

Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. - *Compositae* (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas*

Antimicrobial activity of *Tagetes minuta* L. - *Compositae* (Chinchilho) against Gram-positive and Gram-negative bacteria

CORRESPONDÊNCIA PARA:
José Maria Wiest
ICTA/UFRGS – Caixa Postal 15090
91501-970 – Porto Alegre – RS
e-mail: jmwiest@vortex.ufrgs.br ;
cmavanci@vortex.ufrgs.br

1-Secretaria Municipal da Saúde – Centro
de Vigilância em Saúde da Prefeitura
Municipal de Porto Alegre – RS
2-Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva da FAVET/UFRGS, Porto
Alegre – RS
3-Departamento de Ciências dos
Alimentos do ICTA/UFRGS, Porto
Alegre – RS

Claudia Ache Saldanha de SOUZA¹; César Augusto Marchionatti AVANCINI²;
José Maria WIEST³

RESUMO

O decocto de *Tagetes minuta* L. - *Compositae* - (Chinchilho) foi submetido a testes de diluição serial com técnica de tubos múltiplos para determinação de atividade antimicrobiana - expressa em Concentração Inibidora Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) -, frente a diferentes diluições de inóculos de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*) e Gram-negativas (*Salmonella Gallinarum* e *Escherichia coli*). A análise estatística dos resultados mostrou, para parte das combinações concentrações do decocto/diluições do inóculo, que *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Salmonella* têm maior sensibilidade ao decocto como antimicrobiano, demonstrando ação de seletividade. *E. coli* demonstrou-se praticamente resistente à atividade antimicrobiana do decocto, mesmo reduzindo-se a concentração de seu inóculo abaixo de 10⁴ ufc/ml. Confirma-se assim o atributo anti-séptico, conferido popularmente ao decocto de *Tagetes minuta* (Chinchilho), sugerindo-se a possibilidade da sua utilização como anti-séptico/desinfetante em situações-problemas específicas em saúde e em produção animal, relacionadas aos agentes testados, adequando-se inclusive a situações de carência de recursos econômicos ou de exclusão econômico-social.

UNITERMOS: Desinfetantes; Anti-sépticos; Atividade; Agentes antimicrobianos; *Tagetes minuta*.

INTRODUÇÃO

Atenção Primária em Saúde é definida pela utilização de tecnologias práticas, cientificamente asseguradas, socialmente aceitáveis, economicamente viáveis e que possam ser postas ao alcance de toda a comunidade. Neste sentido, a valorização do potencial da medicina tradicional e o conseqüente uso das plantas medicinais vêm sendo enfatizados como suportes que a fundamentam. Este fato é reforçado pelas diferentes resoluções das Assembléias Mundiais de Saúde, da Organização Mundial de Saúde, sintetizadas por "save plants that save lifes", a súpula da declaração de Chiang-Mai, em 1988 na Tailândia^{1,16}.

Para Pozetti *et al.*¹⁷, é comum o emprego popular de vegetais com a finalidade de obtenção dos mais variados efeitos medicamentosos, sendo o uso popular em grande número de

casos justificado cientificamente. Entre os empregos dados aos vegetais inclui-se a sua aplicação como antimicrobianos.

As substâncias antibióticas nas plantas são detectadas pela observação do crescimento de microrganismos colocados em contato com tecidos ou extratos destas plantas. Para detectar estas substâncias são usados vários métodos, que se diferenciam na sensibilidade ou em seus princípios. Os resultados obtidos serão influenciados pelo método escolhido, assim como pelos microrganismos usados nos testes. A parte da planta utilizada também interfere nos resultados bem como a forma de uso: suco, extrato (extração por água ou outros solventes) ou óleo essencial²¹.

Tagetes engloba algumas espécies da família das Compostas, todas originárias do México e introduzidas no Brasil há muitos anos, onde se aclimataram perfeitamente, tornando-se até subespontâneas¹⁵. *Tagetes minuta* L., segundo

* Trabalho subvencionado por Auxílio Integrado à Pesquisa (CNPq-processo 523193/96-NV).

Kissmann e Groth¹³, pertence à Família Compositae ou Asteraceae, Subfamília Asteroideae, Tribo Helenieae, Gênero *Tagetes*, Espécie *Tagetes minuta* Linné, com Código TAGMI. A espécie *minuta* faz referência ao tamanho das flores e não da planta, que pode alcançar até 2 metros de altura. A planta é popularmente denominada vara-de-rojão, rabo-de-foguete, cravo-de-defunto, cravo-de-urubu, chinchilho, coari, coari-bravo, estrondo. *Tagetes minuta* é uma planta reproduzida por semente, com germinação na primavera e verão, na Região Sul do Brasil; apresenta ciclo de 120-150 dias até a formação de sementes. Ocorre em terrenos secos e desenvolve-se melhor naqueles cultivados, de boa fertilidade e em áreas onde se efetuaram queimadas.

Singh *et al.*²⁰, baseados em vários estudos realizados em diferentes partes do mundo, efetuaram uma análise do óleo essencial das flores de *Tagetes minuta* L. do noroeste do Himalaia, identificando entre os 20 componentes os seguintes como os principais: (2)- β -ocimene (39,44%), dihydrotagetone (15,43%), (2)-tagetone (8,78%), (E)-ocimenone (14,83%) e (Z)-ocimenone (9,15%). Os autores relataram também a atividade larvicida do ocimenone, contra mosquitos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do decocto de *Tagetes minuta* L. - Compositae (cinchilho), submetendo-o *in vitro* a testes padrões utilizados na determinação da concentração inibidora mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus (Streptococcus) faecium*, *Escherichia coli* e *Salmonella Gallinarum*.

MATERIAL E MÉTODO

A planta

A escolha da planta ocorreu como resultado de trabalho utilizando metodologia qualitativa etnográfica¹¹.

A planta *T. minuta*, ecótipo nativo na região metropolitana de Porto Alegre, RS, BR, foi colhida no município de Nova Santa Rita, junto ao Assentamento de Capela Santana, de vegetação espontânea, distante de possíveis contaminantes químicos agrícolas, no período do outono (abril), encontrando-se no final da floração. Foi utilizada a escala ACFOR na categoria "frequente", segundo Kente e Coker⁷ e a escala de sociabilidade na categoria "pequenos grupos" ou "tufos e indivíduos isolados" de Braun-Blanquet⁷ para identificar e caracterizar *Tagetes minuta* na comunidade. Exsiccata da planta, preparada segundo Ming¹⁴, foi encaminhada ao Herbário do Departamento de Botânica/Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFRGS para identificação taxonômica. O material para os experimentos foi desidratado na ausência de luz solar, em aeração espontânea e armazenado em local protegido de raios solares, poeira e umidade. Os testes

iniciaram-se quatro meses após a colheita, estendendo-se por um período de cinco meses.

Obtenção do decocto

O decocto de *T. minuta* foi obtido como referenciado na Farmacopéia Brasileira⁹, esgotando-se 35 gramas da planta, que foi grosseiramente picada, em 350 ml de água destilada, levando-os à cocção pelo período de 15 minutos, com a água em ebulição a fogo brando, usando-se como recipiente um Erlenmeyer que foi coberto com placa de Petry. O decocto assim obtido foi considerado a solução-mãe, perdendo-se 8 a 10% do volume inicial por evaporação ou retenção na planta e estando livre de possíveis contaminantes esporulados.

Amostras bacterianas

Segundo Carter⁶, na avaliação da atividade de antibacterianos, deve-se utilizar ao menos uma espécie de microrganismos Gram-positivos ou Gram-negativos. O Ministério da Saúde³ recomenda, especificamente para indústria de alimentos, que os antimicrobianos sejam confrontados com os gêneros *Staphylococcus* e *Escherichia*, e para o registro de desinfetantes de uso geral com *Staphylococcus* e *Salmonella*.

Como Gram-positivas, usou-se *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), bactéria bastante empregada na avaliação de atividade antibacteriana de extratos vegetais, sendo também um organismo comum em ambientes de produção animal; *Enterococcus (Streptococcus) faecium* (KI- DVG: Sociedade Alemã de Medicina Veterinária), igualmente comum em ambientes de saúde e de produção animal, o qual, segundo Schliesser¹⁹, é um microrganismo extremamente resistente a desinfetantes. Como Gram-negativas, usou-se *Escherichia coli* p-16 e *Salmonella Gallinarum*, isoladas de enteritis em suínos e tifo aviário respectivamente, gentilmente cedidas pelos Laboratórios de Patologia Suína e Aviária do Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor da FEPAGRO-SAA/RS. As amostras bacterianas foram mantidas em passagens por ágar nutriente ou ágar sangue. Para cada experimento utilizaram-se cultivos em caldo BHI (DIFCO®; Detroit; MI; USA) com 18-24 horas de incubação aeróbia a 37°C, com um mínimo de 10⁸ unidades formadoras de colônia/ml, determinados segundo Cavalli-Sforza⁸.

Detecção da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do decocto de *T. minuta*, utilizou-se a técnica de diluição em série com sistema de tubos múltiplos^{2,18,22} para a determinação quantitativa da CIM e da CBM.

As linhas de diluição da concentração do decocto foram montadas em percentuais decrescentes de 100% a 0,16%, em 12 graus geométricos com fator 0,5. Os inóculos,

com no mínimo 10^8 ufc/ml em culturas de 18-24 horas, foram submetidos a linha de diluição logarítmica desde 10^7 ufc/ml até 10^0 ufc/ml.

A CIM foi determinada pela leitura da turvação dos tubos do sistema de tubos múltiplos contendo BHI (DIFCO®; Detroit; MI; USA), decocto e inóculo, sendo definida como a mais alta diluição (ou a menor concentração) do decocto que impediu o crescimento da bactéria (meio de cultivo sem turvação) para cada diluição do inóculo.

A CBM foi determinada pelo plaqueamento de alíquota, através de alça bacteriológica, de cada concentração do decocto, em todas as diluições do inóculo que não apresentaram turvação para a CIM. A leitura se fez após incubação em ágar nutriente (DIFCO®; Detroit; MI; USA) a 37°C por 24 horas, sendo considerada CBM a concentração da placa que não apresentou crescimento bacteriano.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através de Análise de Variância, de um delineamento fatorial com os seguintes fatores: a) as quatro bactérias; b) os 12 níveis de concentração

do decocto; c) os oito níveis de diluição da bactéria, complementada por teste de Tukey ao nível de significância de 5% com as médias dos tratamentos. O experimento foi realizado com três repetições, e para quantificar a intensidade do efeito do decocto sobre a bactéria foi criada a variável Tempo de Inibição (TI) que assumiu os seguintes valores: 1 (morta); 2 (inibida até as 144 horas); 3 (inibida até as 72 horas); 4 (inibida até as 48 horas); 5 (inibida até as 24 horas); 6 (ativa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do resgate de conhecimento popular (etnografia) sobre o uso de plantas medicinais entre famílias de assentados da reforma agrária, no RS, obteve-se a informação de que o "chinchilho" (*Tagetes minuta*) era utilizado para "tratamento de feridas infeccionadas", para "enzabuamento", para "mordidas e alergia de insetos" e para "começar a se curar". Essas finalidades de uso nos fizeram inferir a possibilidade da existência de atividade antimicrobiana nesta planta.

As Tab. 1 e 2 apresentam a atividade bacteriostática ou bactericida que o decocto de *Tagetes minuta* exerceu sobre

Tabela 1

Atividade antimicrobiana, concentração inibidora mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do decocto (35 g planta/350 ml água) de *Tagetes minuta* L. - Compositae (chinchilho) frente a *Staphylococcus aureus*, através de três repetições do experimento (UFRGS/98).

BACT/DEC	CIM/CBM											
	100%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	2,5%	1,25%	0,63%	0,32%	0,16%
10^7 ufc/ml	111	155	555	566	666	666	666	666	666	666	666	666
10^6 ufc/ml	111	545	555	646	645	666	666	666	666	666	666	666
10^5 ufc/ml	111	145	455	155	155	566	566	666	666	666	615	656
10^4 ufc/ml	111	154	455	455	165	665	666	666	666	666	656	666
10^3 ufc/ml	111	145	454	145	555	565	466	666	666	666	656	666
10^2 ufc/ml	111	141	455	154	555	565	566	666	666	666	616	666
10^1 ufc/ml	111	111	344	144	614	454	465	466	166	566	566	665
10^0 ufc/ml	111	111	141	115	446	355	145	315	451	165	111	566

Cada célula apresenta o resultado das três repetições, para o inóculo *versus* o decocto. As representações numéricas indicam a variável TI: de 2 a 5 referem-se às ações bacteriostáticas (indicando a CIM), e 1 ou 6 a ação bactericida (indicando a CBM). Morta = 1; Inibida até as 144h = 2; Inibida até as 72h = 3; Inibida até as 48h = 4; Inibida até as 24h = 5; Ativa = 6.

Tabela 2

Atividade antimicrobiana, concentração inibidora mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do decocto (35 g planta/350 ml água) de *Tagetes minuta* L. - Compositae (chinchilho) frente a *Enterococcus faecium*, através de três repetições do experimento (UFRGS/98).

BACT/DEC	CIM/CBM											
	100%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	2,5%	1,25%	0,63%	0,32%	0,16%
10^7 ufc/ml	151	666	666	666	666	666	666	666	666	666	666	666
10^6 ufc/ml	111	666	666	666	666	666	666	666	666	666	666	666
10^5 ufc/ml	111	666	666	666	666	666	666	666	666	666	666	666
10^4 ufc/ml	111	561	666	666	666	666	666	666	666	666	666	666
10^3 ufc/ml	111	565	666	666	666	666	666	666	666	666	666	666
10^2 ufc/ml	111	665	566	666	666	666	666	666	666	666	666	666
10^1 ufc/ml	111	541	551	456	666	461	666	661	166	661	666	161
10^0 ufc/ml	111	151	161	151	161	161	161	161	161	161	161	161

Cada célula apresenta o resultado das três repetições, para o inóculo *versus* o decocto. As representações numéricas indicam a variável TI: de 2 a 5 referem-se às ações bacteriostáticas (indicando a CIM), e 1 ou 6 a ação bactericida (indicando a CBM). Morta = 1; Inibida até as 144h = 2; Inibida até as 72h = 3; Inibida até as 48h = 4; Inibida até as 24h = 5; Ativa = 6.

Staphylococcus aureus e *Enterococcus faecium*.

Quanto à atividade antibacteriana do T. *minuta* frente a *Salmonella* Gallinarum obteve-se o seguinte resultado: na concentração do decocto em 100%, este provocou a morte do inóculo em todas as diluições. As concentrações de 50%, 40% e 30% mostraram poder bactericida apenas na diluição do inóculo em 10⁰ufc/ml, e inibição apenas com o inóculo entre 10² e 10¹ufc/ml. As demais concentrações do decocto não mostraram atividade antimicrobiana.

Para *Escherichia coli*, o decocto na concentração 100% mostrou-se bactericida nas concentrações 10¹ e 10⁰ufc/ml, sendo que nas demais (10⁷ a 10²ufc/ml) ocorreu a inibição por 24 horas. Ocorreram também inibições nas concentrações do decocto de 50%, 40% e 30%, por um tempo de inativação de 24 horas nas concentrações do inóculo de 10¹ e de 10⁰ufc/ml.

Como resultado da análise estatística, referente às médias da interação entre concentração do decocto *versus* bactéria, foram observados os seguintes resultados:

a) o tempo de inativação (e o tipo de ação bacteriostática ou bactericida) tende a diminuir quando a concentração do decocto é menor;

b) na concentração do decocto em 100%, as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Salmonella* Gallinarum diferem em sensibilidade quando comparadas a *E. coli*, esta última apresentando menor tempo de inibição;

c) na concentração do decocto em 50%, as bactérias *Enterococcus faecium*, *Salmonella* Gallinarum e *Escherichia coli* diferem em sensibilidade quando comparadas ao *Staphylococcus aureus*, sendo que esta última bactéria apresentou maior tempo de inibição;

d) nas outras concentrações (40% a 0,16%), do decocto não houve diferenças significativas entre as ações sofridas pelas bactérias.

Não há dados na literatura que demonstrem que o decocto de *Tagetes minuta* apresente atividade antimicrobiana. No entanto, os resultados obtidos neste estudo coincidem com os de outros autores em que esta atividade foi testada para o óleo essencial de plantas do mesmo gênero. Garg e Dengre¹⁰ demonstraram que o óleo de *Tagetes erecta* possui grande atividade frente a *Staphylococcus epidermidis* (*albus*). Cáceres

*et al.*⁴, em testes *in vitro* com 84 diferentes plantas frente a enterobactérias patogênicas em humanos, revelaram que *Tagetes lucida* apresentou o melhor resultado, apontando que a bactéria *Escherichia coli* manifestou maior resistência. Em outro estudo, mostrou-se a eficácia do óleo de *Tagetes filifolia* frente a *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp.⁵.

Ressalta-se, no entanto, a necessidade de cuidados quando na comparação de resultados, bem como na realização de experimentos, devido à existência de diferentes metodologias de trabalho na determinação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais. Por exemplo, Skinner²¹, Jansen *et al.*¹² e Rios *et al.*¹⁸ discutem a interferência que as diferentes extrações de soluções das plantas, as diferentes metodologias (diluição ou difusão) e os diversos meios de cultura podem exercer sobre os resultados. Neste sentido, o método de diluição com técnica do sistema de tubos múltiplos, juntamente com o meio de cultura utilizado, demonstrou-se adequado para a avaliação da atividade antimicrobiana do decocto de *Tagetes minuta*.

CONCLUSÕES

A avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do decocto de *Tagetes minuta*, partindo da solução-mãe inicial na proporção 1:10, revelou atividade antimicrobiana com marcada seletividade sobre as bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium*. Esta atividade manifestou-se também, de modo mais moderado, sobre a Gram-negativa, como *Salmonella* Gallinarum. Nestes três agentes causais o tempo de inatividade bacteriana diminuiu quando a concentração do decocto se tornava menor, independente da concentração do inóculo. A atividade antimicrobiana do decocto de *Tagetes minuta* praticamente inexistiu frente a *Escherichia coli*.

Os resultados sugerem que o decocto de *Tagetes minuta* pode ser utilizado como anti-séptico ou desinfetante frente aos agentes utilizados neste estudo. Outros estudos devem ser realizados para melhor compreender-se a ação antimicrobiana de *Tagetes minuta*, investigando os princípios ativos da planta.

SUMMARY

The decoct of *Tagetes minuta* L. - Compositae (Chinchilho) was submitted to serial dilutions *in vitro* for testing with the multiple tubes technique its antimicrobial activities - expressed by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericide Concentration (MBC)-, to different concentrations of Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*) and Gram-negative (*Salmonella* Gallinarum, *Escherichia coli*) bacteria inocula. The statistical analysis showed, for part of decoct concentration / bacterial dilution combinations, that *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Salmonella* had major antimicrobial sensitivity to decoct, demonstrating selective action. *Escherichia* revealed resistance to antimicrobial activities of the decoct, also under 10⁰cfu/ml inoculation levels. These data confirm the antiseptic qualities conferred to *Tagetes minuta* (Chinchilho) decoct by folks. It is possible to use either this product as antiseptic or disinfectant in animal health and production problematic-situations such as lack of resources or social economic exclusion.

UNITERMS: Disinfectants; Antiseptics; Activity; Antiinfective agents; *Tagetes minuta*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AKERELE, O. Medicinal plants and Primary Health Care: an agenda for action. **Fitoterapia**, Milano, v.59, n.5, p.355-63, 1988.
- 2- AVANCINI, C.M.A. **Desinfecção em saúde e produção animal: bacteriostasia e bactericidia de *Baccharis trimera* (Less.) D.C. - Compositae (carqueja) frente a microrganismos entéricos e cutâneos**. Porto Alegre, 1995. 105p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 3- BRASIL: Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Produtos Saneantes Domissanitários. Portaria n.15, de 23 de agosto de 1988: normas para registros dos saneantes domissanitários com ação antimicrobiana. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, v.126, n.170, p.17041-3, 5 set. 1988. Seção I, pt. 1.
- 4- CÁCERES, A.; CANO, O.; SAMAYOA, B.; AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders, 1: screening of 84 plants against enterobacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.30, n.1, p.55-73, 1990.
- 5- CÁCERES, A.; FIGUEROA, A.; TARACENA, A.M.; SAMAYOA, B. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory disease, 2: evaluation of activity of 16 plants against Gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.38, n.1, p.77-82, 1993.
- 6- CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo : Roca, 1988. 148p.
- 7- CARVALHO, D.A.; VILELA, E.A.; OLIVEIRA FILHO, A.T. Plantas herbáceas e subarborescentes ocorrentes na região do Alto Rio Grande, com potencial para regeneração em áreas de depleção de reservatórios de hidroelétricas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.21, n.2, p.129-88, abr./jun. 1997.
- 8- CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1974. 145p.
- 9- **FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil**. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. 1265p.
- 10- GARG, S.C.; DENGRE, S.L. Antibacterial activity of essential oil of *Tagetes erecta* Linn. **Hondustan Antibiotics Bulletin**, Pimpri, v.28, n.1-4, fev./nov., 1986.
- 11- HAGUETE, T.M. **Metodologias qualitativas na sociologia**. 2.ed. Petrópolis : Vozes, 1990. 163p.
- 12- JANSEN, A.M.; SCHEFFER, J.J.C.; SVENDSEN, A.B. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review: aspects of the test methods. **Planta Medica: Journal of the Medicinal Plant Research**, New York, v.55, n.5, p.395-8, 1987.
- 13- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Ludwigshaven : BASF, 1992. v.2, p.355-6.
- 14- MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo : UNESP, 1995. 230p. p.69-86.
- 15- MOREIRA, F. **Plantas que curam: cuide da sua saúde através da natureza**. 5.ed. São Paulo: Hemus, 1996. 256p.
- 16- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Salud para todos en el año 2000: estratégias**. Washington: Oficina Sanitária Panamericana, 1980. 75p. (Documento Oficial, 173).
- 17- POZETTI, G.L.; PIZSOLITTO, A.C.; MANCINI, B.; LOSCHAGIN, E.; MACHADO, A.C. Determinação da atividade antimicrobiana de plantas brasileiras. **Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia**, Araraquara, v.6, p.29-33, 1972.
- 18- RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.23, p.127-49, 1988.
- 19- SCHLIESSER, T. Die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin, 1: zur und über Empfindlichkeit der Testbakterien. **Hygiene Medizin**, Friedberg, v.4, p.51-6, 1979.
- 20- SINGH, B.; SOOD, R.P.; SINGH, V. Chemical composition of *Tagetes minuta* L. oil from Himachal Pradesh (Índia). **Journal Essential Oil Research**, Wheaton, v.4, p.525-6, Sept-Oct., 1992.
- 21- SKINNER, F.A. Antibiotics. In: PAECH, K.; TRACEY, K.V. **Moderne methods of plant analysis**. Berlin: Göttingen Heidelberg, 1955. v.3, p.626-725.
- 22- SOCIEDADE ALEMÃ DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Normas para teste-padrão no controle de desinfetantes químicos em medicina veterinária**. Giessen, s.c.p., 1977. 55p.

Recebido para publicação: 13/11/1998
Aprovado para publicação: 30/11/2000