	5,59	0,004
30	3	3	2	154	149	158	153,67	5,58	0,005
120	3	3	2	132	153	153	146,00	5,56	0,009
600	3	3	2	146	150	143	146,33	5,56	0,009
1800	3	3	2	130	151	123	134,67	5,53	0,015
controle	4	1	1	44	45	49	46	5,06	0,000
30	4	1	1	0	1	2	1	3,40	0,329
120	4	1	1	0	5	0	1,666667	3,62	0,285
600	4	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000

1800	4	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	4	1	1	0	4	0	1,333333	3,52	0,304
120	4	1	1	0	1	0	0,333333	2,92	0,423
600	4	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	4	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	4	1	2	29	27	38	31,333333	4,89	0,033
120	4	1	2	37	39	41	39	4,99	0,014
600	4	1	2	38	37	42	39	4,99	0,014
1800	4	1	2	45	28	38	37	4,97	0,019
30	4	1	2	36	40	34	36,66667	4,96	0,019
120	4	1	2	33	42	44	39,66667	5,00	0,013
600	4	1	2	44	26	45	38,333333	4,98	0,016
1800	4	1	2	35	36	39	36,66667	4,96	0,019
controle	4	2	1	126	130	113	123	5,49	0,000
30	4	2	1	107	82	102	97	5,38	0,019
120	4	2	1	123	98	111	110,67	5,44	0,008
600	4	2	1	80	38	33	50,333333	5,10	0,071
1800	4	2	1	10	34	36	26,66667	4,82	0,121
30	4	2	1	127	114	97	112,6667	5,45	0,007
120	4	2	1	82	86	89	85,66667	5,33	0,029
600	4	2	1	70	97	62	76,333333	5,28	0,038
1800	4	2	1	27	47	50	41,333333	5,01	0,086
30	4	2	2	117	124	149	130	5,51	-0,004
120	4	2	2	99	123	104	108,6667	5,43	0,010
600	4	2	2	95	114	121	110	5,44	0,009
1800	4	2	2	123	81	128	110,6667	5,44	0,008
30	4	2	2	115	97	103	105	5,42	0,013
120	4	2	2	124	107	119	116,6667	5,46	0,004
600	4	2	2	94	93	116	101	5,40	0,016
1800	4	2	2	97	88	49	78	5,29	0,036
controle	4	3	1	95	82	88	88,333333	5,34	0,000
30	4	3	1	82	87	72	80,333333	5,30	0,008
120	4	3	1	94	78	90	87,333333	5,34	0,001
600	4	3	1	72	72	76	73,333333	5,26	0,015
1800	4	3	1	94	75	83	84	5,32	0,004
30	4	3	1	83	68	90	80,333333	5,30	0,008
120	4	3	1	66	71	74	70,333333	5,25	0,019
600	4	3	1	95	87	67	83	5,32	0,005
1800	4	3	1	72	88	90	83,333333	5,32	0,005
30	4	3	2	75	69	68	70,66667	5,25	0,018
120	4	3	2	65	70	81	72	5,26	0,017
600	4	3	2	82	75	68	75	5,27	0,013
1800	4	3	2	82	75	81	79,333333	5,30	0,009
30	4	3	2	89	72	71	77,333333	5,29	0,011
120	4	3	2	84	71	81	78,66667	5,29	0,009
600	4	3	2	74	74	82	76,66667	5,28	0,012
1800	4	3	2	82	78	73	77,66667	5,29	0,010
controle	5	1	1	87	89	87	87,66667	5,34	0,000
30	5	1	1	76	75	74	75	5,27	0,013
120	5	1	1	67	83	107	85,66667	5,33	0,002
600	5	1	1	39	59	37	45	5,05	0,054
1800	5	1	1	38	68	37	47,66667	5,08	0,050
30	5	1	1	94	76	77	82,333333	5,31	0,005
120	5	1	1	53	57	75	61,66667	5,19	0,029

600	5	1	1	57	46	56	53	5,12	0,041
1800	5	1	1	56	61	55	57,33333	5,16	0,035
30	5	1	2	100	95	106	100,3333	5,40	-0,011
120	5	1	2	113	123	103	113	5,45	-0,021
600	5	1	2	93	111	100	101,3333	5,40	-0,012
1800	5	1	2	94	93	109	98,66667	5,39	-0,010
30	5	1	2	74	94	122	96,66667	5,38	-0,008
120	5	1	2	84	98	85	89	5,35	-0,001
600	5	1	2	92	81	109	94	5,37	-0,006
1800	5	1	2	108	136	124	122,6667	5,49	-0,027
controle	5	2	1	220	197	191	202,6667	5,70	0,000
30	5	2	1	146	189	164	166,3333	5,62	0,015
120	5	2	1	183	179	179	180,3333	5,65	0,009
600	5	2	1	177	150	128	151,6667	5,58	0,022
1800	5	2	1	197	167	135	166,3333	5,62	0,015
30	5	2	1	188	168	190	182	5,66	0,008
120	5	2	1	198	215	187	200	5,70	0,001
600	5	2	1	184	188	192	188	5,67	0,006
1800	5	2	1	199	177	124	166,6667	5,62	0,015
30	5	2	2	191	209	200	200	5,70	0,001
120	5	2	2	214	207	178	199,6667	5,70	0,001
600	5	2	2	203	214	189	202	5,70	0,000
1800	5	2	2	140	149	172	153,6667	5,58	0,021
30	5	2	2	194	172	168	178	5,65	0,010
120	5	2	2	184	220	189	197,6667	5,69	0,002
600	5	2	2	190	178	177	181,6667	5,66	0,008
1800	5	2	2	150	141	165	152	5,58	0,022
controle	5	3	1	44	43	34	40,33333	5,00	0,000
30	5	3	1	31	36	40	35,66667	4,95	0,011
120	5	3	1	27	20	26	24,33333	4,78	0,044
600	5	3	1	24	24	29	25,66667	4,81	0,039
1800	5	3	1	28	31	20	26,33333	4,82	0,037
30	5	3	1	26	12	13	17	4,63	0,075
120	5	3	1	26	27	30	27,66667	4,84	0,033
600	5	3	1	29	25	41	31,66667	4,90	0,021
1800	5	3	1	36	35	34	35	4,94	0,012
30	5	3	2	23	38	30	30,33333	4,88	0,025
120	5	3	2	37	45	25	35,66667	4,95	0,011
600	5	3	2	29	28	26	27,66667	4,84	0,033
1800	5	3	2	45	40	24	36,33333	4,96	0,009
30	5	3	2	32	39	28	33	4,92	0,017
120	5	3	2	20	26	21	22,33333	4,75	0,051
600	5	3	2	25	25	33	27,66667	4,84	0,033
1800	5	3	2	35	31	25	30,33333	4,88	0,025
controle	6	1	1	53	42	32	42,33333	5,02	0,000
30	6	1	1	20	18	7	15	4,57	0,090
120	6	1	1	2	1	1	1,333333	3,52	0,299
600	6	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	6	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	6	1	1	15	15	11	13,66667	4,53	0,098
120	6	1	1	0	4	0	1,333333	3,52	0,299
600	6	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	6	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	6	1	2	40	38	25	34,33333	4,93	0,018

120	6	1	2	39	35	32	35,33333	4,95	0,016
600	6	1	2	20	29	27	25,33333	4,80	0,044
1800	6	1	2	28	30	24	27,33333	4,83	0,038
30	6	1	2	48	35	37	40	5,00	0,005
120	6	1	2	28	30	40	32,66667	4,91	0,022
600	6	1	2	27	29	25	27	4,83	0,039
1800	6	1	2	35	29	14	26	4,81	0,042
controle	6	2	1	47	60	58	55	5,14	0,000
30	6	2	1	56	56	68	60	5,18	-0,007
120	6	2	1	50	54	53	52,33333	5,12	0,004
600	6	2	1	52	41	38	43,66667	5,04	0,020
1800	6	2	1	34	18	28	26,66667	4,82	0,061
30	6	2	1	86	78	60	74,66667	5,27	-0,026
120	6	2	1	53	48	97	66	5,22	-0,015
600	6	2	1	54	54	34	47,33333	5,07	0,013
1800	6	2	1	30	37	21	29,33333	4,87	0,053
30	6	2	2	70	66	76	70,66667	5,25	-0,021
120	6	2	2	64	61	64	63	5,20	-0,011
600	6	2	2	50	48	39	45,66667	5,06	0,016
1800	6	2	2	40	37	75	50,66667	5,10	0,007
30	6	2	2	59	48	52	53	5,12	0,003
120	6	2	2	82	52	68	67,33333	5,23	-0,017
600	6	2	2	57	56	80	64,33333	5,21	-0,013
1800	6	2	2	64	52	45	53,66667	5,13	0,002
controle	6	3	1	48	42	33	41	5,01	0,000
30	6	3	1	42	31	44	39	4,99	0,004
120	6	3	1	44	48	38	43,33333	5,03	-0,005
600	6	3	1	36	33	39	36	4,95	0,011
1800	6	3	1	18	31	29	26	4,81	0,039
30	6	3	1	46	23	39	36	4,95	0,011
120	6	3	1	35	42	42	39,66667	5,00	0,003
600	6	3	1	34	46	40	40	5,00	0,002
1800	6	3	1	45	41	39	41,66667	5,02	-0,001
30	6	3	2	45	42	41	42,66667	5,03	-0,003
120	6	3	2	36	53	33	40,66667	5,01	0,001
600	6	3	2	30	27	36	31	4,89	0,024
1800	6	3	2	35	45	47	42,33333	5,02	-0,003
30	6	3	2	50	39	36	41,66667	5,02	-0,001
120	6	3	2	44	48	34	42	5,02	-0,002
600	6	3	2	41	32	53	42	5,02	-0,002
1800	6	3	2	45	45	36	42	5,02	-0,002
controle	7	1	1	55	50	45	50	5,10	0,000
30	7	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
120	7	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
600	7	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	7	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	7	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
120	7	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
600	7	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	7	1	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	7	1	2	40	38	35	37,66667	4,97	0,024
120	7	1	2	1	1	0	0,66667	3,22	0,368
600	7	1	2	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	7	1	2	0	0	0	0	0,00	1,000

30	7	1	2	35	30	28	31	4,89	0,041
120	7	1	2	0	0	1	0,333333	2,92	0,427
600	7	1	2	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	7	1	2	0	0	0	0	0,00	1,000
controle	7	2	1	99	102	95	98,66667	5,39	0,000
30	7	2	1	101	115	80	98,66667	5,39	0,000
120	7	2	1	61	46	32	46,33333	5,06	0,061
600	7	2	1	1	3	0	1,333333	3,52	0,347
1800	7	2	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	7	2	1	98	86	95	93	5,37	0,005
120	7	2	1	48	34	44	42	5,02	0,069
600	7	2	1	6	1	0	2,333333	3,77	0,302
1800	7	2	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	7	2	2	97	95	88	93,33333	5,37	0,004
120	7	2	2	82	90	81	84,33333	5,32	0,013
600	7	2	2	69	77	72	72,66667	5,26	0,025
1800	7	2	2	42	52	45	46,33333	5,06	0,061
30	7	2	2	89	83	92	88	5,34	0,009
120	7	2	2	80	84	79	81	5,31	0,016
600	7	2	2	37	70	63	56,66667	5,15	0,045
1800	7	2	2	42	52	47	47	5,07	0,060
controle	7	3	1	45	41	36	40,66667	5,01	0,000
30	7	3	1	10	6	10	8,666667	4,34	0,134
120	7	3	1	2	4	2	2,666667	3,82	0,236
600	7	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	7	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	7	3	1	9	16	17	14	4,54	0,092
120	7	3	1	4	4	5	4,333333	4,03	0,194
600	7	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
1800	7	3	1	0	0	0	0	0,00	1,000
30	7	3	2	28	35	18	27	4,83	0,036
120	7	3	2	12	15	8	11,66667	4,46	0,108
600	7	3	2	24	11	17	17,33333	4,64	0,074
1800	7	3	2	9	22	21	17,33333	4,64	0,074
30	7	3	2	24	21	43	29,33333	4,87	0,028
120	7	3	2	11	5	3	6,333333	4,20	0,161
600	7	3	2	17	16	17	16,66667	4,62	0,077
1800	7	3	2	14	11	14	13	4,51	0,099

Extrato 1: Clorexidina 0,12%

Extrato 2: EHA *Eucalyptus spp*

Extrato 3: EHA *T. minuta*

Extrato 4: DEC *T. minuta*

Extrato 5: DEC *Eucalyptus spp*

Extrato 6: DEC *B. trimera*

Extrato 7: EHA *B. trimera*

Bactéria: 1 – *S. agalactiae*

2 – *S. aureus*

3 – *P. aeruginosa*

Mat.Orgânica: 1 – Ausência

2 - Presença

APÊNDICE C – Artigos enviados para publicação

Atividade Antibacteriana de Extratos de Plantas Medicinais Utilizadas como Anti-séptico/Desinfetantes em Práticas Tradicionais frente a Bactérias Relacionadas com Mastite Bovina

SCHUCH, Luiz Filipe Damé^{3,2}, WIEST, José Maria³; PRESTES, Luciana Souza⁴; COIMBRA, Helen Silveira⁵; SOUZA, Luciana⁶; OYARZABAL, Marta Elaine Bastos⁷; SARMENTO, Caroline⁸

¹Laboratório de Doenças Infecciosas, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária – UFPel, Campus Universitário, s/n, Capão do Leão, RS CEP 96010900

² Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Beneficiário de auxílio financeiro da CAPES – Brasil

Resumo

A partir da resolução da 30^a Assembléia Mundial de Saúde, a integração de práticas tradicionais em saúde aos sistemas “modernos” ganhou grande interesse, tanto em saúde humano quanto animal. Esse trabalho foi realizado com objetivo de avaliar “in vitro” práticas de desinfecção/anti-sepsia com uso de plantas medicinais em atividades de produção animal. Extrato hidroalcolico (EHA) e decocto (DEC) de cinco espécies de plantas medicinais (*Baccharis trimera*, *Bidens pilosa*, *Eucalyptus spp*, *Polygonum hydropiper* e *Tagetes minuta*) que eram utilizados na rotina de ordenha em assentamento da reforma agrária foram avaliadas pelo método de diluição dos tubos múltiplos

³ Departamento Veterinária Preventiva/FV/UFPel; ³ ICTA/UFRGS; ^{4,5} PPG em Veterinária, FV/UFPel; ^{6,8} Graduanda em Veterinária, UFPel; ⁷ PPG Ciências Veterinárias, UFRGS.

adaptado a micro-técnica quanto a sua atividade bactericida e/ou bacteriostática frente a bactérias relacionadas à mastite contagiosa. Encontrou-se que todas as plantas apresentaram atividade antibacteriana, o EHA de *Eucalyptus* spp. apresentou maior atividade bacteriostática, enquanto que essa mesma solução desinfetante, mais EHA de *B. trimera* e o DEC de *T. minuta* foram aquelas com maior atividade bactericida, sendo a *P. aeruginosa* mais resistente aos desinfetantes naturais do que as bactérias Gram positivas testadas. Conclui-se que o resgate de conhecimentos tradicionais permitiu a obtenção de conhecimentos com grande potencial de emprego em práticas preventivas de produção animal.

Palavras Chaves: Etnoveterinária, Plantas Medicinais, Mastite Bovina.

Antibacterial Activities of Medicinal Plants Used Antisepsis/Disinfectants in
Ethnoveterinary against Bacterial Relationship with Bovine Mastitis

Abstract

In early years, after of the resolution adopted by the 30th World Health Assembly in 1977, urging interested to integrate traditional systems of medicine into health delivery systems. This work subjected to available disinfection/antisepsis practices with medicinal plants in animal production. Antibacterial activity (bacteriostatic or bactericidal) of the hidroalcoholic (EHA) or decoction (DEC) extracts of the five species (*Baccharis trimera*, *Bidens pilosa*, *Eucalyptus* spp, *Polygonum hydropiper* e *Tagetes minuta*) were determined through the serial dilution method in the multiple tube system against contagious bovine mastitis bacterial. EHA from leaves of *Eucalyptus* sp. was the most bacteriostatic effective, and the same extract more EHA *B. trimera* and DEC *T.*

minute the most bactericidal effective. *P. aeruginosa* was more resistant than Gram positive bacterial. The conclusion that medicinal plants used ethnoknowledge system can improve livestock health in the agroecologic systems, related to the studied transmitted agents.

Key Words: Ethnoveterinary, Medicinal Plants, Mastitis

Introdução

Durante os milhares de anos da civilização, o homem apreendeu da natureza os recursos indispensáveis para sua evolução. Destes recursos naturais, as plantas medicinais estão entre aqueles que contribuíram com grande importância. A revalorização deste conhecimento, como tem sido provocado pela OMS em vários âmbitos e documentos, a partir da Conferência de Atenção Primária de Alma Ata (DECLARAÇÃO DE ALMA-ATA, 1978), nos traz a necessidade de revisar nosso enfoque de medicina veterinária, na direção da integração do novo ou cientificamente desenvolvido com os saberes tradicionais ou não ortodoxos. A segurança, eficácia e acessibilidade a esses recursos naturais são questões que precisamos avaliar ao tratar desta questão, resolvendo-a através da pesquisa e da discussão de políticas de uso (AKERELE, 1988; DE MAAR, 1992; ZHANG, 2002).

No mesmo sentido, a aplicação dos conhecimentos tradicionais na resolução dos problemas de produção animal estão sendo revalorizados. Especialmente, devido aos problemas ambientais decorridos pelo sistema dito “moderno” de produção, pela crescente consciência do consumidor frente ao risco que resíduos de produtos químicos nos alimentos podem gerar e pelos aspectos sociais de produção, especialmente, a dependência tecnológica e sustentabilidade da produção, na esteira dos princípios da agroecologia. O mercado mundial de produtos ecológicos cresce rapidamente e

alternativas tecnológicas precisam ser disponibilizadas para esse modo de produção (FERNANDEZ; GARCIA, 2001; SEVILLA-GUZMANN; 2001; RIVERA; BRUGAROLAS, 2003).

A mastite bovina é a enfermidade mais prevalente na bovinocultura moderna, determinando custos econômicos importantes com relação à redução de produção leiteira, a perda definitiva de animais e pelos custos de controle e tratamento por ela gerados (WELLENBERG ET AL., 2002). Entre os métodos aplicados para controle da mastite contagiosa, utiliza-se a desinfecção dos equipamentos de ordenha e antisepsia do tetos pós-ordenha, com forte impacto positivo no controle da enfermidade (NATZKE, 1980; GIL ET AL., 1990). Os microrganismos mais encontrados como causa de mastite em bovinos no Brasil são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*, *Corynebacterium bovis* e, com menor incidência nas condições brasileiras de produção, bactérias Gram negativas (FERREIRO ET AL., 1985; GOMES ET AL., 1996; COSTA ET AL., 1995)

O objetivo deste trabalho é realizar a avaliação “in vitro”, através do método de diluição em tubos múltiplos adaptado a microtécnica, da ação antibacteriana de extratos hidroalcoólicos (EHA) e decoctos (DEC) de plantas resgatadas do saber de agricultores familiares assentados, com vistas na utilização para desinfecção/anti-sepsia na prevenção de mastite bovina.

Material e Métodos

Seleção, Coleta e Armazenamento das Plantas: As plantas foram selecionadas a partir da construção participativa entre técnicos, agricultores e estudantes da Faculdade de Veterinária de um projeto de produção orgânica, construído em espaços participativos de troca de experiências do grupo através, de reuniões periódicas e dias de campo, em uma

cooperativa de assentados da reforma agrária (COOPAVA Município de Piratini, RS; coordenadas 4587 E, 6070N) (FARIAS ET AL., 2003).

As plantas foram colhidas ao final do verão (mês de março), secas ao ar, protegida da luz solar direta, fragmentadas e armazenadas em ambiente seco até o uso. Exsiccatas foram produzidas e depositadas no herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas.

Produção dos Extratos: Extratos hidroalcolólico (EHA) e decocto (DEC) foram produzidos de todas as plantas a partir de folhas e talos segundo a Farmacopéia Brasileira (1959). O EHA foi obtido pela maceração durante 15 dias de 100g de planta seca em 1000 mL de álcool de cereais à 70⁰ GL, com agitação diária. Após, foi filtrado em filtro de gaze e armazenado em frasco âmbar. Para realização do ensaio antimicrobiano, o álcool foi extraído em evaporador rotativo sob pressão reduzida e re-hidratado ao volume original com água destilada estéril. Para obtenção do DEC, as plantas foram submetidas à fervura em fogo brando, durante 10 minutos, numa proporção de 100 g de planta para 1 L de água. Após, o extrato foi filtrado e o volume inicial de água foi recomposto. EHA e DEC assim produzidos são as soluções desinfetantes a testar.

Bacterioteca e Preparo do Inóculo: A bacterioteca foi constituída a partir de amostras bacterianas isoladas a partir de leite na rotina de diagnóstico do Laboratório de Doenças Infeciosas, FV/UFPEL representativas dos agentes etiológicos mais importantes em mastite contagiosa bovina e caracterizado bioquímico e tintorialmente segundo (QUINN ET AL., 1998). No total, oito amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva, seis amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa e oito amostras de *Streptococcus spp* (cinco *S. agalactiae*, dois *S. dysgalactiae* e um *S. uberis*) foram utilizadas, sendo mantidas com repiques mensais em Ágar base adicionado de 8% de sangue ovino. A

essas amostras, foram acrescentadas duas cepas padrões – *S. aureus* (ATCC 12600, coagulase positiva) e *P. aeruginosa* (ATCC 10145). O inóculo foi produzido a partir de cultura recente em caldo BHI de cada uma das amostras, diluídas em base logarítmica 10, em meio BHI 2x, até obter-se oito diluições sendo a maior apresentando concentração bacteriana entre 10^{2-3} UFC.mL⁻¹.

Técnica de Microdiluição: O ensaio foi realizado sobre microplacas de fundo plano com 96 orifícios. Foram testadas seis diluições de cada extrato em água destilada estéril, com concentração final de 50, 30, 20, 10, 5 e 4%. Cada diluição do extrato foi confrontada com as oito diluições bacterianas, acrescentando-se 100µL de cada, diluição da solução desinfetante e da diluição bacteriana, em um orifício da microplaca e incubada a 37⁰ C, por 48 horas. A avaliação da inativação bacteriana foi executada repetindo-se o trabalho com desinfetadores adicionados ao meio de cultura utilizado para diluir a bactéria. Controles positivos e negativos foram realizados. Todo o trabalho foi realizado em duplicata.

Leitura, Interpretação e Análise Estatística: A leitura foi realizada através do sub-cultivo de uma amostra do meio de cultura de todas as reações em Agar BHI. Nos testes de *Streptococcus spp*, esse Agar BHI era adicionado de plasma equino para crescimento mais rico. Considerou-se com efeito antimicrobiano todos os orifícios onde não foi possível ao sub-cultivo recuperar o microrganismo semeado. O resultado era reportado atribuindo-se um índice intensidade de inibição (IINIB) ou inativação (IINAB) bacteriana, quando o teste era realizado na ausência ou presença de desinfetador bacteriano, respectivamente. Esse índice é representado por variáveis ordinais aleatórias, variando de 0 (nenhuma atividade antibacteriana) a 8 (máxima atividade), de acordo com a diluição bacteriana que uma solução desinfetante em uma dada concentração foi capaz de impedir a recuperação bacteriana após o plaqueamento (CARVALHO, 2004).

Considerando-se que as variáveis dependentes IINIB e IINAB são ordinais e não paramétricas, a análise estatística foi realizado utilizando-se a análise de variância e a comparação entre médias por postos de Kruskal-Wallis para comparar as 10 soluções desinfetantes (cinco plantas e duas formas de extração), assumindo-se que cada amostra bacteriana é uma repetição dentro do seu grupo. Utilizando-se o mesmo método, comparou-se a resistência de cada grupo bacteriano aos desinfetantes testados. A correlação entre IINIB e IINAB foi avaliado pelo coeficiente de Spearman e as diferenças entre DEC e EHA pelo teste pareado de Wilcoxon (CALLEGARI-JACQUES, 2002). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistix 8.0.

Resultados

Através do método participativo, as plantas selecionadas foram: *Baccharis trimera* (Less) D.C., Compositae (Asteracea), nome popular carqueja; *Bidens pilosa* L., Compositae (Asteracea), nome popular picão-preto; *Eucalyptus spp* Labill., Myrtaceae, nome popular eucalipto; *Polygonum hydropiper*, Polygonaceae, nome popular erva-de-bicho; e *Tagetes minuta* (Linn.), Compositae (Asteracea), nome popular picão-do-reino, chinchilho.

Todas as soluções desinfetantes apresentaram algum efeito antibacteriano. A análise geral dos resultados, expresso na Tabela 1, demonstrou que o EHA de *Eucalyptus spp* apresentou-se como a solução desinfetante com melhor IINIB. Aparecem em um segundo grupo, o DEC de *T. minuta* e os EHA de *B. trimera*, *T. minuta* e *B. pilosa*, esta em posição intermediária. Em relação ao IINAB, o grupo de maior eficácia é formado pelo EHA de *Eucalyptus spp*, *B. trimera* e o DEC de *T. minuta*. Em ambas as análises, os dois extratos de *P. hydropiper* apresentam-se com o pior desempenho juntamente ao DEC de *Eucalyptus spp*.

O coeficiente de correlação entre IINIB e IINAB foi de 0,6978, considerada alta correlação. Os extratos hidroalcoólicos apresentaram atividade superior aos decoctos com exceção do IINAB do picão-preto, do IINIB do picão-do-reino onde não houve diferença entre os extratos ($p < 0,05$) e do IINAB do picão-do-reino onde o DEC foi superior ao EHA ($p = 0,0000$). Podem-se observar diferenças significativas entre as concentrações dos extratos, tanto ao IINIB ($p = 0,0047$) quanto ao IINAB ($p = 0,042$), sendo atividade antibacteriana inversamente proporcional a sua diluição (dados não demonstrados).

Na Tabela 2, apresentam-se os resultados quanto aos grupos bacterianos. Pode-se observar que *P. aeruginosa* foi mais resistente que os outros três grupos bacterianos que, por sua vez, não diferiram entre si (IINIB $p = 0,0042$; IINAB $p = 0,000$).

Ainda, frente ao gênero *Streptococcus spp*, duas soluções desinfetantes apresentaram inibição bacteriana na concentração de 4% (EHA de *T. minuta* e de *Eucalyptus spp*). Com relação ao *Staphylococcus* coagulase positiva, somente o EHA de *Eucalyptus spp* foi capaz de inibir algumas amostras a 4 e 5% (três de nove isolados testados) e inativar a 5 e 10 g/L (respectivamente, um e dois isolados). Somente o EHA de *Eucalyptus spp* inibiu amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa a 4 e 5 % e inativou a 5 e 10%. A *P. aeruginosa* foi a bactéria mais resistente. Ambos os extratos de *P. hydropiper*, *B. pilosa* e os decoctos de *B. trimera* e *Eucalyptus spp* não apresentaram ação inibidora na maior concentração utilizada (50%). O EHA de *Eucalyptus spp* e de *B. trimera* e o DEC de *T. minuta* inibiram até 30%, em diferentes intensidades. Somente o DEC de *T. minuta* foi capaz de inativar a bactéria, na sua maior concentração em muito baixa intensidade (IINAB médio de 1,5).

Discussão

O método etnoveterinário permite acumular e perpetuar conhecimentos desenvolvidos ao longo da História do homem. Além disso, permite obter informações que podem ser utilizada pela ciência para obtenção de novos produtos e de novas tecnologias. Neste caso, podemos demonstrar a atividade antibacteriana de extratos de plantas informadas por agricultores familiares como anti-sépticos/desinfetantes.

A formação étnica do grupo de agricultores pesquisados é variada, com contribuição européia, africana e ameríndia, como a maior parte da população brasileira. Estavam assentados a aproximadamente 10 anos, a maioria originados da região alto Uruguai, noroeste do Rio Grande do Sul, e, após passar um período aproximado de 3 anos acampados, foram assentados em terra de uma antiga empresa agrícola (DA SILVA, 2005; MULLER ET AL. 2005).

Dessa forma, é esperado que os seus saberes tenham sido forjados na infância e juventude, a partir da cultura de seu local de emigração, e no processo de formação durante a sua peregrinação militante nos acampamentos ligados ao Movimento dos Trabalhadores Sem-Terra. AKABWAI ET AL. (1997) entendem que a etnoveterinária é dinâmica, sempre com o incremento de novas informações gerados localmente ou introduzidas e adaptadas localmente.

As plantas selecionadas são nativas (picão-do-reino, carqueja, erva-de-bicho, picão-preto) ou introduzidas (eucalipto) e apresentam referenciais na literatura pra sua atividade antimicrobiana (MACHADO ET AL., 1988; PATTNAIK ET AL., 1996; TERESCHUK ET AL., 1997; AVANCINI ET AL., 1999; SOUZA ET AL., 2000; TAKAHASHI ET AL., 2004).

A atividade antimicrobiana de outras espécies do gênero *Polygonum*, conhecidos também por erva-de-bicho é referida na literatura (ALVES ET AL., 2001). Porém, a espécie *P. hydropiper* não parece ter sido avaliada ainda quanto a seu efeito antibacteriano. Neste trabalho, a atividade de ambos os extratos da planta foi muito baixa.

Embora não seja uma bactéria típica de mastite contagiosa, a utilização de *P. aeruginosa* foi importante, pois é uma bactéria bastante resistente à ação de desinfetante e indicada para avaliação de sanitizadores para mastite (AUSTRALIAN PESTICIDES & VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2001). Quatro soluções desinfetantes foram capazes de inibir a bactéria (EHA *T. minuta*, *Eucalyptus* e *B. trimera* e DEC de *T. minuta*). Porém, somente o DEC de *T. minuta* foi capaz de inativar a bactéria.

O EHA permite o armazenamento das plantas medicinais por longos períodos, tornando o seu uso independente da sazonalidade. Podemos demonstrar que os extratos EHA foram, em geral, mais ativos do que os DEC. A exceção foi o *T. minuta*, onde a habilidade do DEC em inativar as bactérias testadas foi superior, indicando que esta planta apresenta princípios ativos antibacterianos hidrossolúveis importantes para a eficácia do extrato cru.

O processo de produção do decocto, em especial o tempo e a quantidade de calor empregados, interferem na atividade do extrato obtido. Na prática dos agricultores informantes, são utilizados três minutos de cocção em recipiente tampado. Esse processo não pode ser utilizado na prática laboratorial, pois o índice de contaminação do sistema de avaliação “in vitro” é muito alto.

O método dos tubos múltiplos é adequado ao teste de extratos de plantas e a variação na concentração bacteriana permite avaliar a solução desinfetante frente a diferentes doses infectantes e situações-problema (AVANCINI ET AL., 2000). A adaptação à micro-técnica manteve a reprodutibilidade da técnica, economizando tempo e material para a sua realização.

Conclusão

As plantas avaliadas, resgatadas de experiências de vida de agricultores assentados, apresentam componentes antimicrobianos que podem ser extraídos por solvente aquoso ou etanólico com potente atividade frente a bactérias relacionadas à mastite contagiosa (*Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Streptococcus* spp), com exceção dos extratos de *P. hydropiper* e o DEC de *Eucalyptus*. Aquelas plantas poderão vir a ser utilizadas em desinfecção/anti-sepsia em situações-problemas em que tais agentes bacterianos estejam envolvidos.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a CAPES, a COOPAVA e ao MST pela possibilidade da realização deste trabalho. Agradecemos a FIOCUZ as amostras padrões.

Referências Bibliográficas

- AKABWAY, D.; LEYLAND, T.; STEM, C. Provision of sustainable animal health delivery systems, which incorporate traditional livestock knowledge, to marginalized pastoralist areas. In: *Ethnoveterinary Medicine: alternatives for livestock development*. In: International Conference held in Pune, India, v. 1, parte 4: Application of ethnoveterinary medicine. 1997. Pune, India. Anais. Disponível em: <http://www.ethnovetweb.com>. Acesso em: 07/01/2007
- AKERELE, O. Medicinal plants and primary health care: an agenda for action. *Fitoterapia*, v. 59, p. 355-363, 1988.
- ALVES, T.M.A.; RIBEIRO, F.L.; KLOOS, H.; ZANI, C.L. Polygodial, the fungitoxic component from the Brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 831-833, 2001.
- AUSTRALIAN PESTICIDES & VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, Interim Guidelines for data to support efficacy and safety of teat sanitizers. Disponível em: http://www.apvma.gov.au/guidelines/teat_sanitisers.shtml (2001). Acesso em: 07/01/2007.
- AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, p. 230-234, 2000.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. *Bioestatística. Princípios e aplicações*. Porto Alegre: Art Med, 2003. v. 1. 255 p.

- CARVALHO, H.H.C. Avaliação da atividade antibacteriana de plantas com indicativo etnográfico condimentar. 2004. 200f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - UFRGS, Porto Alegre, 2004.
- COSTA, E. O.; COSTA, E.O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A. ; PARDO, R. B. ; RIBEIRO, A. R. ; WATANABE, E. T. . Estudo etiológico da mastite clinica bovina.. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 17, n. 4, p. 156-158, 1995.
- DA SILVA, P.L. Potencialidades e limites na produção de leite ecológico na Cooperativa E Produção Agropecuária Vista Alegre Piratini Ltda (COOPAVA). 2005. 19f. Monografia (Curso de ensino médio na modalidade de educação jovens e adultos) - ITERRA, Viamão, 2005.
- DECLARAÇÃO DE ALMA ATA. Conferência Internacional sobre Cuidados Primários em Saúde, Alma-Ata, URSS. 1978.
- DE MAAR, T.W. Qué contienen esas botellas? *CERES*, v.136, p. 40-45, 1992.
- FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959.
- FARIAS, N.A.R.; dos SANTOS, T.R.B.; SCHUCH, L.F.D. Relatório de projeto de pesquisa “Implantação de novas tecnologias para a produção de leite ecológico”. Proc. N^o 00/2648.5, FAPERGS, Porto Alegre – RS, 2003.
- FERNANDEZ, X.S. & GARCIA, D.D. Desenvolvimento rural sustentável: uma perspectiva agroecológica. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*, Porto Alegre, v. 3, n. 2, p. 17-25, 2001.
- FERREIRO, L.; FERREIRO, C.L.R.; BANGEL JR., J.J.; SOARES, H.C.; MOOJEN, V.; FERNANDES, J.C.T. Mastite bovina na grande Porto Alegre, RS – Brasil. 1. Agentes etiológicos isolados durante o período 1982 – 1985. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 31, p. 81-88, 1985.

- GIL, R.; HOWARD, W.H.; LESLIE, K.E.; LISSEMORE, K. Economics of mastitis control. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 3340-3348. 1990.
- GOMES, F.R.; CARDOSO, C.M.; SILVA, V.S.; LADEIRA, S.L. Principais agentes etiológicos de mastite na bacia leiteira de Pelotas. In: V Congresso de Iniciação Científica, UFPEL, UCPEL e FURG, 1996. Rio Grande, RS. Resumos. p. 172.
- MACHADO, J.O.; SANTOS, E.; LEFÉVRE, AF. Atividade antibacteriana de extratos de *Bidens pilosa* L. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 10, p. 55-62, 1988.
- MULLER, M.M.U.; TAVARES, J.C.; AUED, I.M. Os elementos da construção do espaço transitório na COOPAVA. *Revista Discente Expressão Geográfica*, v. 1, p. 72-85, 2005.
- NATZKE, R.P. Elements of mastitis control. *Journal of Dairy Science*, v. 64, p. 1431-1436, 1981.
- PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAN, V.R.; KOLE, C. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios*, v. 86, p. 237-246, 1996.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. Ed. Wolfe, Londres, 1998. 648p.
- RIVERA, L.M. & BRUGAROLAS, M. Estrategias comerciales para los productos ecológicos. *Distribución y Consumo*, Enero-Febrero, p. 15-22, 2003.
- SEVILLA-GUZMAN, E. Uma estratégia de sustentabilidade a partir da agroecologia. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*, v. 2, p. 35-45, 2001.
- 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 Veterinary Research and Animal Science*, v. 37, p. 429-433, 2000.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculate*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 39, p. 60-64, 2004.

TERESCHUK, M.L.; RIERA, M.V.Q.; CASTRO, G.R.; ABDALA, L.R. Antimicrobial activity of flavonóides from leaves of *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 56, p. 227-232, 1997.

ZHANG, X. *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005*. 2002.

Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em 15/09/2003.

TABELA 1: IINIB E IINAB médio e desvio padrão das soluções desinfetantes frente a isolados bacterianos de leite mastítico e padrões (n=25; r=2).

Planta ^{***}	Extrato ^{****}	Média	Variável dependente	p entre extratos da planta
1	1	0,607 ^{e, B}	IINIB [*]	0,0198
		0,000 ^{e, B}	IINAB ^{**}	
1	2	1,310 ^{e, A}	IINIB	0,0140
		0,113 ^{d, e, A}	IINAB	
2	1	3,113 ^{c, d, B}	IINIB	0,0000
		1,063 ^{c, B}	IINAB	
2	2	4,740 ^{b, A}	IINIB	0,0000
		3,493 ^{a, A}	IINAB	
3	1	2,513 ^{d, B}	IINIB	0,0000
		1,733 ^{b, c, A}	IINAB	
3	2	3,653 ^{b, c, A}	IINIB	0,9697
		1,823 ^{b, c, A}	IINAB	
4	1	4,423 ^{b, A}	IINIB	0,3270
		2,687 ^{a, b, A}	IINAB	
4	2	4,763 ^{b, A}	IINIB	0,0000
		1,113 ^{c, d, B}	IINAB	
5	1	0,203 ^{e, B}	IINIB	0,0000
		0,013 ^{e, B}	IINAB	
5	2	5,927 ^{a, A}	IINIB	0,0000
		3,633 ^{a, A}	IINAB	

IINIB p=0,0026 e IINAB = 0,0000

Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$) considerando separadamente IINIB e IINAB, minúsculas referem-se à comparação entre as soluções desinfetantes através da análise de dados ordinais não paramétricos de Kruskal-Wallis e as maiúsculas referem-se à comparação entre forma de extração de cada planta pelo teste pareado de Wilcoxon, com p apresenta na última coluna.

* IINIB – Índice de inibição da solução desinfetante.

** IINAB – índice de inativação da solução desinfetante.

*** Planta 1: *Polygonum hydropiper*;

Planta 2: *Baccharis trimera*;

Planta 3: *Bidens pilosa*;

Planta 4: *Tagetes minuta*;

Planta 5: *Eucalyptus spp.*

**** Extrato 1: Decocto

Extrato 2: Hidroalcoólico

TABELA 2: IINIB E IINAB médio das soluções desinfetantes frente aos diferentes grupos bacterianos isolados de leite mastítico e padrões.

Grupo bacteriano		N [*]	Média
1	IINIB ^{**}	9	3,138 ^a
	IINAB ^{***}	9	1,371 ^a
2	IINIB	7	3,293 ^a
	IINAB	7	1,706 ^a
3	IINIB	8	3,281 ^a
	IINAB	8	1,859 ^a
4	IINIB	1	0,592 ^b
	IINAB	1	0,025 ^b

Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$) considerando separadamente IINIB e IINAB, através da análise de dados ordinais não paramétricos de Kruskal-Wallis.

*N: número de amostras testadas.

**IINIB – Índice de inibição da solução desinfetante.

***IINAB – índice de inativação da solução desinfetante.

*** Grupo 1: *Staphylococcus* coagulase positiva
 Grupo 2: *Staphylococcus* coagulase negativa;
 Grupo 3: *Streptococcus spp*;
 Grupo 4: *Pseudomonas aeruginosa*

CINÉTICA DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA “IN VITRO” DE EXTRATOS NATURAIS FRENTE A MICRORGANISMOS RELACIONADOS À MASTITE BOVINA.

Luiz Filipe Damé Schuch; José Maria Wiest; Helen Silveira Coimbra; Luciana Souza Prestes; Leticia De Toni; Juliana dos Santos Lemos

RESUMO

O presente trabalho busca avaliar a cinética da atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais frente a bactérias relacionadas com mastite bovina. Para tal, foram produzidas soluções desinfetantes a partir de folhas e talos de *Baccharis trimera* (Less) D.C., Compositae (Asteraceae), *Eucalyptus spp* Labill., Myrtaceae e *Tagetes minuta* (Linn.), Compositae (Asteraceae), através de extração hidroalcoólica (EHA) e decocto (DEC). Os microrganismos utilizados foram *S. aureus*, *S. agalactiae* e *P.aeruginosa*. Avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada permitindo o contato da solução desinfetante com uma suspensão bacteriana com a concentração de ao menos 10^5 UFC.mL⁻¹ de cada, por intervalos de 30 segundos, 2, 10 e 30 minutos, com e sem matéria orgânica. Após, alíquotas foram semeadas em placas de ágar BHI e o número de colônias remanescentes foi contado. O trabalho foi realizado com um controle comercial, clorexidina a 0,18%, e sempre em duplicata. Encontrou-se que para *S. aureus*, os EHA de *Eucalyptus spp* e de *T. minuta* não diferiram do controle, para *S. agalactiae* além daquelas duas, EHA de *B. trimera*, não diferiu do controle, enquanto que DEC de *Eucalyptus* e o DEC de *B. trimera* também foram ativos frente à bactéria na ausência de matéria orgânica necessitando de maior tempo de contato. Para *P. aeruginosa*, na ausência de matéria orgânica, todas as soluções desinfetantes diferiram do controle, embora os três EHA tenham inativado a bactéria em 10 ou 30 minutos. Todas as soluções desinfetantes testadas, inclusive o controle, reduziram sua atividade antibacteriana na presença de matéria orgânica. Conclui-se que extratos de plantas medicinais apresentam potencial para serem utilizados em situações problema em que as bactérias aqui avaliadas estejam envolvidas.

Palavras chaves: Plantas Mediciniais, Mastite Bovina, Clorexidina, Matéria Orgânica, Desinfecção.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY KINETICS OF MEDICINAL PLANTS EXTRACTS AGAINST BOVINE MASTITIS PATHOGENS

ABSTRACT

The subject of this paper is to test antimicrobials activities by medicinal plants extracts against more important contagious bovine mastitis pathogens. Disinfectants solutions was made from *Baccharis trimera* (Less) D.C., Compositae (Asteracea), *Eucalyptus spp* Labill., Myrtaceae e *Tagetes minuta* (Linn.), Compositae (Asteracea) plants by hidroalcoholic extraction (EHA) or decoction (DEC). *S. aureus*, *S. agalactiae*, and *P. aeruginosa* were used. To test for in vitro efficacy, each solution disinfectant was mixed with bacterial suspension containing 10^5 CFU.mL⁻¹, by 30 seconds, two, 10 ant 30 minutes, with and without 20% of integral milk. Viable bacteria were evaluated by directed plating of neutralized aliquots. The worked included chlorhexidine 0,18% by control and it was executed in duplicate. EHA *Eucalytpus spp* and EHA *T. minuta* were as effective as control chlorhexidine against *S. aureus*. This solutions plus EHA *B. trimera*, were as effective as control against *S. agalactiae*. DEC *Eucalyptus* and DEC *B.*

trimera also inactivated *S. agalactiae* in more prolonged time. Chlorhexidine was the best against *P. multocida* in milk absence, although the EHA were effective at ten or thirty minutes. All solutions, inclusive control, it was sensibility to organic load. The observations from the in vitro studies presented here need to be substantiated by in vivo studies by to confirm the potentiality use of plants medicinal extracts as disinfectants/antiseptics in livestock health.

Key words: Medicinal Plants, Bovine Mastitis, Chlorhexidine, organic matter, Disinfection.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais na medicina veterinária tem uma História milenar. O desenvolvimento desse conhecimento acompanhou a aprendizagem do homem nos cuidados da sua própria saúde. A etnoveterinária busca resgatar esses saberes tradicionais estabelecendo uma conexão entre esses saberes e o saber científico. Essa sistemática de empoderamento do conhecimento tradicional pode servir a geração de tecnologias que possam dar conta das demandas de novos sistemas de produção agrícola baseados na utilização de insumos renováveis, gerados na própria comunidade, portanto equânime e participativo, integrando o tradicional com o cientificamente desenvolvido (DE MAAR, 1992; AKABWAY et al., 1997; LEBEL, 2003; WANZALA et al. 2005).

A agroecologia é uma ciência que busca o estudo de experiências produtivas de agricultura ecológica, para elaborar propostas de ação social coletiva que revelem a natureza depredadora do modelo produtivo agroindustrial hegemônico, para substituí-lo por outro que aponte para “uma agricultura sustentável, mais justa, economicamente viável e ecologicamente apropriada” (SEVILLA-GUZMAN, 2001).

O desenvolvimento é entendido como a realização de potencialidades sociais, culturais e econômicas de uma sociedade, em perfeita sintonia com seu entorno ambiental e seus valores éticos. O estabelecimento de agroecossistemas nesta perspectiva passa pelo resgate das práticas tradicionais e a construção participativa de alternativas sustentáveis de produção de base ecológica. (CAPORAL & COSTABEBER, 2002).

A inflamação da glândula mamária determina perdas qualitativas e quantitativas na produção de leite, sendo necessárias diversas atitudes de manejo para seu controle e prevenção, sendo a desinfecção de tetos pós-ordenha uma das mais importantes para o controle da mastite contagiosa (GIL et al., 1990; DEGRAVES & FETROW, 1993; LARANJA & MACHADO, 1994; EKMAN, 2002; WELLENBERG et al., 2002).

Este trabalho tem por objetivo avaliar “in vivo” o potencial do extrato hidroalcolólico e do decocto de plantas medicinais utilizadas como desinfetante/anti-séptico por agricultores familiares, na desinfecção de úbere de vacas pós-ordenha, na tentativa de apresentar sob base científica um saber tradicional que possa ser aplicado em sistemas de manejo agroecológico de gado de leite.

MATERIAIS E MÉTODO

Plantas: Foram utilizadas plantas com indicativo etnográfico anti-séptico/desinfetantes, conforme descrito (SCHUCH et al., enviado para publicação). As plantas foram *Eucalyptus spp*, *Baccharis trimera* e *Tagetes minuta*, a primeira coletada de bosques cultivados a, pelo menos, 15 anos e as demais de brotação natural. As plantas foram colhidas no mês de março, num raio de 1 km da referência geográfica

4587 E, 6070N, Município de Piratini, RS. Folhas e talos foram secos ao ar, protegidos da luz solar direta e da poeira, trituradas grosseiramente e armazenadas até o uso.

Extratos: Foram produzidos extratos hidroalcoólicos (EHA) e decoctos (DEC) das plantas segundo a Farmacopéia Brasileira (1959). Brevemente, o EHA foi obtido pela maceração de 100g de planta seca em 1L de álcool de cereais à 70^oGL, durante 15 dias com agitação diária. Após, o extrato foi filtrado em filtro de gaze e armazenado em frasco âmbar. No dia de uso, esse extrato foi submetido à destilação fracionada em rota-evaporador à pressão reduzida para extração do álcool. O DEC foi produzido através da cocção de planta seca em água destilada a 10% (p/v) em fogo brando durante 10 minutos e filtrada em filtro de gaze. Após, nas duas formas de extração, foi realizada re-hidratação com água destilada reconstituindo a concentração original do extrato que foi denominado solução desinfetante. Esses procedimentos foram realizados à não mais que 24 horas antes do uso.

Bactérias: Para avaliação do efeito antibacteriano foram utilizadas três microrganismos representativos daqueles envolvidos em mastite bovina: *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Streptococcus agalactiae* isolado de amostra de campo e caracterizado no Laboratório de Doenças Infecciosas da FV/UFPel através de suas características bioquímicas e tintoriais, segundo Quinn et al. (1998) e *P. aeruginosa* (ATCC 10145). As amostras foram mantidas em repiques mensais em Ágar base adicionado com 8% de sangue ovino e ativadas na véspera do uso por cultivo em Caldo BHI por 16-20 horas. O inóculo era preparado pela diluição em solução salina (NaCl – 0,8%) deste cultivo até uma concentração entre 10⁷⁻⁸ UFC/mL.

Método: Dois tubos de ensaio contendo 4 mL da solução desinfetante para cada bactéria foram preparados. A um desses tubos, foi acrescentado 1 ml de água destilada estéril e no outro 1 ml de leite integral bovino esterilizado (matéria orgânica). Então, os tubos eram inoculados com 50 µL do inóculo, agitados vigorosamente em vórtex e alíquotas de 40 µL eram retiradas em intervalos de 30 segundos, 2, 10 e 30 minutos e semeadas em tubo com 4 mL de BHI adicionado de neutralizantes químicos de desinfetantes. Uma alíquota de 40 µL de cada desses tubos era semeada em superfície de três placas de Petry contendo Agar BHI. As placas eram incubadas por 24 horas e as colônias eram contadas. Os tubos, também, eram incubados por 5 dias à 37^oC para controle da presença de atividade antibacteriana residual, semeando-se novamente a bactéria nos tubos sem crescimento, e para controle de contaminação. Controle sem desinfetante foi sempre realizado para compor o cálculo do Índice de Inibição (II). Além das seis soluções desinfetantes produzidas, foi incluído no experimento um desinfetante comercial a base de clorexidina (Clorexidina-Cetrimida[®]), na concentração final de 0,18%, conforme recomendado para uso em imersão de tetos pós-ordemha. Os testes foram desenvolvidos a temperatura ambiente (entre 20-25^oC) em câmara asséptica. Todo experimento foi realizado em duplicata.

Interpretação e análise estatística: O teste era considerado válido quando o inóculo continha entre 10⁷⁻⁸ UCF/mL, conforme avaliado pela contagem das placas controle. A contagem de todas as placas eram realizadas e as médias de cada repetição e do controle foram calculadas. Transformação logarítmica dessas médias foi realizada conforme recomenda Markus (1973), como segue: $\log(y+1)$. Então, foi constituído o II através da seguinte fórmula: $II=1-(\log \text{trat} + 1)/(\log \text{cont} + 1)^{-1}$.

Desta forma, o desenho experimental seguiu o delienamento fatorial com 7 (soluções desinfetantes) X 4 (tempos) X 2 (com e se matéria orgânica), em duplicata, analisando-se isoladamente cada uma das três bactérias e com a variável dependente

[®] Digluconato de clorexidina + cloreto de cetrimida, Chemitec.

expressa em II. Estes dados foram submetidas à análise de variância para delineamento fatorial e comparação de médias realizada segundo Dunnet para comparações com um padrão (clorexidina) e o efeito matéria orgânica foi analisado para cada desinfetante utilizando o teste T pareado, todos a 0,05 de significância.

RESULTADOS

A clorexidina, utilizada neste experimento como controle, foi capaz de inativar as três espécies bacterianas durante o período testado. A ação sobre o *S. agalactiae* foi rápida havendo inativação total aos 30 segundos. Já a *P. aeruginosa* foi inativada aos 2 minutos e o *S. aureus* aos 10 minutos não apresentava mais células viáveis (Figura 1a). Quando em presença de matéria orgânica leite a 20%, a ação da clorexidina foi bastante reduzida ($p < 0,0000$). Apesar de demonstrar uma tendência de redução da contagem de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, a sua eficácia foi fraca, não ultrapassando $10^{0,3}$ de redução na contagem de células após 30 minutos de incubação. Porém, a clorexidina ainda foi capaz de inativar completamente o *S. agalactiae* na presença de matéria orgânica após 10 minutos de incubação.

Também, o EHA de Eucalipto foi capaz de inativar o inóculo dos três microrganismos testados, alcançando este resultado em 30 segundos, 10 minutos e 30 minutos para *S. agalactiae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente (Figura 1b). Sofreu influência da presença de leite a 20% ($p < 0,000$). Mas, foi capaz de inativar *S. agalactiae* após 10 minutos de contato, reduziu a contagem de *S. aureus* em até $10^{0,7}$ UFC/ml e não apresentou ação sobre a *P. aeruginosa* durante os 30 minutos de exposição.

O decocto de *Eucalyptus spp* teve a capacidade de eliminar completamente o *S. agalactiae* em 10 minutos de contato. Também, reduziu em $10^{0,5}$ UFC/mL a contagem de *S. aureus*. Não apresentou ação sobre *P. aeruginosa* e nem sobre nenhuma das três bactérias em presença de matéria orgânica (Figura 1c).

Os resultados referentes à curva de inativação do EHA de *T. minuta* são apresentados na Figura 1d. Não foi identificada ação antibacteriana deste extrato sobre a *P. aeruginosa*. Foi capaz de eliminar todas as células de *S. agalactiae* em 30 segundos, tempo que foi ampliado para 10 minutos quando em presença de matéria orgânica. Inativou o *S. aureus* em 30 minutos. Em presença de matéria orgânica, apenas aos 30 minutos percebe-se uma pequena tendência de redução da contagem de células (redução de $10^{0,35}$ UFC/mL).

O DEC *Tagetes minuta* apresentou fraco efeito antibacteriano sobre o *S. agalactiae*, reduzindo o número de células viáveis em $10^{0,3}$ UFC/mL. Sobre as outras bactérias e em presença de matéria orgânica não houve efeito antibacteriano detectável (dados não demonstrados).

O EHA de *B. trimera* apresentou ação antibacteriana sobre os três microrganismos testados, alcançando a inativação total de *S. agalactiae* em 30 segundos, *P. aeruginosa* em 10 minutos e *S. aureus* em 30 minutos (Figura 1e). Na presença de matéria orgânica, o EHA de “carqueja” foi capaz de inativar o *S. agalactiae* em 10 minutos e reduzir a concentração de *S. aureus* em $10^{0,5}$ UFC/mL ao final do experimento. Nessas condições, esse extrato não demonstrou ação sobre a *P. aeruginosa* em 30 minutos de contato.

Na Figura 1f, pode-se observar que houve a inativação de *S. agalactiae* após 10 minutos de exposição a DEC de *B. trimera*. Também, foi encontrada uma tendência a redução da contagem de *S. aureus* aos 30 minutos de contato de aproximadamente $10^{0,3}$ UFC/mL. *P. aeruginosa* sem matéria orgânica e nenhuma das três bactérias em presença de leite integral a 20% foram sensíveis a esse extrato.

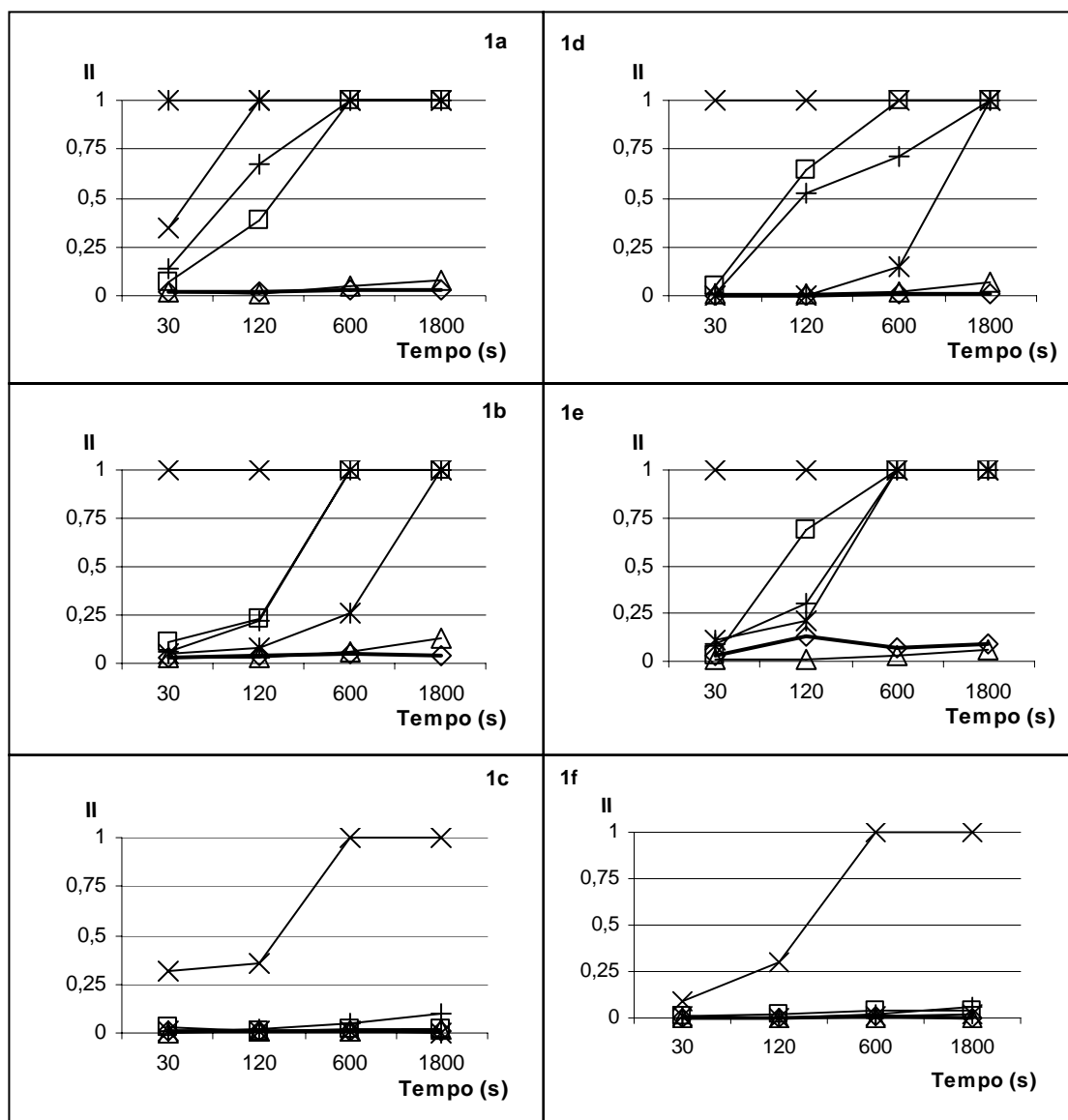
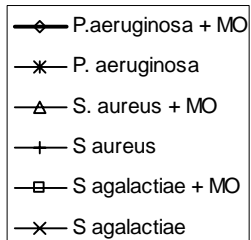


Figura 1: Cinética de inativação de três bactérias frente a diferentes soluções desinfetantes expresso em índice de inativação (II) em função do tempo de contato, com e sem a presença de matéria orgânica (MO). 1a. Clorexidina (0,55%); 1b. EHA de *Eucalyptus spp.*; 1c. DEC de *Eucalyptus spp.*; 1d. EHA de *Tagetes minuta*; 1e. DEC de *Baccharis trimera*; 1f. EHA de *Baccharis trimera*.



As médias do II, a significância da análise de variância e a comparação entre médias em função do padrão clorexidina a 0,18% das sete soluções desinfetantes analisadas estão expressas nas Tabelas 1, 2 e 3, divididas por microrganismo, respectivamente *S. agalactiae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Na ausência de matéria orgânica, todos menos o decocto de *T. minuta*, apresentaram forte ação bactericida sobre *S. agalactiae*. Porém, somente os EHA das três plantas não diferiram do controle, sendo inclusive mais rápidos na inativação da bactéria do que o controle. Na presença de matéria orgânica, dois grupos distintos são formados quanto ao II. O controle e os três EHA não diferiram estatisticamente, apresentando a capacidade de inativar as mais de 10^5 UFC/mL em que estiveram em contato. O outro grupo, representado pelos decoctos das três plantas, não apresentaram ação sobre a bactéria em trinta minutos de exposição.

Tabela 1: Índice de Inibição (II)** médio das sete soluções desinfetantes sobre *S. agalactiae* em função do tempo e da presença de matéria orgânica (M.O.)

Solução Desinfetante	Presença de M.O.	Tempo				Controle
		30 s	2 min	10 min	30 min	Log UFC/mL
Clorexidina	Não	0,343	1	1	1	6,090
(Controle)	Sim	0,074	0,387	1	1	
EHA	Não	1	1	1	1	5,315
<i>Eucalyptus spp</i>	Sim	0,112	0,228	1	1	
EHA	Não	1	1	1	1	5,011
<i>T. minuta</i>	Sim	0,051	0,639	1	1	
DEC	Não*	0,316	0,354	1	1	5,061
<i>Eucalyptus spp</i>	Sim *	0,026	0,013	0,015	0,019	
DEC	Não*	0,009	0,015	0,048	0,042	5,341
<i>T. minuta</i>	Sim *	0	0	0	0	
DEC	Não*	0,094	0,299	1	1	5,025
<i>B. trimera</i>	Sim *	0,011	0,019	0,042	0,040	
EHA	Não	1	1	1	1	5,097
<i>B. trimera</i>	Sim	0,032	0,684	1	1	

Obs.: Tratamentos identificados com * diferiram do controle através do teste de Dunnett ($p < 0,05$), analisando-se separadamente a variável presença ou ausência matéria orgânica.

**II=1-[log (UFC/mL do tratamento+1) / log (UFC/mL do controle+1)]. Valores negativos foram iguados a 0.

O controle e os três EHA foram capazes de inativar *S. aureus* durante o período do experimento. Porém, o EHA de *B. trimera* assim como os três decoctos diferiram do controle. Com a adição de matéria orgânica, as soluções desinfetantes controle e EHAs demonstraram uma tendência à redução da contagem bacteriana, mas com muita baixa eficácia. Nenhum dos decoctos demonstrou ação antibacteriana em 30 minutos.

O controle teve rápida ação frente *P. aeruginosa* na ausência de matéria orgânica, diferindo estatisticamente de todos os demais desinfetantes. Por outro lado, na presença de matéria orgânica, não apresentou nenhuma ação, assim como nenhum dos demais desinfetantes.

Tabela 2: Índice de Inibição (II) médio das sete soluções desinfetantes sobre *S. aureus* em função do tempo e da presença de matéria orgânica (M.O.).

Solução Desinfetante	Presença de M.O.	Tempo				Controle Log UFC/mL
		30 s	2 min	10 min	30 min	
Clorexidina	Não	0,139	0,678	1	1	5,279
	Sim	0,022	0,014	0,049	0,082	
EHA	Não	0,055	0,224	1	1	5,727
<i>Eucalyptus spp</i>	Sim	0,033	0,031	0,061	0,134	5,658
EHA	Não	0,009	0,529	0,715	1	
<i>T. minuta</i>	Sim	0,011	0,009	0,017	0,065	5,488
DEC	Não *	0,013	0,019	0,054	0,104	
<i>Eucalyptus spp</i>	Sim	0,004	0,007	0,012	0,022	5,705
DEC	Não *	0,012	0,005	0,014	0,015	
<i>T. minuta</i>	Sim	0,005	0,002	0,004	0,022	5,138
DEC	Não *	0	0	0,016	0,057	
<i>B. trimera</i>	Sim	0	0	0,001	0,005	5,392
EHA	Não*	0,002	0,065	0,324	1	
<i>B. trimera</i>	Sim	0,007	0,014	0,035	0,060	

Obs.: Tratamentos identificados com * diferiram do controle através do teste de Dunnett ($p < 0,05$) analisando-se separadamente a variável presença ou ausência matéria orgânica.

**II=1-[log (UFC/mL do tratamento+1) / log (UFC/mL do controle+1)]. Valores negativos foram igualados a 0.

Tabela 3: Índice de Inibição (II) médio das sete soluções desinfetantes sobre *P. aeruginosa* em função do tempo e da presença de matéria orgânica (M.O.).

Solução Desinfetante	Presença de M.O.	Tempo				Controle Log UFC/mL
		30 s	2 min	10 min	30 min	
Clorexidina	Não	1	1	1	1	5,000
	Sim	0,024	0,018	0,032	0,032	
EHA	Não *	0,046	0,077	0,257	1	5,021
<i>Eucalyptus spp</i>	Sim	0,030	0,040	0,047	0,037	5,612
EHA	Não *	0	0,002	0,145	1	
<i>Tagetes minuta</i>	Sim	0,002	0,005	0,006	0,009	5,344
DEC	Não *	0,008	0,010	0,010	0,004	
<i>Eucalyptus spp</i>	Sim	0,015	0,013	0,012	0,010	5,001
DEC	Não *	0,041	0,037	0,029	0,023	
<i>Tagetes minuta</i>	Sim	0,020	0,030	0,031	0,016	5,011
DEC	Não *	0,008	0	0,007	0,019	
<i>Baccharis trimera</i>	Sim	0	0	0,011	0	5,007
EHA	Não *	0,113	0,215	1	1	
<i>Baccharis trimera</i>	Sim	0,032	0,135	0,076	0,086	

Obs.: Tratamentos identificados com * diferiram do controle através do teste de Dunnett ($p < 0,05$) analisando-se separadamente a variável presença ou ausência matéria orgânica.

**II=1-[log (UFC/mL do tratamento+1) / log (UFC/mL do controle+1)]. Valores negativos foram igualados a 0.

DISCUSSÃO

Uma solução desinfetante deve ser adequada às situações problema na qual será empregada. Para ser utilizada na desinfecção de tetos na rotina de ordenha de bovinos deve ser eficaz sobre os agentes envolvidos na mastite, com o tempo de ação compatível com o manejo a que os animais são submetidos e com pouca suscetibilidade aos fatores intervenientes presença de matéria orgânica, pH e suporte. Além disso, não

deve possuir efeito colateral sobre a pele do animal e não deixar resíduos no leite. Por outro lado, efeitos deletérios sobre a pele e a mucosa dos tetos pode favorecer a instalação de novas infecções intra-mamária. Em geral, a concentração eficaz dos desinfetantes tradicionais é muito próxima a sua dose lesiva das estruturas de superfície do teto (BODDIE et al., 1997, OURA et al. 2002; PEDRINI & MARGATHO, 2003).

A desinfecção de tetos é uma prática incorporada na rotina de ordenha, sendo importante para o controle de mastite. Na fisiologia do úbere, o esfíncter do teto relaxa para a extração do leite devido à descarga de ocitocina liberada quando o animal é estimulado e permanece relaxado em torno de 30 minutos após (SCHALM et al, 1971). A rapidez do efeito antibacteriano da solução empregada é essencial, pois o tempo de contato do desinfetante com o microrganismo no ambiente do teto é curto. O efeito comparável frente às bactérias Gram positivas, *S. aureus* e *S. agalactiae*, de algumas das soluções desinfetantes utilizadas quando comparadas ao produto comercial dá suporte a indicação etnográfica de uso como desinfetantes/anti-séptico.

Relatos da literatura para clorexidina têm sido contraditórios. Laroque et al. (1992) relata boa eficácia do acetato de clorexidina já aos 30 segundos de contato frente a *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*. Murdough & Pankey (1993) encontraram que 67% de 15 formulações comerciais desse desinfetante foram efetivas contra *S. agalactiae*, 9 destas foram efetivas frente a *S. aureus* e somente 17% dessas últimas foram efetivas contra *E. coli*. Nossos resultados cumprem com a expectativa expressa pelo fabricante do produto que indica que o efeito eficaz é obtido a partir de cinco minutos

Nas condições deste trabalho, todas as soluções desinfetantes, inclusive o controle, apresentaram-se sensíveis à presença de matéria orgânica a 20%. Outros autores descrevem boa atividade da clorexidina na presença de baixas concentrações de matéria orgânica (albumina sérica de bovino a 0,5%) (SASSONE et al., 2003). Sendo o leite integral a principal matéria orgânica que pode contaminar a solução desinfetante na situação-problema mastite bovina, parece importante que desinfetantes indicados para esses casos sejam avaliados na presença de leite integral.

CONCLUSÃO

No modelo experimental utilizado, obtivemos extratos naturais (EHA *Eucalyptus spp.*, EHA *T. minuta* e EHA *B. trimera*) que apresentaram atividade antibacteriana frente a microrganismos Gram Positivos, os dois primeiros estatisticamente semelhante ao controle comercial clorexidina à 0,18% ($p > 0,05$). Estes resultados habilitam estas soluções desinfetantes a testes clínicos de uso na rotina de ordenha de gado de leite.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, a COOPAVA pela coleta das plantas, a FIOCUZ pelo envio das amostras bacterianas padrões e a Chemitec pela disponibilização da clorexidina.

BIBLIOGRAFIA

AKABWAY, D.; LEYLAND, T.; STEM, C. Provision of sustainable animal health delivery systems, which incorporate traditional livestock knowledge, to marginalized pastoralist areas. In: Ethnoveterinary Medicine: alternatives for livestock development. In: International Conference held in Pune, India, v. 1, parte 4: Application of

ethnoveterinary medicine. 1997. Pune, India. Anais. Disponível em: <http://www.ethnovetweb.com>. Acesso em 07/01/2007.

BODDIE, R.L.; NICKERSON, S.C.; ADKINSON, R.W. Efficacies of teat germicides containing 0,5% chlorhexidine and 1% iodine during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. **J. Dairy sci.**, v. 80, p. 2808-2814. 1997.

CAPORAL, F.R. & COSTABEBER, J.A.. Construindo uma nova extensão rural no Rio Grande do Sul. **Agroecol. e Desenv. Rural Sustent.**, Porto Alegre, v. 3, n.4, p. 10-15. 2002.

DEGRAVES, F.J.; FETROW, J. Economics of mastitis and mastitis control. **Vet. Clin. North Amer.: Food Anim. Pract.**, v. 9, p. 421-434. 1993.

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

EKMAN, T. Tratamiento y control de la mastitis en los países nórdicos. Proceedings X Congresso Latinoamericano de Buiatria, Montevideo, Uruguay. 2002. p. 26-29.

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

GIL, R.; HOWARD, W.H.; LESLIE, K.E.; LISSEMORE, K. Economics of mastitis control. **J. Dairy Sci.**, v. 73, p. 3340-3348. 1990.

LARANJA, L.F. & MACHADO, P.F. Avaliação da efetividade de um programa de controle de mastite bovina em fazenda produtoras de leite B do Estado de São Paulo. **Sci. Agric.**, Piracicaba, v. 51, p. 569-577. 1994.

LAROCQUE, L.; MALIK, S.S.; LANDRY, D.A.; PRESSEAULT, S.; SVED, S.; MATULA, T. In vitro germicidal activity of teat dips against *Nocardia asteroides* and other udder pathogens. **J. Dairy Sci.**, v. 75, p. 1233-1240. 1992.

LEBEL, J. Health: an ecosystem approach. IDRC, Ottawa, Canadá. 2003. 85 p.

MARKUS, R. Elementos de estatística aplicada. Fac. Agronomia UFRGS, Porto Alegre. 1973. 330 p.

MURDOUGH, P.A. & PANKEY, J.W. Evaluation of 57 teat sanitizers using excised cow teats. **J. Dairy Sci.**, v. 76, p. 2033-2038. 1993.

OURA, L.Y.; FOX, L.K.; WARF, C.C.; KEMP, G.K. Efficacy fo two acidific chlorrite postmilking teat disinfectants with sodium dodecylbenzene sulfonic acido n prevention of contagious mastitis using as experimental challenge protocol. **J. Dairy Sci.**, v. 85, p. 252-257. 2002.

PEDRINI, S.C.B. & MARGATHO, L.F.F.. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arq. Inst. Biol.**, v.70, n.4, p.391-395, 2003.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Ed. Wolfe, Londres, 1998. 648p.

SASSONE, L.M.; FIDEL, R.; FIDEL, S.; VIEIRA, M. HIRATA Jr, R. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine in vitro. **Int. Endodont. J.**, v. 36, p. 848-852. 2003.

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

SEVILLA-GUZMAN, E. Uma estratégia de sustentabilidade a partir da agroecologia. **Agroecol. e Desenv. Rural Sustent.**, v. 2, p. 35-45. 2001.

WANZALA, W.; ZESSIN, K.W.; KYULE, N.M.; BAUMANN, M.P.O.; MATHIAS, E.; HASSANALI, A. Ethnoveterinary medicine: a critical review of its evolution, perception, understanding and the way forward. **Livest. Res. for Rural Developm.**, v. 17, p. . 2005.

WELLENBERG, G.J.; VAN DER POEL, W.H.M.; VAN OIRSHOT, J.T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Vet. Microbiol.**, v. 88, p. 27-45. 2002.

APÊNDICE D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO: “Plantas Medicinais em Atenção Básica Veterinária: Atividade Antimicrobiana frente a Bactérias Relacionadas com Mastite Bovina e a Dermatofitos”.

OBJETIVO: Neste trabalho objetiva-se à luz da Atenção Primária em Saúde e da Agroecologia, encontrar alternativas sustentáveis entre os recursos naturais renováveis, mais especificamente, com plantas com indicativo etnográfico medicinal, para o controle de mastite infecciosa bovina e dermatofitose. Este objetivo deve ser alcançado a partir da prática de agricultores familiares na aplicação de extratos de plantas, no sentido de alcançar base científica “in vitro” a ação anti-séptica/desinfetante dessas plantas na condição droga crua, frente a microrganismos relacionado a situação-problema, utilizando teste de diluição em tubos múltiplos. Também, busca-se averiguar fatores que interferem na ação anti-séptica/desinfetante dessas plantas como: forma de extração, concentração, tempo de contato e efeito matéria orgânica. Por último, através do cálculo de concentração inibitória mínima (CIM) pretende-se avaliar a atividade antifúngica dessas mesmas plantas a microrganismos causadores de dermatofitoses em humanos e animais.

PROCEDIMENTO: O estudo será realizado através da avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos das plantas medicinais através da micro-técnica utilizando microrganismos isolados de casos clínicos e cepas de referência.

Os dados etno-botânico no qual ele está embasado são os resultados do projeto de pesquisa intitulado “Implantação de novas tecnologias para a produção de leite ecológico” realizado em parceria entre a UFPel e a COOPAVA.

Os direitos da comunidade com relação ao conhecimento tradicional recolhido ficam salvaguardados nos termos da Medida Provisória nº 2186-16, de 23 de agosto de 2001 (cópia em anexo).

É garantida a liberdade de consentimento, a qualquer momento de se retirar do estudo.

Os resultados obtidos na pesquisa, as informações geradas e os dados coletados serão divulgados em periódicos especializados, sem nenhuma restrição, assim que seja concluída a pesquisa. O direito a confidencialidade pode ser exercido pelo participante. O participante tem ainda o direito de acesso e informação todos os resultados da pesquisa.

Eu, _____ (pessoa física ou representante de pessoa jurídica), após ter lido e todas as dúvidas esclarecidas, concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou ainda perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura: _____

Identificação: _____

Piratini, 20 de janeiro de 2007.

Pesquisador: Luiz Filipe Damé Schuch

Faculdade de Veterinária

UFPeI

Campus Universitário s/n

Capão do Leão

CEP: 9608060

Fone contato: 32757312

APÊNDICE E: ANÁLISE ESTATÍSTICA

Comparação da ação antimicrobiana entre extratos de plantas quanto a IINIB e IINAB

Statistix 8.0
19:17:25

2/1/2007,

**Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for IINIB by
SOLUÇÃO DESINFETANTE**

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	4.632E+08	5.146E+07	113	0.0026
Within	2990	1.358E+09	454037		
Total	2999	1.821E+09			

Total number of values that were tied 3000
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 3000 Missing Cases 0

**Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by
Solução desinfetante**

Soluções desinfetantes Mean Homogeneous Groups

52 - EHA Eucalyptus	2109.0	A
22 - EHA B. trimera	1852.7	B
42 - EHA T. minuta	1849.9	B
41 - DEC T. minuta	1778.8	B
32 - EHA B. pilosa	1625.0	BC
21 - DEC B. trimera	1464.9	CD
31 - DEC B. pilosa	1363.5	D
12 - EHA P. hydripiper	1102.6	E
11 - DEC P. hydropiper	971.23	E
51 - DEC Eucalyptus	887.27	E

Alpha 0.05
Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 230.61
There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

**Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for IINAB by
Solução desinfetante**

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	2.257E+08	2.508E+07	75.5	0.0019
Within	2990	9.927E+08	331991		
Total	2999	1.218E+09			

Total number of values that were tied 3000
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 3000 Missing Cases 0

**Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by
Solução desinfetante**

Solução desinfetante	Mean	Homogeneous Groups
52 - EHA Eucalyptus	1941.4	A
22 - EHA B. trimera	1881.5	A
41 - DEC T. minuta	1729.0	AB
31 - DEC B. pilosa	1562.9	BC
32 - EHA B. pilosa	1560.7	BC
21 - DEC B. trimera	1436.7	C
42 - EHA T. minuta	1398.8	CD
12 - EHA P. hydropiper	1180.8	DE
51 - DEC Eucalyptus	1158.7	E
11 - DEC P. hydropiper	1154.5	E

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 230.61
 There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

Statistix 8.0
 19:18:48

2/1/2007,

**Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for IINIB by
CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO**

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	5	7.053E+08	1.411E+08	379	0.0047
Within	2994	1.115E+09	372562		
Total	2999	1.821E+09			

Total number of values that were tied 3000
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 3000 Missing Cases 0

**Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by
Concentração de extrato (g/L)**

V004	Mean	Homogeneous Groups
50	2169.1	A
30	1944.1	B
20	1737.7	C
10	1311.4	D
5	950.02	E
4	890.78	E

Alpha 0.05
 Critical Z Value 2.935 Critical Value for Comparison 160.79
 There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

**Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for IINAB by
Concentração de extrato**

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	5	4.093E+08	8.185E+07	303	0.0042
Within	2994	8.091E+08	270243		
Total	2999	1.218E+09			

Total number of values that were tied 3000

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 3000 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by Concentração de extrato (g/L)**V004 Mean Homogeneous Groups**

50	2092.7	A
30	1878.9	B
20	1515.3	C
10	1192.9	D
5	1168.7	D
4	1154.5	D

Alpha 0.05

Critical Z Value 2.935 Critical Value for Comparison 160.79

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Statistix 8.0
19:19:38

2/1/2007,

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for IINIB by GRUPO BACTERIANO**Parametric AOV Applied to Ranks**

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	3.904E+07	1.301E+07	21.9	0.0000
Within	2996	1.782E+09	594695		
Total	2999	1.821E+09			

Total number of values that were tied 3000

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 3000 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by Grupo bacteriano**V006 Mean Homogeneous Groups**

Strepto spp	(3)	1542.5	A
Staphylo coag -	(2)	1535.3	A
Staphylo coag +	(1)	1497.2	A
P. aeruginosa	(4)	950.35	B

Alpha 0.05

Critical Z Value 2.638

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for IINAB by grupo bacteriano

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	1.659E+07	5529177	13.8	0.0000
Within	2996	1.202E+09	401130		
Total	2999	1.218E+09			

Total number of values that were tied 3000

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 3000 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by grupo bacteriano

V006 Mean Homogeneous Groups

Strepto spp	(3)	1548.1	A
Staphylo coag -	(2)	1529.8	A
Staphylo coag +	(1)	1471.7	A
P. aeruginosa	(4)	1174.0	B

Alpha 0.05

Critical Z Value 2.638

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Statistix 8.0
15:39:43

tabela 50, 28/12/2006,

GRUPO BACTERIANO 1 CONCENTRAÇÃO 50g/L

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for IINIB by Solução desinfetante

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	269921	29991.3	68.4	0.0000
Within	170	74591	438.8		
Total	179	344513			

Total number of values that were tied 180

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 180 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by solução desinfetante

desinfetant Mean Homogeneous Groups

22	121.00	A
41	121.00	A
42	121.00	A
52	121.00	A
32	113.50	AB
31	104.78	AB
21	97.278	AB

12	63.056	BC
11	29.444	C
51	12.944	C

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 56.635
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

**Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for IINAB by solução
 desinfetante**

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	366798	40755.4	106	0.0000
Within	170	65305	384.1		
Total	179	432103			

Total number of values that were tied 180
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 180 Missing Cases 0

**Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by solução
 desinfetante**

desinfetante Mean Homogeneous Groups

22	147.00	A
52	147.00	A
41	142.67	A
32	115.06	AB
31	108.94	AB
21	84.167	BC
42	47.889	C
12	41.278	C
11	35.500	C
51	35.500	C

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 56.635
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

GRUPO BACTERIANO 2 CONCENTRAÇÃO 50g/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	114992	12776.9	42.0	0.0000
Within	130	39572	304.4		
Total	139	154564			

Total number of values that were tied 140
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 140 Missing Cases 0

**Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by solução
 desinfetante**

desinfetan	Mean	Homogeneous Groups
22	92.500	A
41	92.500	A
42	92.500	A
52	92.500	A
21	84.929	A
32	83.786	A
31	77.357	A
12	53.071	AB
11	20.643	B
51	15.214	B

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 49.987
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	170769	18974.3	89.3	0.0000
Within	130	27614	212.4		
Total	139	198382			

Total number of values that were tied 140
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 140 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by solução desinfetante

desinfetan	Mean	Homogeneous Groups
22	109.00	A
41	109.00	A
52	109.00	A
31	96.643	A
32	84.286	AB
21	78.786	ABC
12	36.286	BCD
42	33.000	CD
11	24.500	D
51	24.500	D

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 49.987
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

GRUPO BACTERIANO 3 CONCENTRAÇÃO 50G/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	163315	18146.1	44.4	0.0000
Within	150	61254	408.4		
Total	159	224569			

Total number of values that were tied 159
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 160 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by solução desinfetante

desinfetante	Mean	Homogeneous Groups
22	105.00	A
32	105.00	A
41	105.00	A
42	105.00	A
52	105.00	A
12	86.438	A
21	82.500	A
31	68.063	AB
51	26.500	B
11	16.500	B

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 53.414
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	211199	23466.5	80.4	0.0000
Within	150	43801	292.0		
Total	159	255000			

Total number of values that were tied 158
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 160 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by solução desinfetante

desinfetante	Mean	Homogeneous Groups
22	113.50	A
32	113.50	A
41	113.50	A
42	113.50	A
52	113.50	A
21	82.188	AB
31	63.375	AB
51	31.938	B
11	30.000	B
12	30.000	B

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 53.414
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

GRUPO BACTERIANO 4 CONCENTRAÇÃO 50G/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	180.000	20.0000	400	0.0000
Within	10	0.500	0.0500		
Total	19	180.500			

Total number of values that were tied 18

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 20 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by solução desinfetante

desinfetant	Mean	Homogeneous Groups
41	19.500	A
11	9.5000	A
12	9.5000	A
21	9.5000	A
22	9.5000	A
31	9.5000	A
32	9.5000	A
42	9.5000	A
51	9.5000	A
52	9.5000	A

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 19.291

There are no significant pairwise differences among the means.

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	507.000	56.3333	125	0.0000
Within	10	4.500	0.4500		
Total	19	511.500			

Total number of values that were tied 19

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 20 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by solução desinfetante

desinfetant	Mean	Homogeneous Groups
41	18.000	A
52	18.000	A
22	16.500	A
42	13.500	A
11	6.5000	A
12	6.5000	A
21	6.5000	A
31	6.5000	A
32	6.5000	A
51	6.5000	A

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 19.291

There are no significant pairwise differences among the means.

GRUPO BACTERIANO 1 CONCENTRAÇÃO 30g /L**Parametric AOV Applied to Ranks**

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	331756	36861.8	67.1	0.0000
Within	170	93354	549.1		
Total	179	425111			

Total number of values that were tied 179

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 180 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by solução desinfetante**desinfeta Mean Homogeneous Groups**

41	137.00	A
52	137.00	A
42	130.61	AB
22	129.42	AB
32	103.47	AB
21	92.778	ABC
31	78.722	BCD
12	46.833	CDE
11	30.667	DE
51	18.500	E

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 56.635

There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	324148	36016.5	83.4	0.0000
Within	170	73401	431.8		
Total	179	397549			

Total number of values that were tied 180

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 180 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by solução desinfetante**desinfeta Mean Homogeneous Groups**

52	148.58	A
41	147.81	A
22	146.11	A
31	123.06	AB
32	68.583	BC
21	62.694	C
42	56.667	C
11	50.500	C
12	50.500	C
51	50.500	C

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 56.635
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

GRUPO BACTERIANO 2 CONCENTRAÇÃO 30g/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	143314	15923.7	38.9	0.0000
Within	130	53235	409.5		
Total	139	196549			

Total number of values that were tied 140
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 140 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by solução desinfetante

desinfeta Mean Homogeneous Groups

22	105.00	A
41	105.00	A
52	105.00	A
42	98.429	A
32	77.571	AB
21	68.071	AB
31	63.214	ABC
12	38.643	BC
11	27.714	BC
51	16.357	C

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 49.987
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	165704	18411.5	83.0	0.0000
Within	130	28841	221.9		
Total	139	194545			

Total number of values that were tied 138
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 140 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by solução desinfetante

desinfeta Mean Homogeneous Groups

22	120.50	A
52	120.50	A
41	102.64	AB
31	97.357	AB
21	61.714	BC
32	60.286	BC
11	35.500	C
12	35.500	C

42 35.500 C
51 35.500 C

Alpha 0.05
Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 49.987
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

GRUPO BACTERIANO 3 CONCENTRAÇÃO 30g/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	230813	25645.8	121	0.0000
Within	150	31765	211.8		
Total	159	262578			

Total number of values that were tied 160
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 160 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by solução desinfetante

desinfeta Mean Homogeneous Groups

22	115.50	A
32	115.50	A
41	115.50	A
42	115.50	A
52	115.50	A
21	83.625	AB
31	52.375	B
11	30.500	B
12	30.500	B
51	30.500	B

Alpha 0.05
Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 53.414
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	233683	25964.8	73.8	0.0000
Within	150	52775	351.8		
Total	159	286458			

Total number of values that were tied 158
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 160 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by solução desinfetante

desinfeta Mean Homogeneous Groups

52	125.50	A
22	123.03	A
32	123.03	A
41	113.16	AB
42	100.28	ABC

21	67.375	BCD
31	49.125	CD
11	34.500	D
12	34.500	D
51	34.500	D

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 53.414
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

GRUPO BACTERIANO 1 CONCENTRAÇÃO 20g/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	434.250	48.2500	214	0.0000
Within	10	2.250	0.2250		
Total	19	436.500			

Total number of values that were tied 18
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 20 Missing Cases 0
**Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by solução
 desinfetante**

desinfeta Mean Homogeneous Groups

22	157.33	A
52	138.78	A
41	106.06	AB
31	79.833	B
11	70.500	B
12	70.500	B
21	70.500	B
32	70.500	B
42	70.500	B
51	70.500	B

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 56.635
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	372232	41359.1	87.0	0.0000
Within	170	80838	475.5		
Total	179	453071			

Total number of values that were tied 180
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 180 Missing Cases 0

**Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by solução
 desinfetante**

desinfeta Mean Homogeneous Groups

41	148.94	A
----	--------	---

52	143.36	A
22	141.44	A
42	118.44	AB
21	99.611	AB
32	84.306	BC
31	77.389	BC
11	30.500	C
12	30.500	C
51	30.500	C

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 56.635
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

GRUPO BACTERIANO 2 CONCENTRAÇÃO 20g/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	121930	13547.8	149	0.0000
Within	130	11837	91.1		
Total	139	133767			

Total number of values that were tied 139
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 140 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by solução desinfetante

desinfeta Mean Homogeneous Groups

22	126.61	A
52	126.07	A
31	84.821	AB
11	52.500	B
12	52.500	B
21	52.500	B
32	52.500	B
41	52.500	B
42	52.500	B
51	52.500	B

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 49.987
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	170810	18978.8	59.6	0.0000
Within	130	41399	318.5		
Total	139	212209			

Total number of values that were tied 140
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 140 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by solução

desinfetante

desinfeta	Mean	Homogeneous Groups
22	116.50	A
52	116.50	A
41	111.79	AB
42	86.857	ABC
21	72.143	ABCD
32	63.857	BCDE
31	56.857	CDE
11	31.286	DE
12	27.214	DE
51	22.000	E

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 49.987
 There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

GRUPO BACTERIANO 3 CONCENTRAÇÃO 20g/L**Parametric AOV Applied to Ranks**

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	115830	12869.9	16.9	0.0000
Within	150	113999	760.0		
Total	159	229829			

Total number of values that were tied 158
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 160 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by solução desinfetante

desinfeta	Mean	Homogeneous Groups
22	122.00	A
42	117.88	A
52	109.22	A
41	92.281	AB
32	86.125	AB
11	55.500	B
12	55.500	B
21	55.500	B
31	55.500	B
51	55.500	B

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 53.414
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	227545	25282.7	99.3	0.0000
Within	150	38191	254.6		
Total	159	265735			

Total number of values that were tied 159
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 160 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by solução desinfetante

desinfeta	Mean	Homogeneous Groups
22	118.50	A
42	118.50	A
52	118.50	A
32	113.13	A
41	107.00	A
21	87.000	AB
31	38.875	B
11	34.500	B
12	34.500	B
51	34.500	B

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 53.414

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

GRUPO BACTERIANO 1 CONCENTRAÇÃO 10g/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	3645.0	405.000	3.40	0.0007
Within	170	20251.5	119.126		
Total	179	23896.5			

Total number of values that were tied 179

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 180 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of INAB by solução desinfetante

desinfeta	Mean	Homogeneous Groups
52	104.00	A
11	89.000	A
12	89.000	A
21	89.000	A
22	89.000	A
31	89.000	A
32	89.000	A
41	89.000	A
42	89.000	A
51	89.000	A

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 56.635

There are no significant pairwise differences among the means.

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	158931	17659.0	16.2	0.0000
Within	170	185853	1093.3		
Total	179	344783			

Total number of values that were tied 180

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 180 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of INIB by solução desinfetante

desinfeta	Mean	Homogeneous Groups
52	139.22	A
22	132.31	A
41	121.50	AB
42	97.889	ABC
31	94.778	ABC
32	72.306	BC
21	67.000	BC
11	60.000	C
12	60.000	C
51	60.000	C

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 56.635

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Kruskal-Wallis Statistic 75.7690

P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0000

GRUPO BACTERIANO 2 CONCENTRAÇÃO 10g/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	20160.0	2240.00	17.3	0.0000
Within	130	16824.0	129.42		
Total	139	36984.0			

Total number of values that were tied 140

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 140 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of INAB by solução desinfetante

desinfeta	Mean	Homogeneous Groups
52	106.50	A
11	66.500	A
12	66.500	A
21	66.500	A
22	66.500	A
31	66.500	A
32	66.500	A
41	66.500	A
42	66.500	A
51	66.500	A

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 49.987

There are no significant pairwise differences among the means.

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	119155	13239.4	29.7	0.0000

Within 130 57875 445.2
 Total 139 177030

Total number of values that were tied 140
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 140 Missing Cases 0

Statistix 8.0
 17:30:03

tabela 10, 28/12/2006,

GRUPO BACTERIANO 3 CONCENTRAÇÃO 20g/L

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of INAB by solução desinfetante

desinfeta	Mean	Homogeneous Groups
52	89.500	A
11	79.500	A
12	79.500	A
21	79.500	A
22	79.500	A
31	79.500	A
32	79.500	A
41	79.500	A
42	79.500	A
51	79.500	A

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 53.414

There are no significant pairwise differences among the means.

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	251409	27934.4	130	0.0000
Within	150	32126	214.2		
Total	159	283536			

Total number of values that were tied 160
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 160 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by solução desinfetante

desinfeta	Mean	Homogeneous Groups
52	141.50	A
42	126.13	AB
22	123.22	AB
32	115.72	AB
41	80.938	BC
11	43.500	C
12	43.500	C
21	43.500	C
31	43.500	C
51	43.500	C

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 53.414
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

GRUPO BACTERIANO 1 CONCENTRAÇÃO 5g/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	1620.0	180.000	2.12	0.0299
Within	170	14400.0	84.706		
Total	179	16020.0			

Total number of values that were tied 180
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 180 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by solução desinfetante

desinfeta Mean Homogeneous Groups

52	99.500	A
11	89.500	A
12	89.500	A
21	89.500	A
22	89.500	A
31	89.500	A
32	89.500	A
41	89.500	A
42	89.500	A
51	89.500	A

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 56.635
 There are no significant pairwise differences among the means.

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	25920.0	2880.00	13.6	0.0000
Within	170	36032.0	211.95		
Total	179	61952.0			

Total number of values that were tied 180
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 180 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINAB by solução desinfetante

desinfeta Mean Homogeneous Groups

52	88.500	A
11	68.500	A
12	68.500	A
21	68.500	A
22	68.500	A
31	68.500	A
32	68.500	A
41	68.500	A
42	68.500	A
51	68.500	A

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 49.987
 There are no significant pairwise differences among the means.

GRUPO BACTERIANO 2 CONCENTRAÇÃO 5g/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	20160.0	2240.00	17.3	0.0000
Within	130	16824.0	129.42		
Total	139	36984.0			

Total number of values that were tied 140
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 140 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by solução desinfetante

desinfeta	Mean	Homogeneous Groups
52	106.50	A
11	66.500	A
12	66.500	A
21	66.500	A
22	66.500	A
31	66.500	A
32	66.500	A
41	66.500	A
42	66.500	A
51	66.500	A

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 49.987
 There are no significant pairwise differences among the means.

GRUPO BACTERIANO 3 CONCENTRAÇÃO 5g/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	70202	7800.21	17.8	0.0000
Within	150	65612	437.41		
Total	159	135814			

Total number of values that were tied 159
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 160 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of IINIB by solução desinfetante

desinfeta	Mean	Homogeneous Groups
42	124.59	A
52	118.94	AB
32	76.906	AB
41	76.563	AB
11	68.000	B
12	68.000	B

21	68.000	B
22	68.000	B
31	68.000	B
51	68.000	B

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 53.414
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

GRUPO BACTERIANO 1 CONCENTRAÇÃO 4g/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	14580.0	1620.00	8.50	0.0000
Within	170	32412.0	190.66		
Total	179	46992.0			

Total number of values that were tied 180
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 180 Missing Cases 0

Grupo bacteriano 4 Concentração 50%

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of iinib by solução desinfetante

desinfeta Mean Homogeneous Groups

52	117.50	A
11	87.500	A
12	87.500	A
21	87.500	A
22	87.500	A
31	87.500	A
32	87.500	A
41	87.500	A
42	87.500	A
51	87.500	A

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 56.635
 There are no significant pairwise differences among the means.

GRUPO BACTERIANO 2 CONCENTRAÇÃO 4g/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	11340.0	1260.00	9.75	0.0000
Within	130	16800.0	129.23		
Total	139	28140.0			

Total number of values that were tied 140
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 140 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of iinib by solução desinfetante

desinfeta Mean Homogeneous Groups

52	97.500	A
11	67.500	A
12	67.500	A
21	67.500	A
22	67.500	A
31	67.500	A
32	67.500	A
41	67.500	A
42	67.500	A
51	67.500	A

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 49.987
 There are no significant pairwise differences among the means.

GRUPO BACTERIANO 3 CONCENTRAÇÃO 4g/L

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	26912.0	2990.22	10.1	0.0000
Within	150	44265.0	295.10		
Total	159	71177.0			

Total number of values that were tied 156
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 160 Missing Cases 0
 Grupo bacteriano 4 Concentração 30%

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of iinib by solução desinfetante

desinfeta Mean Homogeneous Groups

42	115.50	A
52	93.500	A
11	74.500	A
12	74.500	A
21	74.500	A
22	74.500	A
31	74.500	A
32	74.500	A
41	74.500	A
51	74.500	A

Alpha 0.05
 Critical Z Value 3.261 Critical Value for Comparison 53.414
 There are no significant pairwise differences among the means.

Statistix 8.0
 10:13:30

15/1/2007,

Wilcoxon Rank Sum Test for IINAB by extrato P. hydropiper

extrato	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	89250	300	44100	297.5
2	91050	300	45900	303.5
Total	180300	600		

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 2.458

Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.0140

Total number of values that were tied 600
Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 600 Missing Cases 0

Wilcoxon Rank Sum Test for IINIB by extrato

extrato	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	86886	300	41736	289.6
2	93414	300	48264	311.4
Total	180300	600		

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 2.331
Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.0198

Total number of values that were tied 600
Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 600 Missing Cases 0

Statistix 8.0
10:14:26

15/1/2007,

Wilcoxon Rank Sum Test for IINAB by extrato

B. trimera

extrato	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	76225	300	31075	254.1
2	104075	300	58925	346.9
Total	180300	600		

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 7.887
Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.0000

Total number of values that were tied 600
Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 600 Missing Cases 0

Wilcoxon Rank Sum Test for IINIB by extrato

extrato	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	77839	300	32689	259.5
2	102461	300	57311	341.5
Total	180300	600		

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 6.267
Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.0000

Total number of values that were tied 599
Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 600 Missing Cases 0

Statistix 8.0

15/1/2007,

10:15:24

Wilcoxon Rank Sum Test for IINAB by extrato**B. pilosa**

extrato	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	90086	300	44936	300.3
2	90215	300	45065	300.7
Total	180300	600		

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 0.038
 Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.9697

Total number of values that were tied 599
 Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 600 Missing Cases 0

Wilcoxon Rank Sum Test for IINIB by extrato

extrato	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	81802	300	36652	272.7
2	98498	300	53348	328.3
Total	180300	600		

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 4.271
 Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.0000

Total number of values that were tied 600
 Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 600 Missing Cases 0

Statistix 8.0
 10:16:13

15/1/2007,

Wilcoxon Rank Sum Test for IINAB by extrato**T. minuta**

extrato	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	99893	300	54743	333.0
2	80408	300	35258	268.0
Total	180300	600		

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 5.898
 Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.0000

Total number of values that were tied 600
 Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 600 Missing Cases 0

Wilcoxon Rank Sum Test for IINIB by extrato

extrato	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	88233	300	43083	294.1

2	92067	300	46917	306.9
Total	180300	600		

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 0.980
Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.3270

Total number of values that were tied 600
Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 600 Missing Cases 0

Statistix 8.0
10:17:02

15/1/2007,

**Wilcoxon Rank Sum Test for IINAB by extrato
Eucalyptus**

extrato	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	67290	300	22140	224.3
2	113011	300	67861	376.7
Total	180300	600		

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 14.118
Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.0000

Total number of values that were tied 598
Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 600 Missing Cases 0

Wilcoxon Rank Sum Test for IINIB by extrato

extrato	Rank Sum	N	U Stat	Mean Rank
1	56124	300	10974	187.1
2	124176	300	79026	413.9
Total	180300	600		

Normal Approximation with Corrections for Continuity and Ties 18.317
Two-tailed P-value for Normal Approximation 0.0000

Total number of values that were tied 600
Maximum difference allowed between ties 0.00001

Cases Included 600 Missing Cases 0

Statistix 8.0
11:21:09

3/1/2007,

**Spearman Rank Correlations,
Corrected for IINIB (007) e IINAB (008)**

	V007
V008	0.6978

Maximum Difference Allowed Between Ties 0.00001

Cases Included 3000 Missing Cases 0

ANÁLISE ESTATÍSTICA – ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Statistix 8.0
06:30:54

7/8/2006,

FUNGOS

One-Way AOV for: V001 V002 V003 V004 V005 V006 V007 V008 V009 V010

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	8.13809	0.90423	61.7	0.0000
Within	50	0.73242	0.01465		
Total	59	8.87051			

Grand Mean 0.5906 CV 20.49

At least one group variance is near zero,
variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 0.14826
Effective cell size 6.0

Variable	Mean	
EHA P. hydropiper (v001)	0.3333	
DEC P. hydropiper (v002)	0.9167	
EHA T. minuta (v003)	0.1146	
DEC T. minuta (v004)	1.0000	
EHA B. trimera (v005)	0.2917	
DEC B. trimera (v006)	0.8333	
EHA Eucalyptus (v007)	0.2917	
DEC Eucalyptus (v008)	1.0000	
EHA B. pilosa (v009)	0.1250	
DEC B. pilosa (v010)	1.0000	
Observations per Mean	6	
Standard Error of a Mean	0.0494	
Std Error (Diff of 2 Means)	0.0699	

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
V004	1.0000	A
V008	1.0000	A
V010	1.0000	A
V002	0.9167	A
V006	0.8333	A
V001	0.3333	B
V005	0.2917	B
V007	0.2917	B
V009	0.1250	B
V003	0.1146	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0699
Critical Q Value 4.681 Critical Value for Comparison 0.2313
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

Análise estatística – Cinética
Delineamento Fatorial

Statistix 8.0
09:46:27

4/1/2007,

**Analysis of Variance Table for indice
Staphylococcus aureus**

Source	DF	SS	MS	F	P
TEMPO	3	3.2153	1.07178	20.45	0.0000
desinfeta	6	9.9185	1.65308	31.54	0.0000
mat	1	3.9038	3.90382	74.48	0.0000
TEMPO*desinfeta	18	1.2621	0.07012	1.34	0.1905
TEMPO*mat	3	0.1236	0.04119	0.79	0.5056
desinfeta*mat	6	1.0499	0.17498	3.34	0.0058
Error	74	3.8787	0.05242		
Total	111	23.3519			

Grand Mean 0.5458 CV 41.95

Statistix 8.0
09:46:38

4/1/2007,

**Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of indice
Control: desinfeta=clorexidina (1)**

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

		Lower		Upper	
desinfeta		Mean	Bound	Difference	Bound
Clorexidina	(1)	0.7244			
EHA Eucalyptus	(2)	0.7919	-0.1452	0.0675	0.2802
EHA T. minuta	(3)	0.8363	-0.1008	0.1119	0.3245
DEC Eucalyptus	(4)	0.3419	-0.5952	-0.3825*	-0.1698
DEC T. minuta	(5)	0.0138	-0.9233	-0.7106*	-0.4980
DEC B. trimera	(6)	0.3131	-0.6239	-0.4113*	-0.1986
EHA B. trimera	(7)	0.7994	-0.1377	0.0750	0.2877

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0809
Critical D Value 2.627 Critical Value for Comparison 0.2127
Error term used: Error, 74 DF

Statistix 8.0
09:46:52

4/1/2007,

**LSD All-Pairwise Comparisons Test of indice for
TEMPO**

TEMPO(s)	Mean	Homogeneous Groups
600	0.7214	A
1800	0.6857	A
120	0.4736	B
30	0.3025	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0612

Critical T Value 1.993 Critical Value for Comparison 0.1219
 Error term used: Error, 74 DF
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

**LSD All-Pairwise Comparisons Test of indice for
 MATERIAL ORGÂNICA**

mat Mean Homogeneous Groups

sem(1) 0.7325 A
 com(2) 0.3591 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0433
 Critical T Value 1.993 Critical Value for Comparison 0.0862
 Error term used: Error, 74 DF
 All 2 means are significantly different from one another.

Statistix 8.0
 09:47:39

4/1/2007,

**Analysis of Variance Table for indice
 Streptococcus agalactiae**

Source	DF	SS	MS	F	P
TEMPO	3	1.5064	0.50212	20.10	0.0000
desinfeta	6	2.3816	0.39693	15.89	0.0000
mat	1	2.4752	2.47520	99.10	0.0000
TEMPO*desinfeta	18	1.2036	0.06686	2.68	0.0016
TEMPO*mat	3	1.1027	0.36758	14.72	0.0000
desinfeta*mat	6	1.8785	0.31308	12.54	0.0000
Error	74	1.8482	0.02498		
Total	111	12.3962			

Grand Mean 0.1747 CV 90.45

Statistix 8.0
 09:47:48

4/1/2007,

**Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of indice
 Control: desinfeta=1**

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

desinfeta	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
1	0.3731			
2	0.3163	-0.2037	-0.0569	0.0899
3	0.2950	-0.2249	-0.0781	0.0687
4	0.0306	-0.4893	-0.3425*	-0.1957
5	0.0100	-0.5099	-0.3631*	-0.2163
6	0.0106	-0.5093	-0.3625*	-0.2157
7	0.1875	-0.3324	-0.1856*	-0.0388

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0559
 Critical D Value 2.627 Critical Value for Comparison 0.1468
 Error term used: Error, 74 DF

Statistix 8.0
09:47:59

4/1/2007,

LSD All-Pairwise Comparisons Test of indice for TEMPO

TEMPO(s) Mean Homogeneous Groups

1800	0.3264	A
600	0.2364	B
120	0.1139	C
30	0.0221	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0422
 Critical T Value 1.993 Critical Value for Comparison 0.0842
 Error term used: Error, 74 DF
 All 4 means are significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of indice for MATERIAL ORGÂNICA

mat Mean Homogeneous Groups

1	0.3234	A
2	0.0261	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0299
 Critical T Value 1.993 Critical Value for Comparison 0.0595
 Error term used: Error, 74 DF
 All 2 means are significantly different from one another.

Statistix 8.0
09:48:42

4/1/2007,

Analysis of Variance Table for indice

Pseudomonas aeruginosa

Source	DF	SS	MS	F	P
TEMPO	3	0.7457	0.24856	14.47	0.0000
desinfeta	6	3.4877	0.58128	33.85	0.0000
mat	1	2.4485	2.44851	142.57	0.0000
TEMPO*desinfeta	18	1.2687	0.07048	4.10	0.0000
TEMPO*mat	3	0.7340	0.24465	14.25	0.0000
desinfeta*mat	6	3.0246	0.50410	29.35	0.0000
Error	74	1.2709	0.01717		
Total	111	12.9800			

Grand Mean 0.1752 CV 74.81

Statistix 8.0
09:48:59

4/1/2007,

Two-sided Dunnett's Multiple Comparisons with a Control of indice

Control: desinfeta=1

Simultaneous 95% confidence intervals of treatment mean - control mean

desinfeta	Mean	Lower Bound	Difference	Upper Bound
1	0.5138			
2	0.1912	-0.4442	-0.3225*	-0.2008
3	0.1456	-0.4899	-0.3681*	-0.2464
4	0.0106	-0.6249	-0.5031*	-0.3814
5	0.0281	-0.6074	-0.4856*	-0.3639
6	0.0050	-0.6305	-0.5088*	-0.3870
7	0.3319	-0.3036	-0.1819*	-0.0601

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0463
Critical D Value 2.627 Critical Value for Comparison 0.1217
Error term used: Error, 74 DF

Statistix 8.0
09:48:50

4/1/2007,

LSD All-Pairwise Comparisons Test of indice for TEMPO

TEMPO(s)	Mean	Homogeneous Groups
1800	0.3025	A
600	0.1896	B
120	0.1132	C
30	0.0954	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0350
Critical T Value 1.993 Critical Value for Comparison 0.0698
Error term used: Error, 74 DF
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

LSD All-Pairwise Comparisons Test of indice for MATERIAL ORGÂNICA

mat	Mean	Homogeneous Groups
1	0.3230	A
2	0.0273	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0248
Critical T Value 1.993 Critical Value for Comparison 0.0493
Error term used: Error, 74 DF
All 2 means are significantly different from one another.