



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - CEUB

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ANA PAULA SALES ROSA

ADRIANA PLA PUJADES

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA *IN VITRO* DA CEFALEXINA E DOS
FITOTERÁPICOS *CALENDULA OFFICINALIS*, *UNCARIA TOMENTOSA*,
ROSMARINUS OFFICINALIS E *ANACARDIUM OCCIDENTALE* NO TRATAMENTO
DE MASTITE EM BOVINOS**

BRASÍLIA

2023

ANA PAULA SALES ROSA

ADRIANA PLA PUJADES

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA *IN VITRO* DA CEFALEXINA E DOS
FITOTERÁPICOS *CALENDULA OFFICINALIS*, *UNCARIA TOMENTOSA*,
ROSMARINUS OFFICINALIS E *ANACARDIUM OCCIDENTALE* NO TRATAMENTO
DE MASTITE EM BOVINOS**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Francislete Rodrigues Melo

BRASÍLIA

2023

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao José Maria e à Eliza, que abriram as portas da Fazenda Cavalcante Alencar e nos auxiliaram durante todo o projeto, com ideias e informações relevantes. Ao Professor Emanuel Elzo Leal de Barros, que nos ajudou durante todo o processo de delineamento estatístico e, principalmente, por ser capaz de nos fazer entendê-lo, quando os números confundiam a nossa cabeça. Também, à nossa orientadora Francislete Rodrigues Melo, por aceitar fazer esse projeto com a gente.

RESUMO

A Mastite bovina tem alta prevalência em rebanhos leiteiros, e seu tratamento alopático, apesar de contar com eficácia quando efetivamente conduzido, culmina em resistência microbiana, assim como traz prejuízos financeiros, possíveis alterações celulares e da microbiota do teto, além de risco à saúde do animal. Quando usado em doses inadequadas, pode gerar intoxicação do animal, resistência ao medicamento, e, se não respeitado o período de carência, os resíduos do antibiótico podem ser ingeridos no leite, o que configura ameaça à saúde humana. Na tentativa de uma metodologia terapêutica alternativa, este projeto buscou avaliar a atividade *in vitro* de quatro fitoterápicos com potencial antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante: *Calendula Officinalis* (calêndula), *Anacardium occidentale* (cajuzinho-do-cerrado), *Uncaria Tomentosa* (unha de gato) e *Rosmarinus Officinalis* (alecrim), comparados com a ação de uma cefalosporina de primeira geração, cefalexina, cujo uso é amplo e indiscriminado em propriedades leiteiras. Os metabólitos secundários dessas plantas, como taninos, saponinas e flavonoides, são alguns dos compostos capazes de, individualmente ou em sinergia, promover efeitos medicinais, proporcionando uma alternativa associativa para diminuição do uso de alopáticos. O projeto foi separado em duas etapas, primeiramente avaliando a ação dos quatro fitoterápicos diante do alopático selecionado, obtendo-se resultados antimicrobianos relevantes quanto à *C. officinalis* e à *A. occidentale*. A segunda etapa, por sua vez, testou estas plantas separadamente e em associação, comparando os três extratos com a cefalexina. O resultado obtido apresentou efeito inibitório para a *A. occidentale*, quando comparado com o antibiótico, que apresentou um efeito atenuante, o que confirmou resistência bacteriana para esse alopático e o potencial antimicrobiano da planta.

Palavras-chave: Mastite bovina; Fitoterápicos; Medicina veterinária integrativa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	7
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
4. MÉTODO	9
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSSÃO	17
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
REFERÊNCIAS	20

1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina apresenta alta prevalência no Brasil, além de ser a doença que mais impacta a bovinocultura nacional, ao gerar perdas econômicas por questões como redução na produção leiteira, perda na qualidade do leite, descarte de leite com resíduos antimicrobianos, custos com tratamento e descarte de animais (EMBRAPA, 2012). Este impacto negativo apresenta importância social ao representar risco à saúde pública, em decorrência da presença de patógenos e de suas toxinas no leite a ser consumido, além de possíveis resquícios de antimicrobianos (COSTA, 1998 apud EMBRAPA, 2012).

A mastite consiste na inflamação das glândulas mamárias do úbere, podendo ocorrer pela interação direta da vaca com o patógeno, ou de seu contato com o homem e o ambiente, sendo que os microrganismos comumente acusados como causa da mastite são *Staphylococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativos e positivos, *E. coli*, *S. agalactiae*, *Streptococcus spp* (ACOSTA, 2016; EMBRAPA, 2012). Devido à variedade e complexidade dos possíveis patógenos causadores da condição, indica-se tratamento com antimicrobianos de amplo espectro, sistêmicos e/ou com ação local, com vistas a aumentar a eficácia (EMBRAPA, 2012). A dose utilizada no tratamento costuma ser inadequada, de forma que pode haver intoxicação da vaca e desenvolvimento de resistência microbiana, evidenciando duas problemáticas: uma, de bem-estar animal; a outra, de saúde pública (EMBRAPA, 2012; GANDA et al, 2016).

Nesse sentido, torna-se crescente a necessidade da busca de terapias alternativas para tratamento da mastite bovina, além de haver crescimento do mercado de produtos orgânicos, que proíbem o uso de antimicrobianos (PIRES et al, 2004 apud JESUS et al, 2018). Diante das características de baixa toxicidade, efeitos colaterais reduzidos e baixo custo de produção, houve crescimento do mercado de fitoterápicos (BRAZ FILHO, 2010; NIERO et al., 2003), que vem sendo expandido para a área rural, com estudos voltados para investigação de extratos capazes de agir no tratamento da afecção da glândula mamária bovina (EMBRAPA, 2012).

Plantas medicinais como *Calendula officinalis* (calêndula), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) e *Anacardium occidentale* (cajuzinho do cerrado) apresentam ações que, separadamente ou em associação, apresentam potencial

para tratamento da mastite bovina. Atualmente há necessidade da complementação de estudos acerca da padronização de extratos e de sua produção, levando em consideração o uso pretendido e princípios ativos, sendo também necessário verificar a eficácia de cada extrato diante do microrganismo *in vitro* (CELIK TAS et al., 2007; GACHKAR et al, 2007; GAZOLA et al., 2014; INATANI et al, 2005; INSTITUTO BIODINÂMICO, 2004; MANGENA & MUYIMA, 1999; LIMA et al., 2019; SOUZA et al, 2012; YUNIS-AGUINAGA et al, 2015).

2. OBJETIVOS

i. Objetivo geral

Avaliar, comparativamente, a utilização da cefalexina e dos fitoterápicos *Calendula Officinalis*, *Anacardium occidentale*, *Uncaria Tomentosa* e *Rosmarinus Officinalis*, *in vitro*, no tratamento de bovinos diagnosticados com mastite.

ii. Objetivo específico

- Identificar casos de mastite subclínica, a partir do uso do *California Mastitis Test* (CMT);
- Avaliar a eficiência *in vitro* da cefalexina, e do uso de extratos dos fitoterápicos *Calendula officinalis*, *Anacardium occidentale*, *Rosmarinus officinalis* e *Uncaria tomentosa* no tratamento de mastite e verificar sua eficácia a partir da análise do teste de difusão em disco;
- Comparar a eficácia do antibiótico alopático cefalexina e dos fitoterápicos *Calendula officinalis*, *Anacardium occidentale*, *Uncaria tomentosa* e *Rosmarinus officinalis*, diante da realização do teste de difusão em disco para os patógenos observados.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A mastite é uma doença de elevada magnitude e transcendência na bovinocultura brasileira, ocasionando perdas econômicas por redução na produção de leite, descarte de animais, descarte de leite com resíduos de antibióticos e custos com tratamento, além de contar com alta prevalência (EMBRAPA, 2012; JESUS et al, 2018; SANTOS et al, 2017).

O diagnóstico oportuno pode auxiliar na preservação dos tecidos e da glândula mamária do animal, de forma que a qualidade do leite pré-infecção pode ser restabelecida (SANTOS, 2017). Da mesma maneira, a eficácia do tratamento aumenta, reduzindo os danos financeiros e à saúde do rebanho, ao evitar disseminação da doença (SANTOS, 2017).

A mastite subclínica, por não apresentar sinais clínicos, é a que mais causa prejuízos ao produtor, pela demora no diagnóstico (LANGONI et al., 2017; DELLA LIBERA et al, 2011). Assim, a implementação de formas de diagnóstico em campo mostram-se aliadas na redução de casos da doença no rebanho e também auxiliam na obtenção de leite de melhor qualidade (DELLA LIBERA et al, 2011; DIAS, 2007 apud SANTOS, 2017;).

Visto que o uso indiscriminado de antimicrobianos pode levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana e de efeitos nocivos para o animal, e que a mastite tem grande prevalência em propriedades brasileiras, apresenta-se necessidade de busca de medicamentos alternativos para tratamento dessa doença (JESUS et al, 2018). Como um dos principais argumentos, há a questão de que os antibióticos liberam resíduos no leite, o que configura um problema de saúde pública, além de ser um problema de ordem monetária para o produtor (PIRES et al, 2004 apud JESUS et al, 2018). De acordo com Ganda et al (2016), 80% dos medicamentos prescritos para vacas leiteiras são utilizados para tratamento de mastite. Além disso, tem-se a questão de uma crescente busca por produtos orgânicos, levando à utilização de mais terapias alternativas, como homeopatia e fitoterapia (PIRES et al, 2004 apud JESUS et al, 2018).

De acordo com o instituto Biodinâmico (2004), para o tratamento de mastite em produções orgânicas, plantas medicinais com ação antisséptica poderiam ser utilizadas, como a *Calendula officinalis*. Sabe-se que os princípios ativos das plantas medicinais são resultados de seu metabolismo secundário, ou seja, aquele que não é essencial para mantê-la viva, e que outras plantas com ação medicinal também têm sua ação investigada, como é o caso da *Uncaria tomentosa*, com suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e da *Rosmarinus officinalis*, cuja ação é antimicrobiana e antioxidante (BOZIN et al, 2007; VALENTE, 2006).

Estudos indicam a eficiência antimicrobiana do *Rosmarinus officinalis*, e evidenciam que *S. aureus* e *E. coli*, alguns dos principais patógenos causadores da mastite bovina, apresentam suscetibilidade a esse extrato, diante da formação de halo em observações *in vitro* (Celiktas, 2007; Gachkar et al, 2007; Inatani et al, 2005; Mangena & Muyima, 1999).

Para *C. officinalis*, pesquisas mostram efeito antiinflamatório, antioxidante e antimicrobiano, auxiliando, também, na cicatrização de afecções cutâneas, devido à ação dos produtos do metabolismo secundário do fitoterápico, como flavonóides, saponinas, taninos e polifenóis (DEUSCHLE et al., 2015).

Já a Unha de Gato foi utilizada para melhoria do sistema imune em uma pesquisa com peixes, diante da presença de *S. agalactiae*, outro microrganismo comum na causa da afecção da glândula mamária de bovinos (YUNIS-AGUINAGA et al, 2015). A *Uncaria tomentosa*, além de imunoestimulante, apresenta propriedades antiinflamatórias, com baixo índice de morte celular (PERO, 2000; AKESSON et al, 2005;), de maneira que começou a ganhar valor comercial mundialmente, com alta demanda, por suas propriedades terapêuticas (HUGHES & WORTH, 1999; REVILLA, 2001).

Anacardium occidentale, ou cajuzinho do cerrado, apresentou potencial antimicrobiano, antiviral, antiinflamatório e antiplaquetário, podendo ser utilizadas diversas partes da planta, como o caule, casca, folhas e flores, para a produção de extratos, sendo que cada uma dessas partes apresentam metabólitos secundários diferenciados, como compostos fenólicos, ácidos orgânicos, flavonóides e taninos, capazes de agir contra bactérias e fungos (SILVA, 2012 apud ANDRADE JÚNIOR et al., 2018). Por apresentar essa atividade, estudos mostram indícios de efeito inibitório para *Staphylococcus aureus* e *E. coli*, patógenos amplamente encontrado em casos de mastite (SILVEIRA, 2012 apud ANDRADE JÚNIOR et al., 2018).

4. MÉTODO

O experimento iniciou com a ida a Fazenda Cavalcante Alencar, para realizar a coleta de material de 11 vacas em período de lactação, momentos antes de se iniciar a ordenha. Após higienização das mãos com hipoclorito de sódio 0,05% e secagem com papel toalha, realizou-se ordenha, em caneca telada de fundo preto, de 4 jatos de cada teto, à procura de grumos, e para observação das características sensoriais do produto, que

deveriam estar de acordo com a Instrução Normativa n.º62 de 29 de dezembro de 2011, normatizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que determina o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite de vaca, devendo obedecer às condições de líquido branco homogêneo, isento de sabores e odores estranhos (BRASIL, 2011). Após os testes, constatou-se que estava tudo em conformidade, seguindo-se para a realização de *pré-dipping*, a fim de seguir para o *California Mastitis Test* (CMT), para verificar a possibilidade de um caso de mastite subclínica. Para tanto, foram coletados 3 jatos de leite de cada um dos tetos separadamente. O equipamento foi previamente sanitizado com a solução de Alcalan Plus. Na bandeja do teste, há 1 *slot* destinado para a alocação das amostras de cada quarto mamário. Em seguida, adicionou-se o reagente CMT até a marca indicada em cada um dos 4 *slots* com leite. Após devida homogeneização, foi observada a característica do líquido obtido, e, caso alguma amostra indicasse positivo para mastite subclínica, o teto correspondente seria eleito para coleta de material. No experimento, todos os animais apresentaram ao menos um teto positivo no CMT, com formação de gel correspondente a uma cruz (+). Nas vacas com mais de um quarto positivo, elegeu-se o com maior formação de gel no CMT.

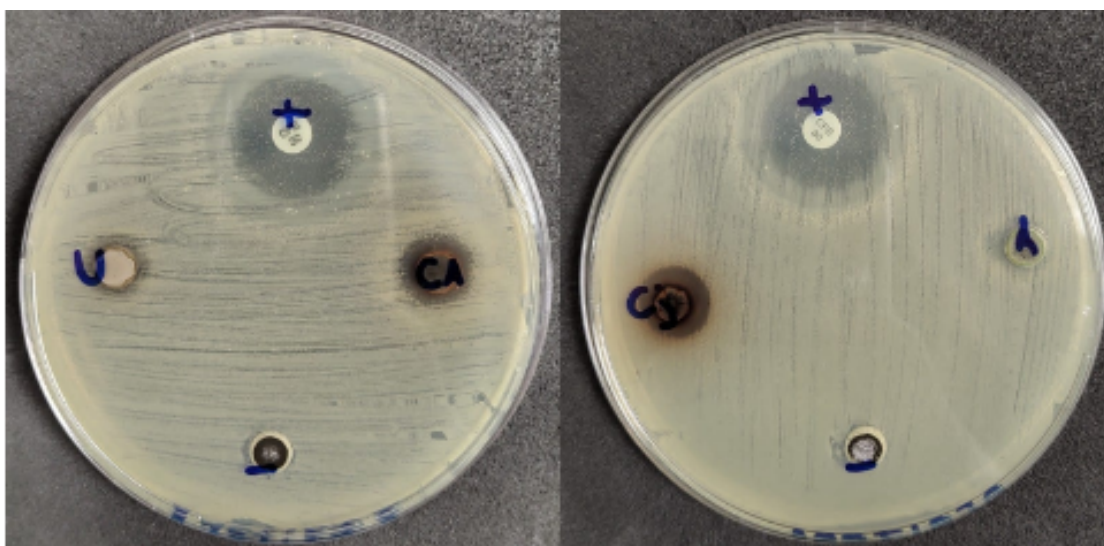
Com *swabs* da marca Olen[®], com meio de transporte Stuart, fez-se coleta de amostra dos tetos selecionados, ficando acondicionados em caixa de isopor até serem devidamente alocados em geladeira no laboratório do UniCEUB. Todos os frascos foram devidamente identificados com o nome do animal, bem com a disposição do teto em que a coleta foi realizada..

O controle positivo de eleição foi o antibiótico cefalexina, em discos de papel de 6,35 mm de diâmetro, na concentração especificada segundo padrões da farmacopeia brasileira (1988) e CLSI (2016, 2021). Para obtenção do extrato de Unha de Gato, utilizou-se 100µL da droga vegetal, que foi diluída em 900µL de água destilada estéril, resultando em proporção 1:10. A mesma diluição foi realizada com a tintura-mãe de Calêndula. Os extratos de cajuzinho do cerrado e de alecrim estavam na mesma concentração, e foram obtidos por doação da professora orientadora Francislete. Os fitoterápicos resultantes foram acondicionados, separadamente, em tubos de eppendorf, para garantir conservação e evitar contaminação.

Após obtenção dos materiais, foi utilizado o fluxo laminar para manipulação das

amostras, que seriam inoculadas nas placas de Petri, em meio de cultura Mueller Hinton (MHA). Posteriormente, foram acondicionadas em estufa, a 37°C, por 48 horas, para crescimento da cultura bacteriana. Estipulou-se a utilização de 22 placas para realização de testes preliminares acerca da eficácia dos extratos utilizados, por método de difusão, com divisão da placa em quadrantes: controle positivo (cefalexina), controle negativo (água estéril), extrato 1 ou 2 (cajuzinho ou calêndula), extrato 3 ou 4 (unha de gato ou alecrim). Para fins de padronização, cajuzinho e alecrim eram aplicados na mesma placa, enquanto que as duas outras ervas medicinais formavam outro conjunto de placas. Em ambos os casos, os controles positivo e negativo eram aplicados. Por fim, a amostra de cada animal era difundida em duas placas diferentes, para abarcar todas as variáveis primárias.

Figura 01: esquema da divisão dos extratos nas Placas de Petri para uma mesma vaca, no primeiro experimento. U: unha de gato; CA: Calendula officinalis; CJ: cajuzinho do cerrado; A: alecrim; (+): controle positivo (cefalexina); (-): controle negativo (água).



Fonte: elaboração própria

Após 48 horas, realizou-se medição dos halos de inibição formados, considerando a metodologia indicada pelo CLSI (2021). Colocou-se um pano escuro como fundo, para facilitar a visualização das placas e, com paquímetro, encostado no fundo da placa invertida, pela parte de trás, considerou-se todo espaço com alguma alteração, a olho nu, gerada na colônia, sendo efeito de inibição ou atenuação.

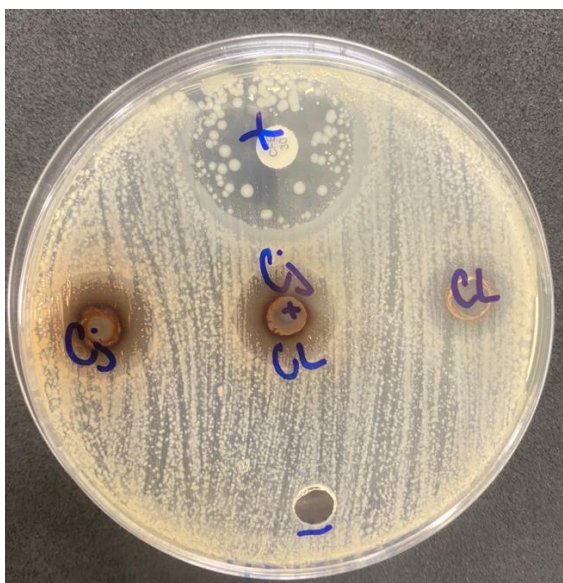
Na segunda fase, uma vez definidos os extratos de cajuzinho do cerrado e calêndula como os fitoterápicos que apresentaram melhor inibição ou atenuação bacteriana,

as mesmas amostras foram novamente inoculadas em novas placas de Petri, com MHA. Desta vez, foram feitas 6 repetições do mesmo tratamento para cada animal, totalizando 66 placas.

Após inoculação, cada placa foi separada em 5 partes, para divisão em controle positivo (cefalexina), controle negativo (água estéril), extrato de cajuzinho, extrato de calêndula e, no centro, a mistura destes dois extratos. A diluição de cajuzinho do cerrado e de Calêndula mantiveram-se iguais às do primeiro experimento. A junção desses extratos foi na proporção de 1:1.

Foram perfurados quatro poços, para alocação dos extratos e da água, com uma ponteira estéril de 0,4 milímetros de diâmetro. Nos poços identificados para as respectivas amostras ou para o controle negativo, foram despejados 30µL dos de cada substância, posicionado o controle positivo na parte superior da placa. Foram feitas 6 repetições para cada amostra, estas permaneceram em estufas por 48 horas à 37°C. Após o período, todas as amostras foram recolhidas para análise e medição dos halos com utilização de um paquímetro.

Figura 02: esquema da divisão dos extratos nas Placas de Petri no segundo experimento. CL: Calendula officinalis; CJ: cajuzinho do cerrado; CJ + CL: cajuzinho do cerrado e calêndula; (+): controle positivo (cefalexina); (-): controle negativo (água).



Fonte: elaboração própria

Em seguida, os dados foram distribuídos em uma tabela, e calculou-se a média dos

halos obtidos em cada tratamento, por animal (tabela 01).

Tabela 01 - Média dos valores (mm) dos halos de inibição ou atenuação para cada vaca, por tratamento.

TRATAMENTO					
ANIMAL	Cajuzinho (CJ)	Calêndula (CL)	CJ + CL	Controle (+)	Controle (-)
Varanda	10	3,83	9	28	–
Ametista	10,5	9,17	13	18	–
Rolinha	9,7	–	9,5	ND	–
Maria	4,83	–	4,5	15,3	–
Graúna	6,7	–	5,2	20,5	–
Dama	4,7	–	4	12,7	–
Princesa	11,7	8	11,5	19,3	–
Bela	4,3	–	3,6	20,6	–
Frida	11,8	8,8	12,1	19,2	–
Coreia	11,5	7,3	11,5	6,8	–
Cebola	4,6	–	4,1	16,6	–

Fonte: elaboração própria

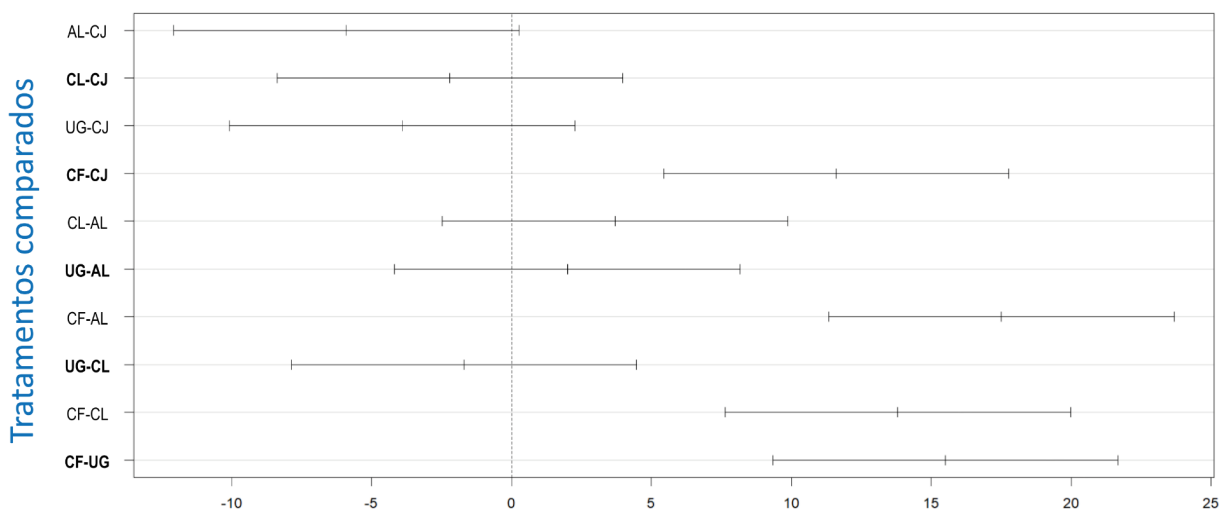
5. RESULTADOS

Após o teste preliminar e medição de halos os extratos *Rosmarinus officinalis* e *Uncaria tomentosa*, foi possível determinar que estes não apresentaram capacidade de inibição ou atenuação significativa, sendo descartados para prosseguimento do experimento. O resultado obtido com a *Anacardium occidentale*, na concentração de 1:10, foi o extrato que apresentou melhor resultado apresentando halos com inibição enquanto o halo do controle positivo (cefalexina) na mesma placa apresentou atenuação para os patógenos presentes. O extrato de *Calendula officinalis* em tintura comercial, assim como a *Anacardium occidentale*, apresentou inibição para os patógenos presentes, no entanto, com halos menores, se comparado ao controle positivo (figura 1).

Para análise bioestatística, foi utilizado o método post-hoc no software RStudio[®] 2023.06.1, aliando ANOVA ao teste de Tukey, que compara as médias dos tratamentos duas a duas, considerando um nível de significância de 0,05 ($\alpha = 5\%$). Os resultados obtidos nos testes primários indicaram que houve diferença significativa entre todas as duplas de

tratamento que contavam com a cefalexina e um extrato, abarcando, portanto, todos os extratos comparados com o controle positivo.

Gráfico 01 - Gráfico de Intervalo de Confiança de 95% de Tukey para o experimento 1, comparando, dois a dois, os extratos Calêndula (CL), Cajuzinho do Cerrado (CJ), Alecrim (AL), Unha de Gato (UG) e a cefalexina (CF) com o tamanho dos halos de inibição ou atenuação.



Comparação tamanho médio dos halos (mm)

Fonte: elaboração própria

Ao calcular o *p-value* das médias entre o controle positivo com cada um dos fitoterápicos (CF-CJ, CF-AL, CF-CL, CF-UG), os valores mantiveram-se abaixo de α (tabela 02). Para valores menores ou iguais a *p-value* = 0,05, rejeita-se a hipótese nula de que não há diferença significativa entre a inibição do fitoterápico e do controle positivo (MORETTIN & BUSSAB, 2017).

Tabela 02 - *P-value* de cada fitoterápico, comparado com o controle positivo. Extratos de Calêndula (CL), Cajuzinho do Cerrado (CJ), Alecrim (AL), Unha de Gato (UG) e a cefalexina (CF).

Média	CF-CJ	CF-AL	CF-CL	CF-UG
<i>P-value</i>	$2,8 \cdot 10^{-5}$	0	$9 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$

Considerar $\alpha = 0,05$.

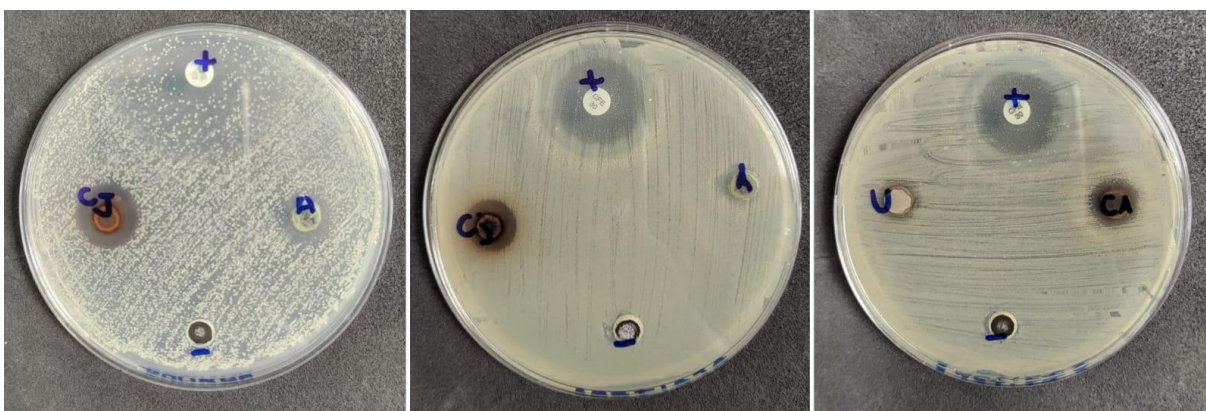
Fonte: elaboração própria

Nesse sentido, pode-se verificar que três, dos quatro fitoterápicos atestam

diferenças significativas de inibição em relação ao controle positivo (gráfico 01 e tabela 02). Para o alecrim ($p\text{-value}=0$), por resultar em nível de significância muito baixo, infere-se que não houve diferença.

Calêndula e cajuzinho-do-cerrado foram selecionados para a segunda etapa do teste por apresentarem casos de formação de halos de inibição, enquanto, nas mesmas placas, cefalexina apenas conseguiu atenuar o crescimento dos microrganismos (figura 03).

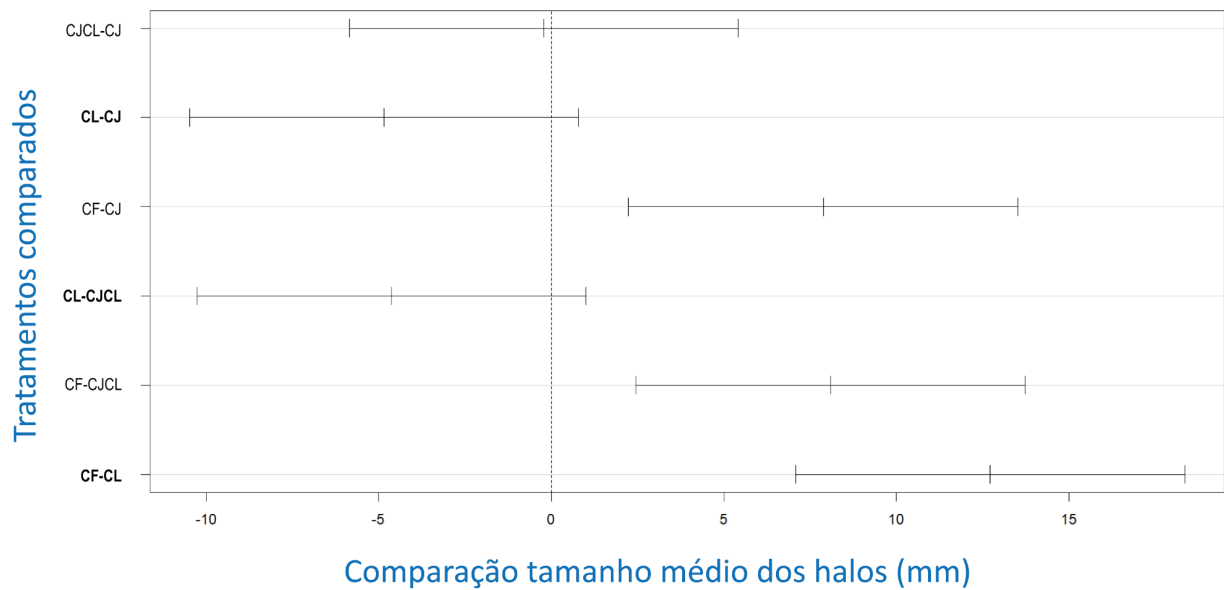
Figura 03 - Placas em que os extratos de cajuzinho-do-cerrado (CJ) ou calêndula (CA) obtiverem resultado de inibição do crescimento microbiano, e cefalexina (+) apresentou apenas atenuação.



Fonte: elaboração própria

Ao considerar os dados obtidos nesta etapa, verifica-se, novamente, diferença significativa nos tratamentos de cada um dos extratos avaliados, frente à cefalexina (gráfico 02 e tabela 03).

Gráfico 02 - Gráfico de Intervalo de Confiança de 95% de Tukey para o experimento 2, comparando, dois a dois, os extratos Calêndula (CL), Cajuzinho do Cerrado (CJ), a junção dos dois fitoterápicos (CJCL) e a cefalexina (CF) com o tamanho dos halos de inibição ou atenuação.



Fonte: elaboração própria

O *p-value* para cada teste significativo foi detalhado na tabela 03.

Tabela 03 - *P-value* de cada fitoterápico, comparado com o controle positivo. Extratos de Calêndula (CL), Cajuzinho do Cerrado (CJ), a junção de ambos (CJCL) e a cefalexina (CF).

Média	CF-CJ	CF-CJCL	CF-CL
<i>P-value</i>	$3 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-6}$

Considerar $\alpha = 0,05$.

Fonte: elaboração própria

Por fim, verificou-se reiteradamente um potencial inibitório dos extratos de cajuzinho e da junção cajuzinho e calêndula (1:1), enquanto que o controle positivo foi capaz apenas de realizar atenuação dos microrganismos (figura 04).

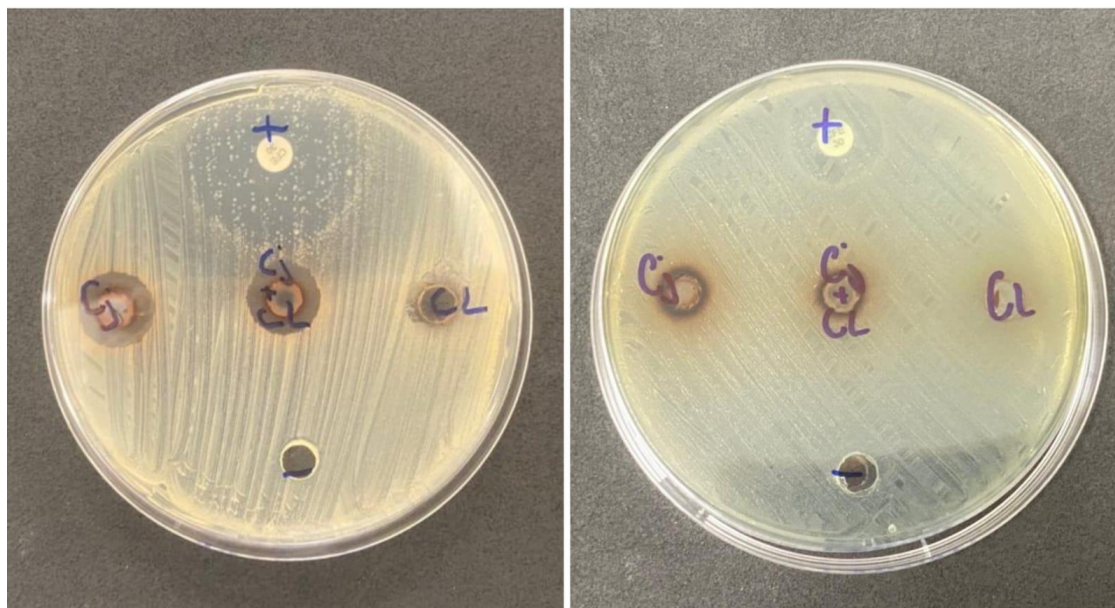


Figura 04 - Placas em que os extratos de cajuzinho-do-cerrado (CJ) e/ou o fitoterápico misturado (CJCL) obtiverem resultado de inibição do crescimento microbiano, e cefalexina (+) apresentou apenas atenuação.

Fonte: elaboração própria

6. DISCUSSÃO

Diante da bioestatística analisada, foi observada relevância de atuação dos extratos de cajuzinho (1:10), calêndula (1:10) e da mistura 1:1 (v/v) de cajuzinho e calêndula, se comparado à cefalexina. Alecrim e unha de gato, embora tenham evidenciado *p-value* menor que 0,05, não apresentaram resultados tão divergentes ante o controle positivo.

Os efeitos positivos de cajuzinho-do-cerrado contra bactérias patogênicas em bovinos foram confirmados pelo estudo *in vitro* de Pereira et al. (2010), ao inibir o crescimento de *S. aureus*. Gonçalves et al. (2005) e Silva et al. (2007) também obtiveram resultados de inibição de crescimento de *S. aureus* e de *Staphylococcus spp.*, realizando testes *in vitro* em amostras humanas.

A propriedade bactericida da calêndula está em desacordo com Diaz et al. (2010), que não determinou atividade antimicrobiana significativa diante do uso desse extrato, mesmo em diferentes concentrações. No entanto, Rozwalka et al. (2008) obteve resultados positivos quanto à propriedade bactericida da *C. officinalis in vitro*.

Com relação à mistura dos fitoterápicos *A. occidentale* e *C. officinalis*, demanda-se

mais pesquisas com diferentes níveis de concentração, a fim de determinar se os metabólitos de ambos agem separadamente ou se há efeitos sinérgicos, de maneira que a junção dos extratos permitiria uma ação amplificada (SILVA, 2012 apud ANDRADE JÚNIOR et al., 2018).

A alta ocorrência de resultados apenas de atenuação, gerados pelo controle positivo, pode ser justificada pelo uso amplo e indiscriminado das cefalosporinas para tratamento da mastite bovina, especialmente das de primeira geração, como a cefalexina, por terem baixo custo e serem de amplo espectro (LANGONI et al., 2017; GANDA et al., 2016). Mesmo ao avaliar o efeito das cefalosporinas de terceira geração no tratamento da mastite bovina, por serem um pouco mais específicas para bactérias gram-positivas, Ganda et al. (2016) atesta que não houve significância diante da cura clínica, nem da cura bacteriológica dos animais tratados, se comparados com os que não receberam tratamento (GANDA et al., 2016). No entanto, Lago et al. (2011), conseguiu demonstrar uma alta eficácia em tratamentos com uso de cefalosporinas de primeira geração. Para tanto, o autor implementou a realização de culturas bacteriológicas a campo, para que o antibacteriano fosse selecionado de acordo com o perfil microbiológico da amostra do animal mastítico. A comparação entre os resultados evidencia a problemática gerada pelo uso de drogas inadequadas ao tratamento, o que pode levar à resistência microbiana (EMBRAPA, 2012).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados significativos de inibição bacteriana, mediante utilização *in vitro* de *A. occidentale* e *C. officinalis*, mostram a viabilidade da inserção da fitoterapia no cotidiano dos tratamentos veterinários, associado à antibioticoterapia convencional, visando a diminuição da dosagem do alopático e do tempo de tratamento. Dessa forma, pode-se focar na realização de tratamentos mais assertivos e com menos perdas econômicas, ao implementar um protocolo de cultura a campo, junto de medicina veterinária integrativa.

Para verificar amplamente a atividade dos fitoterápicos, no entanto, há necessidade de padronização dos extratos, bem como realização de testes em diferentes concentrações, o que permitiria, até mesmo, a avaliação de tratamentos que contassem com a mistura direta de antibióticos com os fitoterápicos.

Também vale ressaltar que a matéria-prima dos extratos sofre alterações em sua composição, a depender do local em que sua extração é realizada, uma vez que os metabólitos secundários têm produção induzida por fatores de estresse ambiental, por exemplo.

Por fim, a observação dos efeitos *in vivo* dos extratos obtidos é relevante, a fim de verificar possíveis interferências de fatores inerentes ao animal e ao ambiente.

REFERÊNCIAS

Acosta, A.C.; Silva, L.B.G; Medeiros, E.S.; Pinheiro-Júnior, J.W.; Mota, R.A. Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 36(7): 565-573, Julho 2016. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pvb/a/sTnKKCCMgPWxTmFM3NzDfdq/?format=pdf>> Acesso em: mai 2023.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*, 6ª ed., 2023.

AKESSON, C.; LINDGREN, H.; PERO, R.W.; LEANDERSON, T.; IVARS, F. **Quinic acid is a biologically active component of the *Uncaria tomentosa* extract.** *C-Med-100. International Immunopharmacology*, v.5, p.219-229, 2005.

Andrade Júnior, F.P.; Alves, T.W.B.; Lima, B.T.M.; Araújo, T.P.; Medeiros, F.D. *Anacardium occidentale* (cajuero) e seu potencial antimicrobiano: uma revisão. CONIDIS - I Congresso Internacional da Diversidade do Semiárido, 2018. Disponível em: <https://www.editorarealize.com.br/editora/anais/conidis/2016/TRABALHO_EV064_MD4_S A14_ID497_11092016222441.pdf> Acesso em: ago 2023.

BOZIN, B.; SAMOJLIK, I.; MIMICA-DUKIC, N. **Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, October 2007. DOI: 10.1021/jf0715323.

BRAZ FILHO, R. **Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente.** *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

CELIK TAS, O.Y., KOCABAS, E.E.H., BEDIR, E., VARDAR SUKAN, F., OZEK, T., BASER, K.H.C. **Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *R. officinalis*, depending on location and seasonal variations.** *Food Chem.*, v. 100, p. 553559, 2007.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute M100: ED 31 - Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing, 31st Edition MAR 2021.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S26 - Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing. 2016.

DELLA LIBERA, A.M.M.P.; SOUZA, F.N.; BLAGITZ, M.G.; BATISTA, C.F. **Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina.** *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 78, n. 2, p. 297300, 2011.

DEUSCHLE, V.C.K.N.; DEUSCHLE, R.A.N.; PIANA, M.; BOLIGON, A.A.; BORTOLUZZI, M.R.B.; DAL PRÁ, V.; DOLWISCH, C.B.; LIMA, F.O.; CARVALHO, L.M.; ATHAYDE, M.L. Avaliação fitoquímica e capacidade antioxidante e fotoprotetora *in vitro* das folhas de *Calendula officinalis* L.

EMBRAPA. **Mastite Bovina, Considerações e Impactos Econômicos**. Documentos 170, ISSN 1678 - 1953. Dezembro, 2012

GACHKAR, L., YADEGARI, D., REZAEI, M.B, THAGUIZADEH, M, ASTANEH, S.A., RASOOLI, I. **Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and R. officinalis essential oils**. Food Chemistry, v. 102, n. 3, p. 898–904. 2007.

Ganda, E. K., Bisinotto, R. S., Lima, S. F., Kronauer, K., Decter, D. H., Oikonomou, G., Schukken, Y. H. & Bicalho, R. C. 2016. Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. Scientific Reports, 6, 1-13. Rev. bras. plantas med. 17 (4 suppl 1), 2015.

Gonçalves, A.L., Filho, A.A. and Menezes, H. (2005) Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arq Inst Biol 72, 353-358.

HUGHES, K.; WORTH, T. **Cat's claw. Purdue University, Center for New Crops & Plants Products, New Crop FactSheet, 1999.** Disponível em: www.hort.purdue.edu/newcrop/CropFactSheets/catsclaw.html. Acesso em: mai. 2022.

INATANI, R., NAKATANI, N. ; FUWA, H. **Antioxidative Effect of the Constituents of Rosemary (R. officinalis L.) and Their Derivatives**. Agricultural and Biological Chemistry, v. 47, n. 3, p. 521-528. 1983.

INSTITUTO BIODINÂMICO. **Diretrizes para o padrão de qualidade orgânico**. Associação de certificação Biodinâmico, Botucatu. São Paulo: 2004.

JESUS, R.A.; COUTINHO, C.A. **Uso de medicamentos homeopáticos para o tratamento da mastite bovina: Revisão**. PUBVET, v.12, n.3, a58, p.1-10, Mar., 2018. DOI: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n3a58.1-10>.

Lago A., Godden S. M., Bey R., Ruegg P. L.; Leslie K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *Journal of dairy science* 94, 4441–4456 (2011).

Langoni, H.; Salina, A.; Oliveira, G.C.; Junqueira, N.B.; Menozzi, B.D.; Joaquim, S.F. Considerações sobre o tratamento das mastites. Pesq. Vet. Bras. 37(11):1261-1269, novembro 2017. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/pvb/a/T7rLVhnbtGbyh85kFLtqPnN/?format=pdf>>. Acesso em: ago 2023.

Lima, R. A., Pinto, M. N., Mendoza, A. Y. G., Silva, D. R., Nascimento, F. A., Rodrigues, J. J. P., Almeida, K. P. C., Vieira, R. L. & Assis, S. N. S. (2019). A importância das plantas medicinais para a construção do conhecimento em botânica em uma escola pública no município de Benjamin Constant-amazonas (Brasil). *Revista Ensino de Ciências e Humanidades Cidadania, Diversidade e Bem Estar*, 2 (2), 478–492.

MANGENA, T., MUYIMA, N. Y. O. **Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *R. officinalis* on selected bacteria and yeast strains** letters in *Applied Microbiology*, v. 28, n. 4 p. 291–296. 1999.

Morettin, P.A.; Bussab, W.O. *Estatística Básica*. 9. ed. São Paulo: Saraiva, 2017.

Niero, R.; Malheiros, A.; Bittencourt, C. M. S.; Biavatti, M. W.; Leite, S. N.; Cechinel Filho, V. *Em Ciências farmacêuticas. Contribuições ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*; Bresolin, T. M. B.; Cechinel Filho, V., eds.; Ed. UNIVALI: Itajaí, 2003.

Pereira, A.V., Silva, V.A., Freitas, A.F.R., Pereira, M.S.V., Trevisan, L.F.A., Costa, M.R.M. (2010) Extratos vegetais: atividade antimicrobiana e genético sobre plasmídios de resistência a antibióticos em microrganismos. *Rev Biol Farm* 4,60-65.

PERO, R.W. **Method of preparation and composition of a water soluble extract of the plant species *Uncaria***. US n. PI 6039949, 21 mar. 2000.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia, oportunidades econômicas e sustentáveis**. 2.ed. Manaus: SEBRAE-AM/INPA, 2001.

Rozwalka, L.C.; Lima, M.L.R.Z.C., Mio, L.L.M., Nakashima, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. *Defesa Fitossanitária - Ciência Rural* 38 (2) - Abr, 2008.

SANTOS, W.B.R.S.; OLIVEIRA, N.C.; VIEIRA, M.L.; RIBEIRO, J.C.; CEZÁRIO, A.S.; OLIVEIRA, E.M.B; CAMARGOS, A.S.; VALENTE, T.N.P. **Mastite Bovina: uma revisão**. *Colloquium Agrariae*, vol. 13, n. Especial, Jan - Jun, 2017, p. 301-314, ISSN: 1809-8215. DOI: 10.5747/ca.2017.v13.nesp.000235.

Silva, J.G., Souza, I.A., Higino, J.S., Siqueira-junior, J.P., Pereira, J.V. and Pereira, M.S. (2007) Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras

multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Farmacogn* 17, 572-577.

SILVA, R. A. Ação antimicrobiana de *Anacardium occidentale* L.: Potencial biotecnológico na geração de produtos anticárie. 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia, São Luiz, MA, 2012.

VALENTE, L.M.M. **Unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.]: Um Panorama Sobre seus Aspectos mais Relevantes.** *Revista Fitos*, Vol. 2, Nº 01 junho/setembro, 2006.

YUNIS-AGUINAGA, J.; CLAUDIANO, G.S.; MASRCUSSO, P.F.; MANRIQUE, W.G.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R., FERNANDES, J.B.K. ***Uncaria tomentosa* increases growth and immune activity in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae*.** *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 47, Issue 1, November 2015, p. 630-638. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.051>