

GISLAINE APARECIDA PURGATO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E DE
FORMULAÇÃO DE *Salvia officinalis* L. SOBRE ISOLADOS DE
Staphylococcus aureus CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P985a
2019 Purgato, Gislaine Aparecida, 1994-
Atividade antibacteriana de extratos brutos, frações e de
formulação de *Salvia officinalis* L. sobre isolados de
Staphylococcus aureus causadoras de mastite bovina / Gislaine
Aparecida Purgato. – Viçosa, MG, 2019.
xiii, 67 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 58-65.

1. Plantas medicinais. 2. Biofilmes. 3. Sugiol.
I. Universidade Federal de Viçosa. Bioquímica e Biologia
Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Aplicada. II. Título.

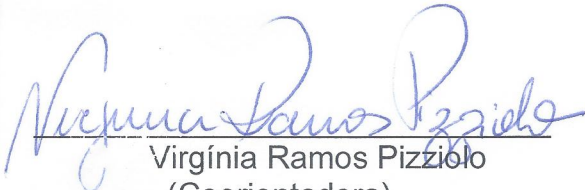
CDD 22. ed. 615.321

GISLAINE APARECIDA PURGATO

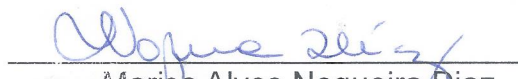
**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E DE
FORMULAÇÃO DE *Salvia officinalis* L. SOBRE ISOLADOS DE
Staphylococcus aureus CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2019.


Virgínia Ramos Pizzolo
(Coorientadora)


Mateus Ferreira Santana


Marisa Alves Nogueira Diaz
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força para enfrentar cada obstáculo da vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Dr.^a Marisa Alves Nogueira Diaz pela oportunidade, orientação, ensinamentos transmitidos, amizade e por acreditar no meu potencial ao longo desses anos.

Ao professor Dr. Sérgio Antônio Fernandes do Departamento de Química da UFV pelas análises de CG-EM.

À professora Dr.^a Maria Aparecida Escatanburgo Moreira pelas células MAC-T cedidas.

Aos professores Dr.^a Virgínia Ramos Pizziolo e Dr. Mateus Ferreira Santana pela participação na banca de dissertação e por contribuir no enriquecimento do trabalho.

Aos meus queridos pais (Valter e Rosilene) pelo amor, carinho e apoio.

Aos meus irmãos (Victor e Vitória) pelo companheirismo, cumplicidade e motivação.

À minha eterna vó Belinha pelo exemplo de sabedoria, fraternidade e mais sincero amor.

Ao doutorando Jefferson Viktor pela amizade e pelas análises de citotoxicidade.

Aos colegas de laboratório pelo auxílio na pesquisa e pelo bom convívio.

Aos amigos que Viçosa me proporcionou ao longo desses anos (Geís, Amanda, Mayara, Ana, Laís, Fernanda, Iorrana e Isabella) agradeço pelo apoio e por cada momento de felicidade que me proporcionaram.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

GISLAINE APARECIDA PURGATO, filha de Valter dos Santos Purgato e Rosilene Ribeiro de Oliveira Purgato, nasceu em Ubá, Minas Gerais no dia 18 de março de 1994.

Em março de 2012 iniciou a graduação em Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em janeiro de 2017 graduou-se com Bacharela em Bioquímica, pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em agosto de 2017 iniciou o mestrado em Bioquímica Aplicada, pela Universidade Federal de Viçosa, na área de Bioprospecção de Produtos Naturais.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O leite e sua importância para a economia.....	3
2.2 Mastite Bovina.....	5
2.3 Produtos Naturais.....	7
2.4 O gênero <i>Salvia</i> e <i>Salvia officinalis</i> L.	9
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo Geral.....	12
3.2 Objetivos Específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Material vegetal.....	13
4.2 Preparo dos extratos vegetais.....	13
4.3 Microrganismos e meio de cultivo.....	13
4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos orgânicos e óleo essencial de <i>Salvia officinalis</i>	14
4.5 Efeito do extrato ativo sobre a formação de biofilme.....	15
4.6 Efeito do extrato ativo sobre o biofilme pré-formado.....	16
4.7 Avaliação da citotoxicidade.....	17
4.8 Perfil cromatográfico do extrato ativo de <i>S. officinalis</i>	19
4.8.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	19
4.8.2 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG- EM).....	19
4.9 Fracionamento cromatográfico do extrato vegetal.....	20
4.10 Preparo da formulação contendo extrato ativo de <i>S. officinalis</i>	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Obtenção dos extratos.....	23

5.2	Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos orgânicos e óleo essencial de <i>S. officinalis</i>	24
5.3	Efeito do extrato ativo sobre a formação de biofilme	27
5.4	Efeito do extrato ativo sobre o biofilme pré-formado	29
5.5	Avaliação da toxicidade do extrato ativo de <i>S. officinalis</i> frente às células do epitélio mamário bovino (MAC-T)	32
5.6	Avaliação do perfil cromatográfico do extrato orgânico ativo de <i>S. officinalis</i>	34
5.6.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	34
5.6.2	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM)	40
5.7	Fracionamento biomonitorado do extrato ativo de <i>S. officinalis</i>	44
5.8	Concentração Inibitória Mínima (CIM) da formulação à base do extrato ativo de <i>S. officinalis</i>	53
5.9	Efeito da formulação à base de <i>S. officinalis</i> sobre o biofilme em formação	54
5.10	Efeito da formulação à base de <i>S. officinalis</i> sobre o biofilme pré-formado	55
6.	CONCLUSÃO	57
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8.	ANEXO	66

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCS	Contagem de Células Somáticas
CG	Cromatografia Gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMT	<i>California Mastite Teste</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EM	Espectro de massas
eV	Elétron volts
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
MAC-T	Células epiteliais mamárias bovinas
MH	<i>Muller Hinton</i>
MTT	Tetrazolium3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo
m/z	Razão massa/carga
nm	Nanômetros
PBS	Tampão salino fosfato
rpm	Rotação por minuto
SBF	Soro fetal bovino
T_R	Tempo de retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFV	Universidade Federal de Viçosa
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
UV	Ultravioleta
WMT	<i>Wiscosin Mastite Teste</i>

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Partes aéreas da <i>Salvia officinalis</i> L.....	10
Figura 2 Fluxograma de extração orgânica das folhas de <i>S. officinalis</i>	23
Figura 3 Avaliação do extrato hexânico de <i>S. officinalis</i> e do antibiótico cefoperazone nas concentrações de 10 a 0,005 mg/mL sobre a viabilidade de células MAC-T.....	33
Figura 4 Cromatograma obtido da análise por CLAE referente ao extrato hexânico das folhas de <i>S. officinalis</i> . Os picos de maiores intensidade numerados de 1 a 8, referem-se aos compostos de maior absorção em 220nm.....	35
Figura 5 Espectro DAD/UV (200 a 400 nm) dos picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 obtidos no cromatograma de CLAE referentes ao extrato hexânico de folhas de <i>S. officinalis</i>	36
Figura 6 Estrutura básica dos flavonoides apresentando a banda I com absorção máxima entre 220-280 nm e banda II com absorção entre 300-350 nm e as classes de flavonoides (flavona e flavonol) que correspondem aos picos 2, 3 e 4.....	37
Figura 7 Compostos pertencentes ao grupo das flavonas e flavonóis descritos com atividade antibacteriana.....	38
Figura 8 Classes de flavonoides correspondentes aos picos 1, 5 e 6 do cromatograma obtido da análise por CLAE referente ao extrato hexânico de <i>S. officinalis</i>	39
Figura 9 Cromatograma do extrato hexânico das folhas de <i>Salvia officinalis</i> obtido pela análise de CG-EM, os picos numerados de 1 a 19 correspondem aos compostos de maiores intensidades no extrato.....	41
Figura 10 Estrutura química de alguns compostos identificados no extrato hexânico de <i>S. officinalis</i>	43
Figura 11 Composto presente na fração ativa F9 em maior proporção.....	45
Figura 12 Cromatograma obtido pela análise de CG-EM da fração ativa F9, os picos numerados de 1 a 6 correspondem aos compostos de maiores intensidades presentes nessa fração.....	48

Figura 13	Cromatograma obtido pela análise de CG-EM das frações ativas F34, F35, F36, F37, F38, F39 e F40.....	49
Figura 14	Estrutura química e espectro de massas obtido do composto sugiol.....	50
Figura 15	Fragmentação proposta para o composto sugiol.....	51
Figura 16	Cromatograma obtido pela análise de CG-EM da fração ativa F41 e F46, os picos numerados de 1 a 4 correspondem aos compostos de maiores intensidades presentes nessas frações.....	52
Figura 17	Concentração inibitória mínima (CIM) da formulação à base do extrato hexânico de <i>S. officinalis</i> sobre as cepas de <i>S. aureus</i> 9000, 8925 e 8907. Poços com coloração azul indicam a presença de bactérias inviáveis e poços com coloração rósea a presença de bactérias viáveis. Controle positivo: cefoperazone. Controle negativo: formulação sem extrato.....	53

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Produção de leite de origem bovina sob inspeção por região: jan-jun (mil litros).....	4
Tabela 2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL) dos extratos orgânicos e óleo essencial de <i>S. officinalis</i> frente aos isolados de <i>S. aureus</i>	25
Tabela 3 Taxa de inibição da formação do biofilme bacteriano na presença do extrato hexânico de <i>S. officinalis</i> nas concentrações de 2CIM, CIM, 1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM	28
Tabela 4 Taxa de redução do biofilme bacteriano pré-formado na presença do extrato hexânico de <i>S. officinalis</i> nas concentrações de 2CIM, CIM, 1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM	31
Tabela 5 Compostos identificados no extrato hexânico de <i>S. officinalis</i> pela análise de CG-EM (tempo de retenção (T_R), razão massa/carga (m/z), fórmula molecular e similaridade com a biblioteca de compostos químicos (%)).....	42
Tabela 6 Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL) das frações obtidas do extrato bruto de <i>S. officinalis</i> frente a <i>S. aureus</i> 8959.....	45
Tabela 7 Solvente eluidor, massa (mg) e concentração inibitória mínima (CIM) das frações bioativas do extrato hexânico de <i>S. officinalis</i>	46
Tabela 8 Compostos identificados pela análise de CG-EM na fração ativa 9 do extrato hexânico de <i>S. officinalis</i>	48
Tabela 9 Composto identificado pela análise de CG-EM nas frações ativas F34, F35, F36, F37, F38, F39 e F40 do extrato hexânico de <i>S. officinalis</i>	49
Tabela 10 Compostos identificados pela análise de CG-EM nas frações ativas F41 e F46 do extrato hexânico de <i>S. officinalis</i>	52
Tabela 11 Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL) da formulação à base de <i>S. officinalis</i> frente aos isolados de <i>S. aureus</i>	54
Tabela 12 Taxa de inibição da formação do biofilme bacteriano na presença da formulação à base do extrato hexânico de <i>S. officinalis</i> nas concentrações de 2CIM, CIM, 1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM.....	55

Tabela 13 Taxa de redução do biofilme bacteriano pré-formado na presença da formulação de *S. officinalis* nas concentrações de 2CIM, CIM, 1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM.....

56

RESUMO

PURGATO, Gislaine Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Atividade antibacteriana de extratos brutos, frações e de formulação de *Salvia officinalis* L. sobre isolados de *Staphylococcus aureus* causadoras de mastite bovina.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Virgínia Ramos Pizziolo, Maria Aparecida Escatanburgo Moreira e Gaspar Diaz Muñoz.

A mastite bovina é uma doença caracterizada pela inflamação do parênquima mamário. A enfermidade é causada principalmente por bactérias, sendo a *Staphylococcus aureus* a mais comum. Atualmente o protocolo de tratamento é a antibioticoterapia, mas o surgimento de estirpes resistentes faz necessário o emprego de novas estratégias terapêuticas. A *Salvia officinalis* L. é utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, antifúngico, antibacteriano e antioxidante. Baseado na necessidade de um tratamento eficaz para mastite e o potencial farmacológico da sálvia, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana dos extratos, frações e de uma formulação de *S. officinalis* sobre diferentes estirpes de *S. aureus* isoladas de animais acometidos com mastite bovina. Nesse trabalho, foram testados três extratos brutos de folhas de sálvia e seu óleo essencial sobre 18 cepas de *S. aureus*. Primeiramente, foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM). Em seguida, foi estabelecido o efeito do extrato ativo sobre a formação e a inibição do biofilme bacteriano já formado, assim como sua toxicidade sobre células epiteliais bovinas (MAC-T). Posteriormente, foi realizado um fracionamento biomonitorado do extrato por cromatografia em coluna. Através da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas foram identificados os compostos responsáveis pela atividade antibacteriana. Os resultados de CIM mostraram o extrato hexânico como o mais ativo, este também foi eficaz para inibição do biofilme e não apresentou alta toxicidade para células MAC-T. O fracionamento biomonitorado demonstrou que os compostos ferruginol e sugiol são os responsáveis pela bioatividade do extrato. A formulação contendo o extrato hexânico de *S. officinalis* a 1,5 mg/mL foi efetiva para inviabilizar as cepas de *S. aureus* testadas. Os resultados sugerem que o extrato de *S. officinalis* seja considerado um promissor fitoterápico para a utilização como agente profilático ou tratamento da mastite bovina.

ABSTRACT

PURGATO, Gislaine Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Antibacterial activity of crude extracts, fractions and formulation of *Salvia officinalis* L. on isolates of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Virgínia Ramos Pizziolo, Maria Aparecida Escatanburgo Moreira and Gaspar Diaz Muñoz.

Bovine mastitis is a disease characterized by inflammation of the breast parenchyma. The disease is mainly caused by bacteria, with *Staphylococcus aureus* being the most common. Currently the treatment protocol is antibiotic therapy, but the emergence of resistant strains requires the use of new therapeutic strategies. *Salvia officinalis* L. is used in folk medicine as anti-inflammatory, antifungal, antibacterial and antioxidant. Based on the need for an effective treatment for mastitis and the pharmacological potential of sage, the present study aimed to evaluate the antibacterial activity of extracts, fractions and a formulation of *S. officinalis* on different strains of *S. aureus* isolated from animals affected with bovine mastitis. In this work, three crude extracts of sage leaves and their essential oil were tested on 18 strains of *S. aureus*. First, the minimum inhibitory concentration (MIC) test was performed. Then, the effect of the active extract on the formation and inhibition of the bacterial biofilm already formed was established, as well as its toxicity on bovine epithelial cells (MAC-T). Subsequently, a biomonitoring of the extract was carried out by column chromatography. Through the gas chromatography coupled to the mass spectrometer the compounds responsible for the antibacterial activity were identified. The MIC results showed the hexane extract as the most active, this was also effective for biofilm inhibition and did not present high toxicity to MAC-T cells. The biomonitoring fractionation showed that the compounds ferruginol and sugiol are responsible for the bioactivity of the extract. The formulation containing the hexane extract of *S. officinalis* at $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ was effective to prevent the *S. aureus* strains tested. The results suggest that *S. officinalis* extract is considered a promising phytotherapeutic for use as a prophylactic agent or treatment of bovine mastitis.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira no Brasil é um dos mais relevantes setores do agronegócio. Esta importância é explicada pelo leite e derivados lácteos serem muito utilizados na nutrição humana e nas indústrias de cosméticos, medicamentos e produtos de higiene pessoal (SABBAG e COSTA, 2015). Apenas no ano de 2017, a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil estimou que a produção de leite gerou um faturamento de R\$ 46,8 bilhões e que mais de 4 milhões de brasileiros trabalham nas indústrias de laticínios ou no campo com a produção primária (ZOCCAL, 2017). Diante dessa realidade da produção leiteira no país é primordial a instituição de um programa de controle de qualidade do leite e a adoção de medidas para combater doenças que afetam tal produção (LANGONI et al., 2013).

Dentre as enfermidades que acometem o rebanho bovino, a mastite bovina é o fator que mais contribui de forma negativa na bovinocultura leiteira. Esta doença é caracterizada por uma inflamação na glândula mamária e promove uma diminuição da secreção do leite, assim como modificações em seus constituintes principais. Atualmente, a elevada ocorrência dos casos de mastite bovina e as perdas econômicas decorrentes, principalmente, da redução da produção e qualidade láctea fazem com que esta doença seja considerada a mais onerosa nas propriedades leiteiras (CARDOZO et al., 2014).

O tratamento utilizado para combater a mastite bovina é baseado no uso de antibióticos. Porém, um fator desfavorável relacionado ao tratamento convencional disponível é que alguns patógenos tornaram-se resistentes aos antimicrobianos. Neste contexto, limitam-se as opções de tratamento e se faz necessária à busca por terapias alternativas. A riqueza de produtos naturais de origem vegetal e suas atividades farmacológicas tem surpreendido a cada dia a comunidade científica. Logo, a busca de novos fitomedicamentos tem sido cada vez mais uma alternativa ao combate das bactérias patogênicas (MUSHTAQ et al., 2017).

A *Salvia officinalis* L. é um arbusto perene pertencente à família Lamiaceae e tem uma longa história de uso na culinária e medicina tradicional. Estudos mostraram uma ampla gama de atividades farmacológicas

para esta planta, incluindo efeitos anticancerígenos, anti-inflamatórios, antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, antivirais e neuroprotetores (VOSOUGHI et al., 2018; JIANG et al., 2017).

Diante dos enormes prejuízos econômicos que acometem o setor agropecuário brasileiro advindo da mastite bovina e a necessidade de um tratamento mais eficaz para doença, a *Salvia officinalis* se mostra como uma planta promissora para uma atividade antimicrobiana contra bactérias causadoras da mastite. Logo, o presente trabalho determinou o potencial antibacteriano da referida planta frente a *S. aureus* causadoras de mastite e estabeleceu através de um fracionamento biomonitorado do extrato quais os compostos estão relacionados a essa atividade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O leite e sua importância para a economia

O leite é um alimento essencial à nutrição humana. Seu grande valor nutritivo está relacionado com a alta concentração de cálcio, vitamina A, B1, B2 e minerais que propiciam um crescimento e a manutenção de uma vida saudável. Além disso, é fonte de proteínas completas, que auxilia na formação e manutenção dos tecidos. Este alimento é produzido em escala mundial e apresenta uma importância não apenas à saúde, mas também na esfera econômica e social em todo o mundo, principalmente nos países considerados em desenvolvimento e em sistemas de agricultura familiar (JUNIOR e JUNG, 2017; EMBRAPA, 2016).

Na agropecuária brasileira, o leite é um dos seis produtos mais relevantes, sendo imprescindível na alimentação humana, na geração de emprego e renda para a população de um modo geral (JUNIOR e JUNG, 2017). Segundo o relatório do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), a produção de leite no Brasil deve ser elevada em 1,8% em 2018, para 23,98 milhões de toneladas se comparada as 23,55 milhões de toneladas de 2017. O aumento da produção se deve não apenas ao consumo interno do país, mas também a necessidade de atender ao mercado externo com lácteos, principalmente com o leite em pó e o leite condensado (ESTADÃO CONTEÚDO, 2017).

Estima-se que dois terços da produção leiteira brasileira sejam utilizados na forma de leite fluido ou de derivados lácteos, como os queijos, iogurtes e manteiga. Em contrapartida, o outro um terço do leite é empregado na indústria de higiene pessoal, medicamentos e cosméticos, e também é ingrediente de vários alimentos como pães, bolos, doces e salgados. Mais de 90 produtos têm o leite ou a proteína do leite na sua composição (ZOCCAL, 2017).

Segundo a Embrapa (2017) 47% do leite produzido no Brasil vem de propriedades de agricultura familiar. A bovinocultura leiteira é a atividade que mais gera emprego no país, mais de 4 milhões de pessoas trabalham diretamente no campo com a produção primária ou então nas indústrias de laticínios. Para 1,2 milhão de brasileiros a renda advinda do leite é o salário do mês. Em 2016, o rendimento com o negócio foi de R\$ 27 bilhões e a cada ano

há um aumento crescente para atender o mercado interno e externo (ZOCCAL, 2017).

No primeiro semestre de 2017, a região Sudeste contribuiu com 40,8% da produção nacional e a região Sul com 35,4%, seguida das regiões Centro-oeste com 13,4%, Nordeste 5,3% e Norte 5,1%. Em comparação com o mesmo período do ano de 2016 houve um aumento de 3,65% na produção total de leite no Brasil (Tabela 1), segundo os indicadores de leite e derivados da Embrapa - gado de leite (2017).

Tabela 1. Produção de leite de origem bovina sob inspeção por região: jan-jun (mil litros).

Classificação	Região	Jan-jun/2016	Jan-jun/2017	Variação
1	Sudeste	4.613.348	4.680.870	1,46%
2	Sul	3.894.141	4.060.131	4,26%
3	Centro-Oeste	1.455.563	1.540.691	5,85%
4	Nordeste	564.371	608.457	7,81%
5	Norte	541.290	582.481	7,61%
Total	Brasil	11.068.713	11.472.630	3,65%

Fonte: IBGE, 2017 (Pesquisa Trimestral do Leite).

A aquisição de leite cru feita pelos estabelecimentos que atuam sob algum tipo de inspeção sanitária (federal, estadual ou municipal), no 2º trimestre de 2018, foi de 5,47 bilhões de litros (IBGE, 2018).

Mesmo com um grande desempenho no mercado mundial, existem alguns fatores que podem diminuir a taxa de produtividade no setor leiteiro no Brasil. Um fator que exerce influência extremamente prejudicial sobre a composição e as características físico-químicas do leite é a mastite bovina. A doença é uma inflamação na glândula mamária e resulta em um aumento na contagem de células somáticas (CCS) no leite. Esse aumento influencia negativamente a composição do leite, na produtividade e a qualidade dos derivados lácteos. A mastite também modifica as gorduras, proteínas e carboidratos, que são os principais constituintes do leite (MÜLLER, 2002).

A perda de produção causada pela mastite bovina pode ser drástica, uma vez que uma doença é de fácil propagação e grande parte do rebanho pode se infectar. A redução na produção do leite pode chegar até 50% e

também há uma queda na qualidade do leite, na vida produtiva da vaca e em casos mais graves a morte precoce dos animais (OLIVEIRA et al., 2011).

2.2 Mastite Bovina

A mastite é definida como a resposta inflamatória resultante da infecção do tecido do úbere e é relatada em numerosas espécies, nomeadamente em animais domésticos leiteiros. Esta doença é mais predominante no gado leiteiro e pode ser potencialmente fatal (GOMES e HENRIQUES, 2016). Os microrganismos causadores dessa patologia invadem e destroem os tecidos produtores de leite. Já foram determinadas cerca de 137 espécies de microrganismos causadores de mastite, incluindo bactérias, leveduras e algas. A doença causa enormes impactos no setor agropecuário, visto que ocorre a redução da produção e da qualidade do leite, mortes e abate precoce das vacas, além dos custos relacionados ao tratamento (MUSHTAQ et al., 2017).

De acordo com a manifestação clínica da doença a mastite é dividida em dois grupos, mastite clínica e subclínica (SIMÕES e OLIVEIRA, 2012). A mastite clínica é caracterizada por apresentar sintomas locais e/ou sistêmicos visíveis e tem importantes efeitos deletérios sobre a produtividade, longevidade e lucratividade do rebanho leiteiro devido à diminuição da produção de leite, diminuição do desempenho reprodutivo, custos associados aos tratamentos e aumento do risco de abate e morte dos animais afetados (FRANCOZ et al., 2017; ASLI et al., 2017). A mastite subclínica não apresenta alterações visíveis na mama e no leite, mas a composição deste produto sofre mudanças consideráveis nos seus elementos, tais como aumento de íons cloro (Cl) e sódio (Na) e diminuição da concentração de caseína, gordura, sólidos totais e lactose do leite, além de ser responsável por aproximadamente 70% a 80% das perdas de leite ocasionadas pela doença. Estima-se que para cada caso de mastite clínica devem existir entre 15 e 40 casos de mastite subclínica, nos rebanhos (SIMÕES e OLIVEIRA, 2012).

O diagnóstico da mastite clínica é geralmente feito de forma visual, uma vez que se têm alterações das características do leite, com o aparecimento de grumos de pus e sangue, verificados no teste da caneca de fundo preto, ao se

examinar os primeiros jatos de leite. Em determinados casos, pode causar inclusive alterações sistêmicas na vaca como hipertermia, úbere quente e edemaciado. Em casos mais graves pode ocorrer até mesmo a gangrena e secagem da glândula (CALLEFE e LANGONI, 2015). Para o diagnóstico da mastite subclínica há necessidade do uso de diagnósticos auxiliares de campo e laboratório a exemplo do Califórnia Mastite Teste (CMT), condutividade elétrica do leite, Wiscosin Mastite Teste (WMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) (SIMÕES e OLIVEIRA, 2012).

Os principais patógenos causadores de mastite são bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. e *Klebsiella* spp. e as espécies Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*. Sendo que a *S. aureus* é conhecida por ser o principal agente etiológico da doença, incluindo mastite clínica e subclínica (SCHABAUER et al., 2018). Além disso, essa espécie apresenta ultraestruturas com inúmeras funções, incluindo a adesão e invasão de células hospedeiras e tecidos, a evasão da resposta imune e formação de biofilme (FOSTER et al., 2014).

As bactérias existem em duas condições de vida básicas: como células planctônicas, também conhecidas como células de vida livre ou como células sésseis, também conhecidas como biofilmes. Este é um consórcio estruturado ligado a uma superfície viva ou inerte formada por células microbianas grudadas umas nas outras e envolvidas por uma matriz polimérica extracelular. A formação de biofilme é considerada uma adaptação de micróbios à ambientes dinâmicos. Evidências experimentais demonstrou que as células bacterianas do biofilme geralmente são mais resistentes aos antibióticos e à defesa imunológica do hospedeiro do que suas contrapartes planctônicas (WU et al., 2015).

A formação de biofilme é complexa, mas, de acordo com diferentes pesquisadores, ocorre em poucos passos comuns. O primeiro passo é o contato inicial/fixação à superfície. Nesta etapa, as células microbianas se fixam à superfície através de seus apêndices, como pílulas e flagelos, e também podem se unir através de forças físicas como as forças de Van der Waals, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Posteriormente ocorre a formação de micro-colônias caracterizadas pelo crescimento e divisão das

células fixas à custa de nutrientes provenientes do líquido circundante, conjuntamente com a produção e excreção de substâncias poliméricas extracelulares. A terceira etapa é maturação e formação da arquitetura do biofilme onde as células microbianas comunicam-se entre si através de sinais auto-indutores. Finalmente, a última etapa da formação do biofilme é o seu descolamento/dispersão. Nesta fase as células microbianas dentro do biofilme realizam rápida multiplicação e se movem para um novo local o que contribui para a disseminação de infecções (JAMAL et al., 2018). A grande maioria dos antibióticos possui ação contra o patógeno, contudo para chegar ao seu local de ação e exercer sua função seria necessário hidrolisar a matriz do biofilme (BAZARGANI e ROHLOFF, 2016).

Atualmente, o protocolo para o tratamento da mastite é a antibioticoterapia (LIU et al., 2014; MUSHTAQ et al., 2016). Este é realizado por via sistêmica ou por via intramamária, sendo o mais comum contra a mastite bovina o tratamento por infusão intramamária de antibióticos. O tratamento é um dos fatores de maior impacto econômico na produção leiteira, representado pelos custos de medicamentos, mão-de-obra e descarte do leite. (OYARZABAL et al., 2011). Outro fator importante relacionado ao tratamento convencional disponível é a resistência adquirida pelas bactérias aos antimicrobianos. Neste contexto se faz necessária a busca por tratamentos alternativos (MUSHTAQ et al., 2017).

2.3 Produtos Naturais

Por milhares de anos, as plantas medicinais têm sido uma valiosa fonte de agentes terapêuticos, e muitas das drogas utilizadas hoje são produtos naturais de plantas ou seus derivados (ATANASOV et al., 2015). A química de produtos naturais sempre teve papel relevante para o desenvolvimento de fármacos, cosméticos, fragrâncias, e outros bioprodutos, dado a diversidade estrutural e grupos funcionais presentes em milhares de substâncias que compõem tanto a biodiversidade terrestre quanto a marítima. Este imenso laboratório químico altamente sofisticado também desempenha um papel importante na conservação e no uso sustentável da diversidade biológica, especialmente por que são essas substâncias essenciais aos processos

biológicos de regulação celular, comunicação química e defesa (BOLZANI, 2016).

Os produtos químicos produzidos pelos mais diversos organismos vivos podem ser divididos em dois grandes grupos. Os primeiros denominados metabólitos primários são aqueles essenciais a todos os seres vivos com funções vitais bem definidas e incluem os lipídeos, proteínas e carboidratos. O segundo grupo de compostos químicos são os metabólitos secundários que são produzidos para garantir a sobrevivência e adaptação das plantas, fungos e bactérias aos mais diversos ambientes. Em geral, apresentam estruturas complexas, atividades biológicas marcantes e, são frequentemente restritos a um grupo reduzido de espécies de um grupo filogenético (SIMÕES et al., 2016).

As principais classes de produtos naturais com potencial atividade biológica são alcaloides, terpenos, flavonoides, cumarinas, quinonas e esteroides. Entre as propriedades medicinais dos produtos, encontram-se propriedades anti-inflamatórias, antitumoral, antioxidante, antibacterianas, antifúngicas, antivirais e vermícidas (FELIPE et al., 2018).

No Brasil, a questão da utilização de plantas e seus princípios ativos para a produção de fitoterápicos e fitofármacos é especialmente importante, uma vez que o país detém a maior parcela da biodiversidade mundial, em torno de 15 a 20% do total, com destaque para as plantas superiores, as quais representam aproximadamente 24% da biodiversidade. As plantas são, dentre os elementos que compõem a biodiversidade, a matéria prima central para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos, já que cerca de 50% dos medicamentos são provenientes direta ou indiretamente de produtos naturais, principalmente das plantas medicinais (BRUNO et al., 2017; LI et al., 2018).

Nesse contexto, os produtos naturais como os de origem vegetal, tem se destacado tanto por apresentarem atividade antibacteriana, como também pela sua capacidade de potencializar a atividade antibiótica. A utilização de extratos, oriundos de fontes naturais, com a finalidade de serem agentes antimicrobianos pode ser uma via importante, já que se tem em vista que os mesmos são dotados de uma reduzida possibilidade de ocasionar resistência microbiana, porque os mesmos são misturas complexas, o que torna a adaptação dos microrganismos difícil (TINTINO et al., 2015).

2.4 O gênero *Salvia* e *Salvia officinalis* L.

Salvia é um dos maiores gêneros da família Lamiaceae, compreendendo cerca de 1000 espécies de ervas aromáticas, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. Os principais centros de diversidade são o Mediterrâneo, a Ásia Central, o México e os Andes. São reconhecidos quatro subgêneros: *Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* e *Calosphace*. Sendo que *Calosphace* é o maior subgênero de *Salvia*, com cerca de 500 espécies (SANTOS, 2018).

Seus representantes possuem caule curto e lenhoso, e flores pequenas de coloração azul a violeta dispostas em inflorescências. Possuem odor intenso, e por isso são classificadas como aromáticas, decorrentes de suas folhas e flores serem ricamente constituídas por óleos essenciais. Em função da constituição fitoquímica, muitas destas espécies são utilizadas como condimentos, na decoração de ambientes, na fabricação de cosméticos e, principalmente, para fins medicinais (MALAQUIAS et al., 2015).

O gênero *Salvia* é responsável pela produção de vários metabólitos secundários de interesse, tais como flavonoides e terpenóides. Estes podem ser voláteis e estarem presentes nos óleos essenciais (monoterpenos e sesquiterpenos) ou fixos, e serem encontrados em extratos (diterpenos, triterpenos, flavonoides e outros compostos fenólicos) (WU et al., 2012; DUARTE e SIEBENROCK, 2016).

Muitas espécies de *Salvia* encontram uso na medicina popular no tratamento de transtornos digestivos, problemas do aparelho respiratório, transtornos hepáticos, febre e problemas de pele, como feridas e urticária, sendo que várias espécies apresentam atividade antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória, anti-alzheimer, anti-hiperglicêmicos, anti-hiperlipidêmicos, antitumoral e cicatrizantes (WU et al., 2012; DUARTE e SIEBENROCK, 2016; SHARIFI-RAD et al., 2018).

Salvia officinalis L. também conhecida como sálvia (ou salvia-comum, sálvia de jardim) é um arbusto perene redondo na família da Lamiaceae (Figura 1). A espécie de *S. officinalis* é nativa do Oriente Médio e Mediterrâneo. Hoje, ela foi naturalizada em todo o mundo, especialmente na Europa e na América do Norte. As partes aéreas de *S. officinalis* tem uma longa história de uso na culinária e medicina tradicional. Seu nome botânico refere-se a suas

propriedades medicinais: Salvia é derivada da palavra latina “Salvare” que significa “curar” (MOREIRA et al., 2013; JIANG et al., 2017).



Figura 1. Partes aéreas da *Salvia officinalis* L.

Baseado em relatos da utilização da *S. officinalis* na medicina tradicional em todo o mundo, pesquisas foram realizadas para comprovar seu grande potencial farmacológico. Esses estudos validaram uma ampla gama de atividades, incluindo efeitos hipoglicemiantes, antimutagênicos, antifúngicos, antibacterianos, antioxidantes, antivirais, imunomoduladores, anti-inflamatórios, anticancerígenos e hipolipemiantes (VOSOUGHI et al., 2018; JIANG et al., 2017; GHORBANI e ESMAEILIZADEH, 2017). Além disso, o efeito fotoprotetor e propriedades melanogênicas também já foram descritas. Nesses ensaios foram observados efeitos positivos sobre as células de queratinócitos humanos após exposições as radiações UVA e UVB, resultando em aumento da viabilidade celular e redução do dano ao DNA (OLIVEIRA et al., 2013).

Os principais fitoquímicos encontrados em flores, folhas e caule de *S. officinalis* são bem identificados. Esses compostos incluem as mais diversas classes de metabólitos secundários, como: quinonas, flavonoides (por exemplo: rutina, quercetina, luteolina, apigenina ácido elágico, ácido rosmarínico, epicatequina, ácido clorogênico), cumarinas, terpenos (por exemplo: monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos), alcaloides, saponinas e heterosídeos cardioativos. Os prevalentes constituintes dos óleos essenciais de sálvia são borneol, cânfora, cariofileno, cineol, humuleno, leveno, linalol, pineno e tujona (GHORBANI e ESMAEILIZADEH, 2017).

O óleo extraído principalmente das folhas de sálvia é amplamente utilizado no tratamento de várias doenças como do sistema nervoso, coração,

circulação sanguínea, sistema respiratório, sistema digestivo, doenças metabólicas e endócrinas (VOSOUGHI et al., 2018; JIANG et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral a avaliação da atividade antimicrobiana de extratos obtidos de folhas de *Salvia officinalis* L. sobre bactérias *Staphylococcus aureus* causadoras de mastite e o fracionamento biomonitorado do extrato mais ativo para determinação do(s) composto(s) responsável por essa atividade.

3.2 Objetivos Específicos

- Preparar os extratos brutos de folhas de *Salvia officinalis* L. com três tipos de solventes orgânicos (hexano, diclorometano e etanol 95%);
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos três extratos vegetais e do óleo essencial de *S. officinalis* frente às cepas de *S. aureus*;
- Avaliar a toxicidade do extrato bruto mais ativo em células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T);
- Avaliar a ação do extrato mais ativo na formação e na inibição do biofilme bacteriano já formado;
- Analisar o perfil cromatográfico do extrato orgânico bioativo;
- Realizar um fracionamento biomonitorado do extrato ativo utilizando a cromatografia em coluna com adsorvente sílica gel;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das frações obtidas frente uma cepa de *S. aureus*;
- Determinar os compostos presentes no extrato e nas frações mais ativas através da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM);
- Preparar uma formulação à base do extrato mais ativo e determinar seu potencial antibacteriano e antibiofilme, *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

A planta *Salvia officinalis* L. foi coletada na primavera no período da tarde no Grupo Entre Folhas – Práticas integrativas da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizada na Vila Gianetti, casa 20 – Campus UFV, Viçosa – MG e posteriormente transportada para o Laboratório de Química e Bioquímica de Produtos Naturais (BioNat) para processamento e preparo dos extratos vegetais. A planta se encontra identificada pelo voucher número 1240 no herbário VIC UFV.

Além dos extratos vegetais, no presente estudo foi testado o óleo essencial de *S. officinalis*. Este por sua vez, foi obtido comercialmente da empresa Empório Laszlo e foi extraído em escala industrial por hidrodestilação a arraste de vapor.

4.2 Preparo dos extratos vegetais

As folhas (720 g) foram separadas das demais partes da plantas e lavadas exaustivamente com água corrente. Estas foram secas a 40 °C em estufa de circulação de ar por 72 h. Em seguida, elas foram trituradas e colocadas em frascos âmbar de 1L juntamente com o solvente extrator hexano. Para o processo de extração foi empregado técnica hifenada de maceração exaustiva e sonicação. Nesse método as folhas ficaram em contato com o solvente extrator por 24 h, em seguida eram submetidos ao banho ultrassônico por 20 min. Posteriormente, o derivado vegetal obtido foi filtrado e concentrado em rota evaporador. Esse processo foi repetido exaustivamente com o solvente hexano, em seguida a metodologia foi empregada com o diclorometano e finalmente com etanol 95%. Os extratos obtidos foram secos a temperatura ambiente até completa evaporação do solvente e armazenados a 4 °C.

4.3 Microrganismos e meio de cultivo

As cepas de *S. aureus* 8959, 8908, 8996, 8925, 9005, 9000, 8907, 8923, 8955, 3008, 3917, 3828, 4125, 4075, 4182, 4158, 8958 e 4157 utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela Embrapa/CNPGL, Juiz de Fora - MG, isoladas de animais com sintomas de mastite bovina. As culturas

bacterianas foram estriadas em placas contendo ágar Mueller Hinton (MH; Himedia®) e mantidas por 16 horas a 37 °C. Para preparo dos estoques cada isolado foi inoculado em 5 mL de caldo de infusão-cérebro-coração (BHI; Himedia®) e mantido em estufa a 37 °C por 16-18 horas. Esse volume foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 850 µL de BHI com adição posterior de 150 µL de glicerol estéril. Os microtubos foram mantidos a - 80 °C. Para determinação da concentração inibitória mínima e da atividade antimicrobiana dos extratos e do óleo essencial foi utilizado meio de cultura Mueller Hinton (MH; Himedia®) e infusão-cérebro-coração (BHI; Himedia®).

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos orgânicos e óleo essencial de *Salvia officinalis*

Os testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados pela metodologia padronizada de microdiluição em caldo, em microplacas de 96 cavidades (CLSI, 2012). Primeiramente, foi realizada uma diluição seriada dos extratos e óleo essencial de sálvia, onde a 100 µL de meio de cultura BHI foram adicionados 100 µL de extrato ou óleo essencial; desta solução, 100 µL foram retirados e homogeneizados com 100 µL de meio de cultura na cavidade seguinte, e assim sucessivamente, obtendo-se uma série de concentrações de extratos e óleo essencial (inicialmente a 10,00 mg/mL) diluída em razão 2 (5,00 mg/mL na segunda cavidade; 2,50 mg/mL na terceira cavidade, e assim sucessivamente). Posteriormente, foram adicionados em cada poço 100 µL de suspensão bacteriana ajustada para concentração final de 10⁶ UFC/mL. Como controle negativo foi utilizado o solvente Polisorbato 80 (TWEEN 80; Sigma®), sem extrato ou óleo essencial na concentração final de 0,1% e como controle positivo foram adicionados 10 µL de cefoperazone (CEFAMIX; SWISSBRAS CHEMICAL LTDA). A CIM do antibiótico (cefoperazone) sobre os isolados foi realizada utilizando o mesmo procedimento.

As microplacas foram mantidas em estufa de crescimento a 37 °C por 24h. Após incubação, foram adicionados 20 µL de resazurina (0,5 mg/mL). As microplacas foram incubadas por mais 2 horas.

A determinação da CIM foi qualitativa e visual, uma vez que os poços com bactérias não viáveis permaneceram com a coloração azul e os poços com bactérias viáveis ficaram com a coloração rósea a transparente. Essa mudança de coloração ocorre, pois, a resazurina é um indicador de reação de óxido-redução. A presença de enzimas oxidoredutases dentro das células viáveis faz com que ocorra uma redução da resazurina (azul) a resofurina que apresenta coloração rosa. Posteriormente, esta é reduzida a hidroresofurina que é incolor (SARKER et al., 2007).

Considera-se o valor do CIM a concentração do material no poço com coloração azul seguido por um poço com crescimento bacteriano (rósea a incolor). Os testes foram realizados em triplicata, e o resultado final foi a média das replicatas seguido do desvio-padrão amostral.

4.5 Efeito do extrato ativo sobre a formação de biofilme

Para a execução deste experimento foram utilizadas as concentrações: 2CIM (Concentração Inibitória Mínima), CIM e as concentrações subinibitórias 1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM para assegurar a efetividade contra o biofilme e não a capacidade bactericida do extrato orgânico mais ativo de *S. officinalis*.

O procedimento foi realizado segundo a metodologia de Stepanovic e colaboradores (2000) com modificações. Em uma microplaca de 96 poços foi adicionado 100 µL de solução do extrato na concentração desejada solubilizado em TWEEN 80 0,1% e BHI. Em seguida, foi adicionado 100 µL de suspensão bacteriana ajustada para concentração final de 10^6 UFC/mL aos orifícios da placa.

Após 24 h a 37 °C, os orifícios das microplacas foram gentilmente lavados 3 vezes com 200 µL de solução salina estéril e secos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µL de metanol em cada poço e permaneceram por 20 minutos. O metanol foi então gentilmente retirado e as placas novamente secas a temperatura ambiente. Posteriormente, 200 µL de cristal violeta 0,5% foram adicionados em todos os poços e deixados por mais 15 minutos. O cristal violeta foi retirado e os orifícios foram lavados 3 vezes com 200 µL de água destilada e, novamente, secos a temperatura ambiente. Finalmente, foram acrescentados 200 µL de etanol 95% em cada poço por 30 minutos.

A formação do biofilme foi medida por absorvância, em um aparelho leitor de ELISA, com comprimento de onda de 590 nm e agitação de 10 segundos. Como controle positivo foi utilizado 100 µL de suspensão bacteriana ajustada para concentração final de 10^6 UFC/mL e 100 µL de BHI e, como controle negativo foi utilizado 200 µL de BHI.

Primeiramente, através da medida de absorvância foi analisada a capacidade de produção de biofilme para cada cepa de *S. aureus* utilizada, comparando-se a densidade óptica do controle positivo e do controle negativo. Para a interpretação dos resultados as cepas foram classificadas da seguinte forma: D.O. (densidade óptica do controle positivo) \leq D.O.c (densidade óptica do controle negativo + 3 x Desvio padrão da média) = não produtora de biofilme, D.O.c < D.O. \leq (2 x D.O.c) = fraca produtora de biofilme, (2 x D.O.c) < D.O. \leq (4 x D.O.c) = moderada produtora de biofilme e (4 x D.O.c) < D.O. = forte produtora de biofilme (STEPANOVIC et al., 2000). Finalmente, a formação de biofilme na presença das diferentes concentrações do extrato ativo de *S. officinalis* foi avaliada comparando-se a densidade óptica do tratamento com o controle. Além disso, foi realizado um controle para analisar a eficácia do antibiótico comercial cefoperazone (CEFAMIX; SWISSBRAS CHEMICAL LTDA) também sobre a formação do biofilme. Este controle foi testado na concentração igual a 0,12 mg/mL, após adição de 10 µL do mesmo em cada poço.

Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, e o resultado final foi a média das replicatas. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA). Os tratamentos foram comparados com o controle pelo teste de Dunnett ($P \leq 0.05$) e entre eles pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.6 Efeito do extrato ativo sobre o biofilme pré-formado

A avaliação do extrato mais ativo sobre a inibição do biofilme pré-formado foi determinada segundo a metodologia descrita por Klein e colaboradores (2015) com algumas modificações. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 100 µL de meio de cultura BHI suplementado com 0,25% de glicose (BHlg) e 100 µL de suspensão bacteriana ajustada para concentração final de 10^6 UFC/mL. A placa foi incubada a 37 °C por 24 horas. Logo após, foi efetuada a leitura de absorvância a 600 nm em leitor de ELISA

para confirmar a presença de crescimento bacteriano no meio de cultura. O sobrenadante foi retirado dos poços cuidadosamente e adicionados 200 µL de BHI juntamente com o extrato ativo nas concentrações 2CIM, CIM, 1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM.

Após 18 horas a 37 °C, o sobrenadante foi novamente retirado e os poços foram gentilmente lavados 3 vezes com 200 µL de solução salina 0,89% estéril e secos a temperatura ambiente. Em seguida, em todos os poços foram adicionados 200 µL de metanol e permaneceram por 20 minutos. O metanol foi então retirado e as placas novamente secas a temperatura ambiente. Após a secagem os poços foram corados com 200 µL de cristal violeta 0,5% por 15 minutos. O cristal violeta foi retirado e seu excesso foi removido lavando-se os poços por 3 vezes com 200 µL de água destilada e, novamente, secos a temperatura ambiente. Finalmente, 200 µL de etanol 95% foram adicionados nos poços e após 30 minutos, foram efetuadas as leituras de absorbância no comprimento de onda de 590 nm com agitação por 10 segundos.

Como controle positivo foi utilizado 100 µL de suspensão bacteriana ajustada para concentração final de 10^6 UFC/mL e 100 µL de BHI e, como controle negativo foi utilizado 200 µL de BHI. A taxa de inibição do biofilme pré-formado na presença das diferentes concentrações do extrato ativo de *S. officinalis* foi avaliada comparando-se a densidade óptica do tratamento com o controle. Além disso, foi efetuado um controle para avaliar a eficácia do antibiótico comercial cefoperazone (CEFAMIX; SWISSBRAS CHEMICAL LTDA) também sobre o biofilme formado. Este controle foi testado na concentração igual a 0,12 mg/mL, após adição de 10 µL do mesmo em cada poço.

Os testes foram realizados em triplicata, e o resultado final foi a média das replicatas. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA). Os tratamentos foram comparados com o controle pelo teste de Dunnett ($P \leq 0.05$) e entre eles pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.7 Avaliação da citotoxicidade

A atividade citotóxica do extrato ativo de *S. officinalis* e também do antibiótico comercial cefoperazone (CEFAMIX; SWISSBRAS CHEMICAL LTDA) foi avaliada microscopicamente por alteração da morfologia celular e

mensurada através do método colorimétrico MTT (tetrazolium3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo).

Neste trabalho, foram utilizadas células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T), cultivadas a 37 °C em atmosfera umedecida e 5% de CO₂. Para o crescimento e manutenção das células foi utilizado o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo penicilina (1,60 mg/mL), estreptomicina (0,40 mg/mL) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF).

Neste ensaio, 100 µL de meio DMEM e células MAC-T na concentração de 1,0x10⁴ células/poço foram distribuídas em microplacas de 96 poços e incubadas a 37 °C durante 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade para adesão das células, restabelecimento do crescimento e início de formação das camadas celulares. Após esse período, as células foram tratadas com soluções de diferentes concentrações (10 a 0,005 mg/mL) do extrato e incubadas novamente em estufa por 72 horas. Os controles deste ensaio foram feitos adicionando apenas o meio de cultura nos poços (100% de células viáveis). As microplacas foram monitoradas por microscopia óptica diariamente.

Após as 72 horas, o meio foi removido, as células foram lavadas com tampão salino fosfato (PBS) pH 7,2 e em cada poço foi adicionado 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL). As placas foram novamente incubadas a 37 °C e atmosfera 5% de CO₂ por 4 h. Posteriormente, a solução de MTT foi removida e adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm.

A viabilidade celular foi calculada para cada concentração testada, conforme a seguinte equação:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{média densidade óptica (células tratadas)}}{\text{média densidade óptica do controle (sem tratamento)}} \times 100$$

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$) com o software estatístico GraphPad Prism version 7.00, GraphPad Software, La Jolla California USA.

4.8 Perfil cromatográfico do extrato ativo de *S. officinalis*

Para determinação dos possíveis compostos presentes o extrato bruto mais ativo de *S. officinalis* foi realizada uma análise do mesmo utilizando duas técnicas cromatográficas: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM).

4.8.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O perfil cromatográfico do extrato bruto bioativo foi determinado com auxílio de CLAE com detectores UV-Vis e DAD Shimadzu Prominence (bomba LC - 20 AD, detector SPD - M 20 A, forno CTO - 20 A, software LabSolutions).

O extrato foi preparado na concentração de 10 mg/mL utilizando como solvente acetonitrila grau HPLC. A solubilização do extrato ocorreu com auxílio de sonicação por 10 min em aparelho Unique® - Ultrasonic cleaner. Com o auxílio de seringas descartáveis (3 mL) e filtros *milipore* (20 µm) foram recolhidos aproximadamente 3 mL do extrato. O volume da primeira passagem no filtro foi descartado e o restante foi transferido para *vials* (1,5 mL), que foram, então, fechados e colocados no injetor automático de amostras do HPLC. O volume da amostra injetado foi de 10 µL.

A coluna utilizada na análise (Shimpack®, 150 mm por 4,6 mm) foi de fase reversa (C-18). As condições de corrida foram: tempo de corrida: 60 min, fase móvel gradiente de 5% a 95% de acetonitrila; fase A: H₂O e fase B: acetonitrila. O fluxo utilizado na corrida cromatográfica foi de 1 mL/min.

Foi realizada a varredura dos picos presentes no cromatograma. As varreduras compreenderam uma faixa de comprimentos de onda de 200 a 400 nm.

4.8.2 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM)

O perfil do extrato ativo também foi analisado através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O extrato foi preparado na concentração de 10 mg/mL utilizando como solvente hexano. A amostra foi filtrada com o auxílio de seringas descartáveis (3 mL) e filtros *milipore* (20 µm).

O volume da primeira passagem no filtro foi descartado e o restante foi transferido para *vials* (1,5 mL), que foram, então, fechados.

Foi utilizado um aparelho da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Ultra, com coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 µm) e hélio como gás de arraste. A injeção ocorreu no modo split (razão 1:10). A temperatura do injetor e da fonte foi de 290 °C. Para a coluna, a temperatura inicial foi de 80 °C por 5 minutos, aumentando até 285 °C, com taxa de 4 °C/minutos e permanecendo nesta temperatura durante 40 minutos. A temperatura na interface do sistema foi de 290 °C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 35 a 700 Da.

A identificação dos compostos presentes no extrato bruto foi realizada através de comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles existentes no banco de dados do aparelho e com os dados da literatura.

4.9 Fracionamento cromatográfico do extrato vegetal

O extrato bruto mais ativo de *S. officinalis* (5 g) foi fracionado por cromatografia em coluna aberta (CC) utilizando como fase estacionária sílica gel 60 GF₂₅₄ (Merck®), e gradiente de solventes como eluentes, na seguinte ordem: hexano; hexano/diclorometano; diclorometano; diclorometano/acetato de etila; acetato de etila; acetato de etila/etanol 99% e metanol. As misturas de solventes foram preparadas em diferentes proporções seguindo uma ordem crescente de polaridade. Frações de 200 mL foram coletadas separadamente, concentradas em evaporador rotatório e armazenadas a 4 °C após completa evaporação do solvente.

A técnica de cromatografia em camada delgada analítica (CCD) foi utilizada para monitoramento das frações obtidas do extrato. Posteriormente a evaporação das frações em rota evaporador, uma pequena quantidade das amostras foi aplicada em placas de CCD (Aldrich®) com auxílio de um tubo capilar de vidro. As placas foram colocadas em cubas de vidro previamente saturadas com a fase móvel (diferentes gradientes de solvente). Após o solvente correr aproximadamente 5,5 cm, as placas foram retiradas da cuba e submetida a câmara escura de luz UV (254 e 365nm) modelo MA-544

(Marconi[®]) e em seguida reveladas com ácido fosfomolibdico P.A ACS (Vetec[®]) diluído em etanol 95% com concentração de 1% m/v.

As frações que apresentaram substâncias (manchas) semelhantes nas análises por CCD foram agrupadas em 52 grupos.

Depois da completa evaporação dos solventes, as frações reunidas foram submetidas ao ensaio de biomonitoramento para determinar em quais delas estavam os compostos responsáveis pela atividade antibacteriana da *S. officinalis*. Para o biomonitoramento foi realizado o teste de concentração inibitória mínima, cuja metodologia está descrita no tópico 4.4. Nesse teste foi utilizada a cepa *S. aureus* 8959.

Para determinação dos compostos majoritários presentes nas frações mais ativas, estas foram submetidas à cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, cujas condições utilizadas foram as mesmas descritas em 4.8.2.

4.10 Preparo da formulação contendo extrato ativo de *S. officinalis*

Foi preparada uma formulação utilizando o extrato ativo de *S. officinalis*, a fim de verificar, *in vitro*, o real potencial terapêutico da sálvia quando incorporada a uma formulação para o tratamento da mastite bovina, por exemplo. A composição e a quantidade dos componentes utilizados foram: glicerina 30 mL, Tween 80 5 mL, água purificada q. s. p. 65 mL e extrato bruto 150 miligramas.

Primeiramente o extrato foi pesado e emulsificado com o Tween 80, logo após essa mistura foi incorporada a água purificada até completa homogeneização. Posteriormente, foi acrescentado o umectante (glicerina). Como controle foi manipulado uma formulação sem o extrato ativo. As soluções foram armazenadas em frasco âmbar para evitar a degradação dos compostos e mantidas sob refrigeração de 2 a 8 °C.

Para determinação da atividade antibiótica da formulação à base do extrato de *S. officinalis* foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM), cuja metodologia está descrita no tópico 4.4. Nesse ensaio foram utilizadas as cepas *S. aureus* 8996, 8955, 9000, 8925, 8958 e 8907 e como controle negativo foi empregado a formulação sem o extrato.

Além disso, foi avaliado o efeito da formulação do extrato de *S. officinalis* sobre a formação do biofilme bacteriano e sobre a redução do biofilme pré-formado, cuja metodologia está descrita nos tópicos 4.5 e 4.6, respectivamente. Nesses ensaios também foram utilizadas as cepas *S. aureus* 8996, 8955, 9000, 8925, 8958 e 8907.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos extratos

As extrações orgânicas das folhas de *S. officinalis* coletadas em outubro de 2017 foram realizadas por três tipos de solventes (hexano, diclorometano e etanol 95%) através da maceração exaustiva juntamente com o banho ultrassônico (Figura 2).

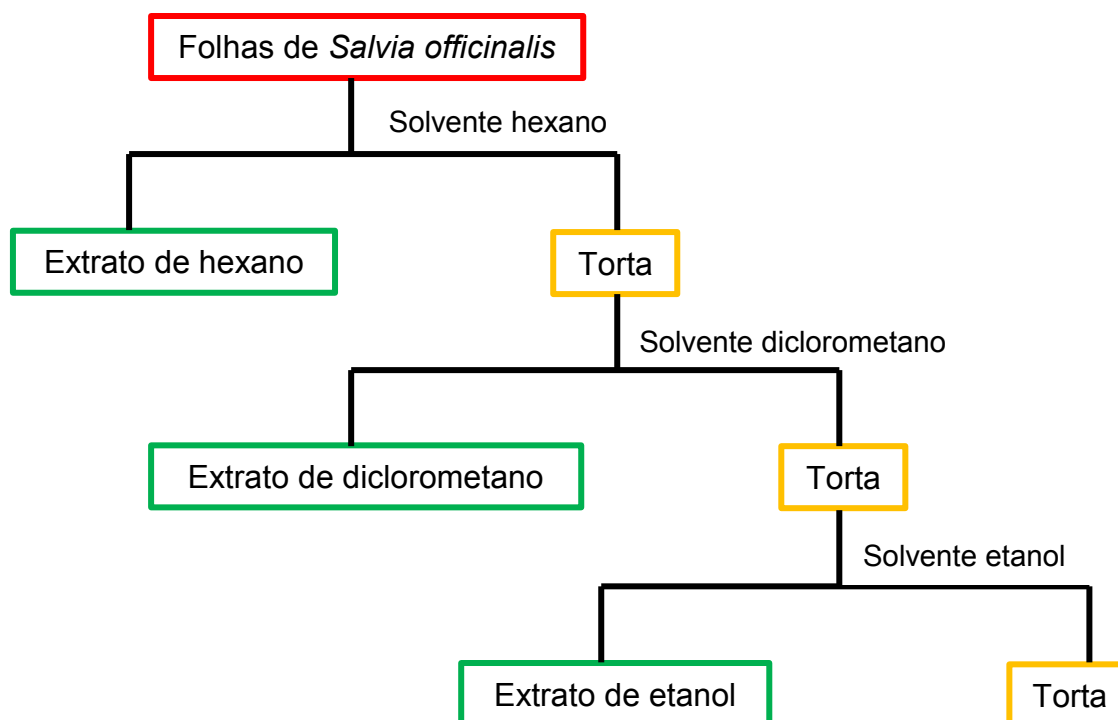


Figura 2. Fluxograma de extração orgânica das folhas de *S. officinalis*.

Foram coletados 720 g de folhas frescas de sálvia e a massa obtida para os extratos foram 18,45 g; 6,84 g e 4,93 g para os solventes hexano, diclorometano e etanol, respectivamente. O que resulta em um rendimento de 2,56% para o extrato de hexano, 0,95% para o extrato de diclorometano e 0,68% para o extrato de etanol considerando o peso das folhas frescas.

O interesse do presente estudo foi realizar uma extração que abrangesse todas as classes de metabólitos secundários presente nas folhas de *S. officinalis*. Para que isso fosse possível foi utilizada a técnica de maceração exaustiva empregando solventes extratores com diferentes polaridades (hexano, diclorometano e etanol).

A maceração exaustiva embora seja um método convencional para extração de compostos orgânicos presentes em plantas apresenta certas limitações como: menor eficiência, baixo rendimento e longo período de extração. Desta forma, para aperfeiçoar o processo também foi empregada a extração assistida por ultrassom. A utilização dessa técnica não convencional permite que o banho ultrassônico produza ondas sonoras que geram cavitação e ruptura das paredes celulares, levando a extração dos compostos da planta para o meio solvente em menor tempo e com maior rendimento (SAFDAR et al., 2017). Sendo assim, visando otimizar o processo de extração, a hifenação das técnicas de maceração exaustiva e sonicação foi escolhida para o preparo dos extratos das folhas de *S. officinalis*.

5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos orgânicos e óleo essencial de *S. officinalis*

Os extratos orgânicos e o óleo essencial de *S. officinalis* foram avaliados para a concentração inibitória mínima (CIM), sendo definida como a menor concentração em que um composto/extrato apresenta inibição da atividade bacteriana. Quanto menores os resultados do composto, melhor a sua atividade antibacteriana, uma vez que se necessita menos do composto para se eliminar uma quantidade fixa de bactérias. Os valores de concentração inibitória mínima foram avaliados e a tabela 2 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL) dos extratos orgânicos e óleo essencial de *S. officinalis* frente aos isolados de *S. aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>	CIM (mg/mL)				
	Extrato Hexano	Extrato diclorometano	Extrato etanol	Óleo essencial	Controle positivo*
8923	0,16 ± 0,0	0,62 ± 0,0	10,00 ± 0,0	0,32 ± 0,0	0,013 ± 0,0
8925	0,16 ± 0,0	1,25 ± 0,0	5,00 ± 0,0	0,32 ± 0,0	0,006 ± 0,0
8959	0,16 ± 0,0	1,25 ± 0,0	10,00 ± 0,0	2,50 ± 0,0	0,013 ± 0,0
8958	0,31 ± 0,0	0,62 ± 0,0	10,00 ± 0,0	0,62 ± 0,0	0,013 ± 0,0
8908	0,31 ± 0,0	1,25 ± 0,0	10,00 ± 0,0	1,25 ± 0,0	0,013 ± 0,0
9000	0,31 ± 0,0	1,25 ± 0,0	10,00 ± 0,0	1,25 ± 0,0	0,013 ± 0,0
8907	0,31 ± 0,0	1,25 ± 0,0	5,00 ± 0,0	1,25 ± 0,0	0,025 ± 0,0
9005	0,31 ± 0,0	0,62 ± 0,0	10,00 ± 0,0	2,50 ± 0,0	0,013 ± 0,0
8955	0,31 ± 0,0	1,25 ± 0,0	10,00 ± 0,0	5,00 ± 0,0	0,025 ± 0,0
3828	0,62 ± 0,0	2,50 ± 0,0	10,00 ± 0,0	2,50 ± 0,0	0,002 ± 0,0
4182	0,31 ± 0,0	2,50 ± 0,0	10,00 ± 0,0	2,50 ± 0,0	0,008 ± 0,0
3008	0,62 ± 0,0	2,50 ± 0,0	10,00 ± 0,0	2,50 ± 0,0	0,002 ± 0,0
3917	0,31 ± 0,0	2,50 ± 0,0	10,00 ± 0,0	2,50 ± 0,0	0,008 ± 0,0
4125	0,31 ± 0,0	1,25 ± 0,0	10,00 ± 0,0	5,00 ± 0,0	0,016 ± 0,0
4075	0,62 ± 0,0	1,25 ± 0,0	10,00 ± 0,0	5,00 ± 0,0	0,004 ± 0,0
4158	0,31 ± 0,0	2,50 ± 0,0	10,00 ± 0,0	2,50 ± 0,0	0,016 ± 0,0
4157	0,31 ± 0,0	2,50 ± 0,0	10,00 ± 0,0	5,00 ± 0,0	0,002 ± 0,0
8996	0,31 ± 0,0	1,25 ± 0,0	10,00 ± 0,0	5,00 ± 0,0	0,006 ± 0,0

*Cefoperazone

De acordo com os dados apresentados na tabela 2, o extrato com maior atividade inibitória foi o extrato hexânico, com valores de CIM variando 0,62 mg/mL a 0,16 mg/mL. Seguido do extrato de diclorometano com CIM entre 2,50 mg/mL e 0,62 mg/mL. O óleo essencial de sálvia apresentou uma baixa atividade inibitória para as cepas de *S. aureus* testadas com CIM de até 5 mg/mL. O extrato etanólico exibiu a menor eficiência antibacteriana com CIM de 10 mg/mL para praticamente todas as cepas utilizadas.

Aligianis e colaboradores (2001) classificaram os extratos quanto a sua capacidade antibacteriana. O trabalho considera que extratos que apresentam um valor de CIM até 0,5 mg/mL como fortes inibidores bacterianos, para valores entre 0,6 mg/mL e 1,5 mg/mL inibidores moderados e valores acima de 1,6 mg/mL os extratos são considerados como fracos inibidores. Conforme essa classificação apenas o extrato hexânico apresentou uma forte inibição para as cepas de *S. aureus* testadas.

O extrato mais ativo de *S. officinalis* foi extraído das folhas utilizando como solvente extrator o hexano. André e colaboradores (2018) descreveram em seu trabalho que o óleo essencial e extratos apolares, por exemplo: extratos hexânicos, são constituídos principalmente por terpenos, terpenóides e, constituintes aromáticos e alifáticos sintetizados a partir do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Li e colaboradores (2013) relataram que flavonoides, triterpenóides e monoterpenos são encontrados nas partes aéreas das plantas de *Salvia*, particularmente nas folhas e flores.

Ghorbani e Esmailizadeh (2017) declaram que o efeito antimicrobiano da *S. officinalis* é atribuído principalmente aos terpenos e compostos terpenóides encontrados nessa espécie. As atividades antibacterianas da cânfora, 1,8-cineol, ácido oleanólico, ácido ursólico e carnosol já foram demonstradas contra *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* e *Klebsiella oxytoca*. Além disso, alguns diterpenos e triterpenos já apresentaram ação inibitória sobre o crescimento de bactérias multirresistentes, como *Enterococcus* ssp resistente à vancomicina e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina.

Desta forma, baseado na constituição química é previsível que o óleo essencial e o extrato hexânico da *S. officinalis* apresentem os menores valores de CIM (ANDRÉ et al., 2018). Essa proposta foi confirmada para o extrato,

porém o óleo essencial apresentou fraca atividade inibitória para praticamente todas as cepas de *S. aureus* testadas. A discrepância dos resultados com os dados da literatura pode ser explicada pela variação da composição química que ocorre devido à diferença de sazonalidade, localização geográfica e até do método escolhido para extração do óleo essencial (FALEIRO e MIGUEL, 2013).

5.3 Efeito do extrato ativo sobre a formação de biofilme

Todas as bactérias isoladas de mastite bovina utilizadas neste trabalho foram submetidas à avaliação da produção de biofilme proposta por Stepanovic e colaboradores (2000) onde se compara as densidades ópticas obtidas para o controle positivo (poços com meio de cultura acrescidos de bactéria) e o controle negativo (poços com apenas meio de cultura). De acordo com essa análise as cepas *S. aureus* 8908, 8955, 8923, 8925, 8996, 8907, 8959, 9000, 9005, 8958, 4182, 3917, 4158, 3008 são fracas produtoras de biofilme. As cepas *S. aureus* 4157, 4075, 3828 são consideradas moderadas produtoras de biofilme, já *S. aureus* 4125 é classificada como forte produtora. Não houve nenhuma estirpe não produtora, logo todas foram analisadas para determinar o efeito do extrato ativo sobre a inibição do biofilme.

O extrato hexânico foi selecionado como o mais ativo, uma vez que este apresentou uma menor concentração inibitória mínima para todas as cepas testadas (Tabela 2). O extrato foi testado nas concentrações 2CIM, CIM, 1/2CIM, 1/4CIM, 1/8CIM, a fim de garantir sua real atividade contra a formação de biofilme nas doses subinibitórias e não sua capacidade bactericida. A tabela 3 mostra a porcentagem de inibição do biofilme para cada cepa testada em todas as concentrações do extrato e do antibiótico comercial (Cefoperazone) na concentração igual a 0,12 mg/mL. Os cálculos foram feitos comparando a densidade óptica do controle positivo, ou seja, considerado 100% de produção de biofilme com os tratamentos.

Tabela 3. Taxa de inibição da formação do biofilme bacteriano na presença do extrato hexânico de *S. officinalis* nas concentrações de 2CIM, CIM, 1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM.

<i>S. aureus</i>	Taxa de inibição do biofilme (%)					
	Concentração do extrato de <i>S. officinalis</i>					Antibiótico
	2CIM	CIM	1/2CIM	1/4CIM	1/8CIM	Cefoperazone (0,12 mg/mL)
8923	91,7 ± 8	55,9 ± 9	29,6 ± 5	7,4 ± 2	0,0 ± 2	52,2 ± 4
8925	89,7 ± 10	49,3 ± 9	25,4 ± 9	5,0 ± 6	0,0 ± 6	47,6 ± 6
8959	96,1 ± 3	52,7 ± 9	24,3 ± 10	13,5 ± 10	0,0 ± 10	62,8 ± 6
8958	78,4 ± 6	43,7 ± 6	27,6 ± 3	6,6 ± 3	0,0 ± 3	88,4 ± 10
8908	100,0 ± 0	40,2 ± 10	26,0 ± 10	3,0 ± 3	0,0 ± 3	38,1 ± 7
9000	96,4 ± 3	61,0 ± 4	23,6 ± 1	4,2 ± 10	0,0 ± 10	30,2 ± 10
8907	80,9 ± 4	56,8 ± 3	25,2 ± 3	5,1 ± 9	0,0 ± 9	20,5 ± 4
9005	89,7 ± 5	44,8 ± 9	20,4 ± 6	11,0 ± 6	0,0 ± 6	46,5 ± 9
8955	100,0 ± 0	79,5 ± 7	71,4 ± 9	69,3 ± 2	68,1 ± 4	47,6 ± 8
3828	90,1 ± 2	40,4 ± 7	33,9 ± 3	9,3 ± 1	0,0 ± 6	54,0 ± 4
4182	97,9 ± 1	55,2 ± 8	27,1 ± 8	2,2 ± 9	0,0 ± 9	38,2 ± 6
3008	97,2 ± 2	49,5 ± 5	28,6 ± 2	28,6 ± 2	14,8 ± 2	44,5 ± 4
3917	85,2 ± 6	66,2 ± 8	46,7 ± 4	52,0 ± 3	36,1 ± 5	47,1 ± 3
4125	98,5 ± 1	88,6 ± 9	28,0 ± 8	16,6 ± 9	0,0 ± 6	81,5 ± 7
4075	92,2 ± 3	85,4 ± 6	76,5 ± 4	15,9 ± 3	0,0 ± 6	73,4 ± 2
4158	89,1 ± 6	85,4 ± 9	43,6 ± 6	10,2 ± 2	0,0 ± 9	54,9 ± 2
4157	96,1 ± 3	67,3 ± 6	24,8 ± 8	16,3 ± 7	0,0 ± 5	49,0 ± 6
8996	78,3 ± 5	37,3 ± 5	24,9 ± 3	18,4 ± 3	0,0 ± 5	35,1 ± 7

De acordo com os resultados apresentados na tabela 3 é possível observar que o extrato hexânico de *S. officinalis* possui uma alta capacidade de inibir a formação do biofilme bacteriano. Na concentração igual a 2CIM o extrato conseguiu inibir até 100% a formação do biofilme para *S. aureus* 8908 e 8955. Na concentração igual a CIM os valores variaram de 37,3% a 88,6% dependendo da cepa de *S. aureus* utilizada. À medida que a proporção do extrato foi diminuindo (1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM) houve uma redução da taxa de inibição, porém é possível observar que mesmo na menor concentração subnibitória testada teve-se uma inibição de 68,1%; 36,1% e 14,8% para as cepas *S. aureus* 8955, 3917 e 3008, respectivamente.

A taxa de inibição do biofilme pelo antibiótico cefoperazone variou de 20,5% (*S. aureus* 8907) a 88,4% (*S. aureus* 8958). É importante ressaltar que o antibiótico foi testado na concentração de 0,12 mg/mL, valor este muito acima da CIM (0,025 mg/mL a 0,002 mg/mL) obtida para as todas as cepas de *S. aureus*. Desta forma, ao se comparar o antibiótico comercial e o extrato hexânico de *S. officinalis* é possível inferir que o extrato apresenta uma maior efetividade na inibição do biofilme bacteriano.

Lee e colaboradores (2013) examinaram a capacidade antibiofilme de 498 extratos vegetais contra cepas de *S. aureus*. Setenta e dois extratos de plantas foram capazes de inibir significativamente a formação do biofilme. Sendo que, o extrato da *Alnus japonica* na concentração de 20 µg/mL inibiu a formação do biofilme em mais de 70%. As análises cromatográficas do extrato demonstraram que a quercetina e o ácido tânico são importantes compostos antibiofilme. Bazzargani e Rohloff (2016) avaliou a capacidade antibiofilme de extratos e óleos essenciais de *Mentha piperita* L., *Coriandrum sativum* L. e *Pimpinella anisum* L. também para *S. aureus* e determinaram que eles impediram a formação em pelo menos 50% do biofilme bacteriano. Os resultados obtidos para *S. officinalis* se apresentam muito próximos com os extratos ativos já descritos na literatura testados para mesma espécie de bactéria.

5.4 Efeito do extrato ativo sobre o biofilme pré-formado

O extrato hexânico obtido das folhas de *S. officinalis* foi avaliado quanto a sua capacidade de inibir o biofilme previamente formado. Além de inviabilizar

as bactérias e impedir a formação do biofilme bacteriano, a busca por um composto/extrato que tenha a capacidade de romper esse biofilme já formado é de extrema importância. O biofilme atua como uma película protetora para as bactérias e para se ter um antibacteriano eficaz tem-se a necessidade de romper essa barreira para então inviabilizar esses microrganismos.

O extrato de *S. officinalis* foi testado nas concentrações de 2CIM, CIM, 1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM para as cepas de *S. aureus*. A tabela 4 mostra a porcentagem de redução do biofilme já formado para as cinco concentrações do extrato e para o antibiótico cefoperazone (0,12 mg/mL).

Tabela 4. Taxa de redução do biofilme bacteriano pré-formado na presença do extrato hexânico de *S. officinalis* nas concentrações de 2CIM, CIM, 1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM.

<i>S. aureus</i>	Taxa de redução do biofilme pré-formado (%)					
	Concentração do extrato de <i>S. officinalis</i>					Antibiótico Cefoperazone (0,12 mg/mL)
	2CIM	CIM	1/2CIM	1/4CIM	1/8CIM	
8923	42,1 ± 10	20,9 ± 10	0,0 ± 7	0,0 ± 5	0,0 ± 4	19,9 ± 10
8925	35,0 ± 9	15,8 ± 7	0,0 ± 4	0,0 ± 4	0,0 ± 8	31,0 ± 10
8959	45,5 ± 10	25,1 ± 10	0,0 ± 7	0,0 ± 10	0,0 ± 10	21,8 ± 9
8958	47,4 ± 5	17,3 ± 10	0,0 ± 9	0,0 ± 6	0,0 ± 8	31,3 ± 9
8908	35,9 ± 1	19,7 ± 4	0,0 ± 7	0,0 ± 10	0,0 ± 2	38,6 ± 4
9000	84,0 ± 10	75,6 ± 10	58,4 ± 10	60,0 ± 10	49,8 ± 10	16,0 ± 3
8907	36,5 ± 10	14,2 ± 9	0,0 ± 10	0,0 ± 10	0,0 ± 10	24,9 ± 10
9005	86,3 ± 10	74,8 ± 10	82,2 ± 9	76,3 ± 9	31,1 ± 5	17,0 ± 3
8955	69,4 ± 10	54,8 ± 9	46,8 ± 4	37,7 ± 10	49,0 ± 7	45,6 ± 9
3828	76,6 ± 8	79,0 ± 8	73,5 ± 3	51,1 ± 1	40,1 ± 7	30,6 ± 5
4182	64,1 ± 8	33,0 ± 10	0,0 ± 10	0,0 ± 9	0,0 ± 7	23,3 ± 10
3008	77,2 ± 3	64,3 ± 3	46,7 ± 10	62,5 ± 7	26,7 ± 3	27,0 ± 10
3917	80,6 ± 3	72,7 ± 3	74,7 ± 5	29,8 ± 11	22,1 ± 8	65,4 ± 4
4125	49,6 ± 10	31,0 ± 1	0,0 ± 9	0,0 ± 10	0,0 ± 9	14,6 ± 5
4075	55,1 ± 10	22,2 ± 6	0,0 ± 10	0,0 ± 1	0,0 ± 7	10,9 ± 8
4158	39,2 ± 6	17,8 ± 9	0,0 ± 6	0,0 ± 4	0,0 ± 2	57,5 ± 9
4157	49,7 ± 7	46,0 ± 5	41,6 ± 10	33,4 ± 10	0,0 ± 3	20,7 ± 10
8996	58,2 ± 10	18,2 ± 10	0,0 ± 10	0,0 ± 5	0,0 ± 8	42,2 ± 10

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 4) é possível notar que para todas as bactérias utilizadas o extrato possui uma diminuição do biofilme nas concentrações 2CIM e CIM. A taxa de redução variou de 86,3% a 35,0% na maior concentração testada (2CIM). Nas concentrações subinibitórias para algumas cepas de *S. aureus* o extrato não apresentou nenhuma atividade contra o biofilme bacteriano já formado. Porém, verifica-se que para cinco cepas testadas a menor concentração (1/8CIM) ainda exibiu uma atividade significativa, chegando até a 49,8% de inibição para a *S. aureus* 9000.

O antibiótico cefoperazone 0,12 mg/mL, concentração esta muito superior aos valores do CIM obtido para todas as cepas *S. aureus*, mostrou uma taxa de inibição de 10,9% a 65,4%. Ao se confrontar os resultados atingidos para o extrato hexânico de *S. officinalis* 2CIM com o antibiótico observa-se uma maior eficácia do extrato contra o biofilme.

Descoberto a mais de 70 anos, os biofilmes bacterianos ainda trazem grandes inquietações nas áreas de alimentação, médica e ambiental. Por serem mais resistentes que as células de vida livre, a eliminação das células sésseis se torna mais difícil. Essa resistência é atribuída principalmente à associação entre as células que permite através da transferência de plasmídeos a aquisição de genes resistentes a antibióticos. Nos últimos anos tem sido observado que o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* formadoras de biofilme tem se tornado difícil, necessitando usar terapias combinadas para sua erradicação (ONSARE e ARORA, 2015). Logo, a pesquisa de antimicrobianos que impeçam ou reduzam a formação de biofilmes bacterianos é de importância estratégica para controle e prevenção de doenças como a mastite bovina (ANDRE, 2015). Sendo assim, os resultados obtidos tanto para impedir a formação do biofilme quanto para inviabilizar o biofilme já formado mostra que o extrato hexânico de *S. officinalis* é promissor para ser utilizado em formulações visando o tratamento de infecções bacterianas.

5.5 Avaliação da toxicidade do extrato ativo de *S. officinalis* frente às células do epitélio mamário bovino (MAC-T)

O potencial citotóxico do extrato hexânico das folhas de *S. officinalis* foi investigado pelo método de redução do sal tetrazólio MTT. A presença do extrato, nas diferentes concentrações estudadas (10 a 0,005 mg/mL), foi

testado quanto a redução da viabilidade das células epiteliais mamárias em cultura no intervalo investigado de 72 horas.

A figura 3 apresenta os resultados da viabilidade celular em diferentes concentrações do extrato e do antibiótico cefoperazone. Estes foram expostos em porcentagem em relação ao controle positivo (100% de viabilidade).

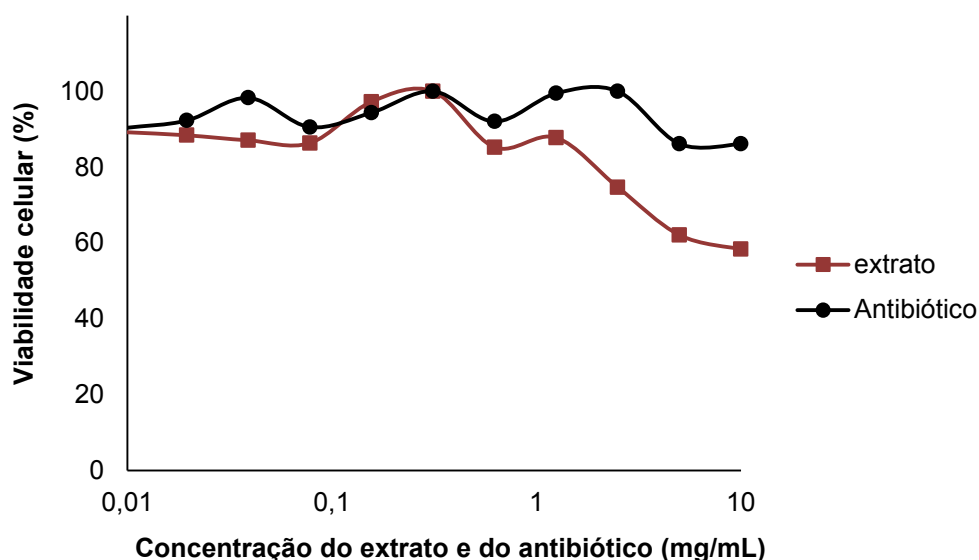


Figura 3. Avaliação do extrato hexânico de *S. officinalis* e do antibiótico cefoperazone nas concentrações de 10 a 0,005 mg/mL sobre a viabilidade de células MAC-T.

A determinação do efeito citotóxico do extrato hexânico de *S. officinalis* em células mamárias bovinas se faz necessário para garantir a segurança em futuros testes *in vivo*. Durante um estudo que vise à busca de um fitofármaco é importante estabelecer a eficácia do mesmo sobre o motivo da doença, bactérias no caso, e também definir se este trará algum malefício sobre o animal que está sendo tratado.

Os resultados obtidos (Figura 3) apontam que as células MAC-T apresentam uma viabilidade superior a 85% na presença do extrato ativo de sálvia até a concentração de 1,5 mg/mL, sendo, uma faixa segura para se trabalhar sem trazer prejuízos ao animal. Em concentrações mais elevadas, por exemplo, entre 5 e 10 mg/mL o extrato já apresenta uma toxicidade inviabilizando cerca de 40% das células epiteliais mamárias bovinas. Embora se tenha uma toxicidade em altas concentrações do extrato é pertinente

ressaltar que nas concentrações necessárias eliminar as bactérias e o biofilme bacteriano são gastos cerca de 0,6 mg/mL, valor este que não traz danos para as células.

A viabilidade celular variou de 100% a 86,1% para o antibiótico ceforepazone entre 0,01 e 10 mg/mL ou seja, ele apresentou uma baixa toxicidade para células MAC-T.

Valiyari e colaboradores (2013) avaliaram a atividade citotóxica do extrato metanólico de folhas de *S. officinalis* sobre células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) e os resultados mostraram que o extrato (0,8 mg/mL) não inibiu significativamente a proliferação de células HUVEC normais. Resultados estes muito próximos aos obtidos nesse estudo com o extrato hexânico utilizando a linhagem MAC-T.

5.6 Avaliação do perfil cromatográfico do extrato orgânico ativo de *S. officinalis*

O perfil cromatográfico do extrato hexânico de *S. officinalis* obtidos através da CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e do CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas) trouxe considerações quanto à composição química do extrato. A seguir estão apresentados os resultados obtidos pelas duas técnicas.

5.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise do cromatograma obtido do extrato ativo de sálvia (Figura 4) permitiu identificar vários picos e com destaque para os picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

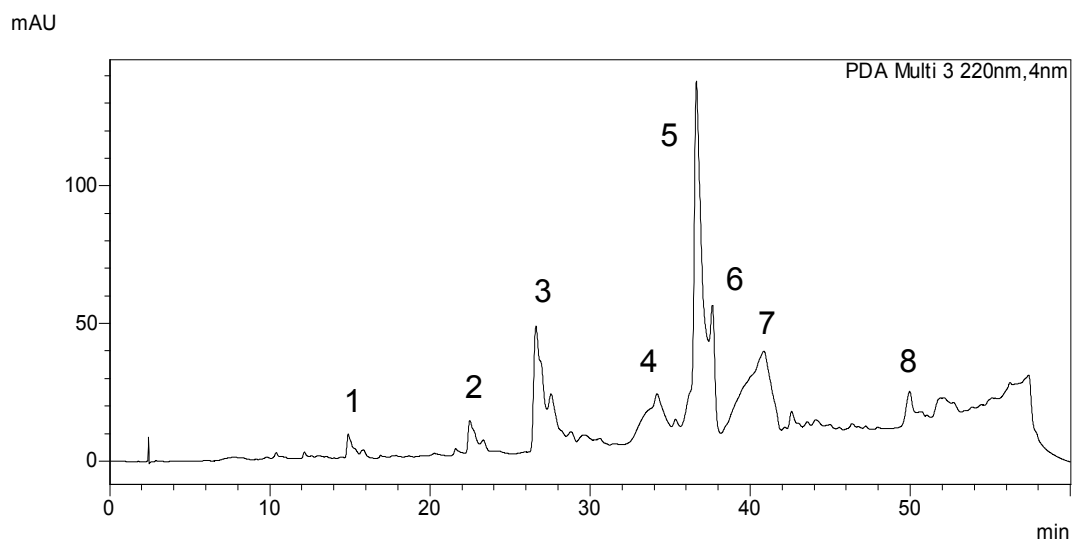


Figura 4. Cromatograma obtido da análise por CLAE referente ao extrato hexânico das folhas de *S. officinalis*. Os picos de maiores intensidade numerados de 1 a 8, referem-se aos compostos de maior absorção em 220nm.

Para determinar as possíveis classes de compostos presentes no extrato foi realizada uma varredura (espectro UV) dos picos de maior intensidade numerados de 1 a 8 (Figura 5).

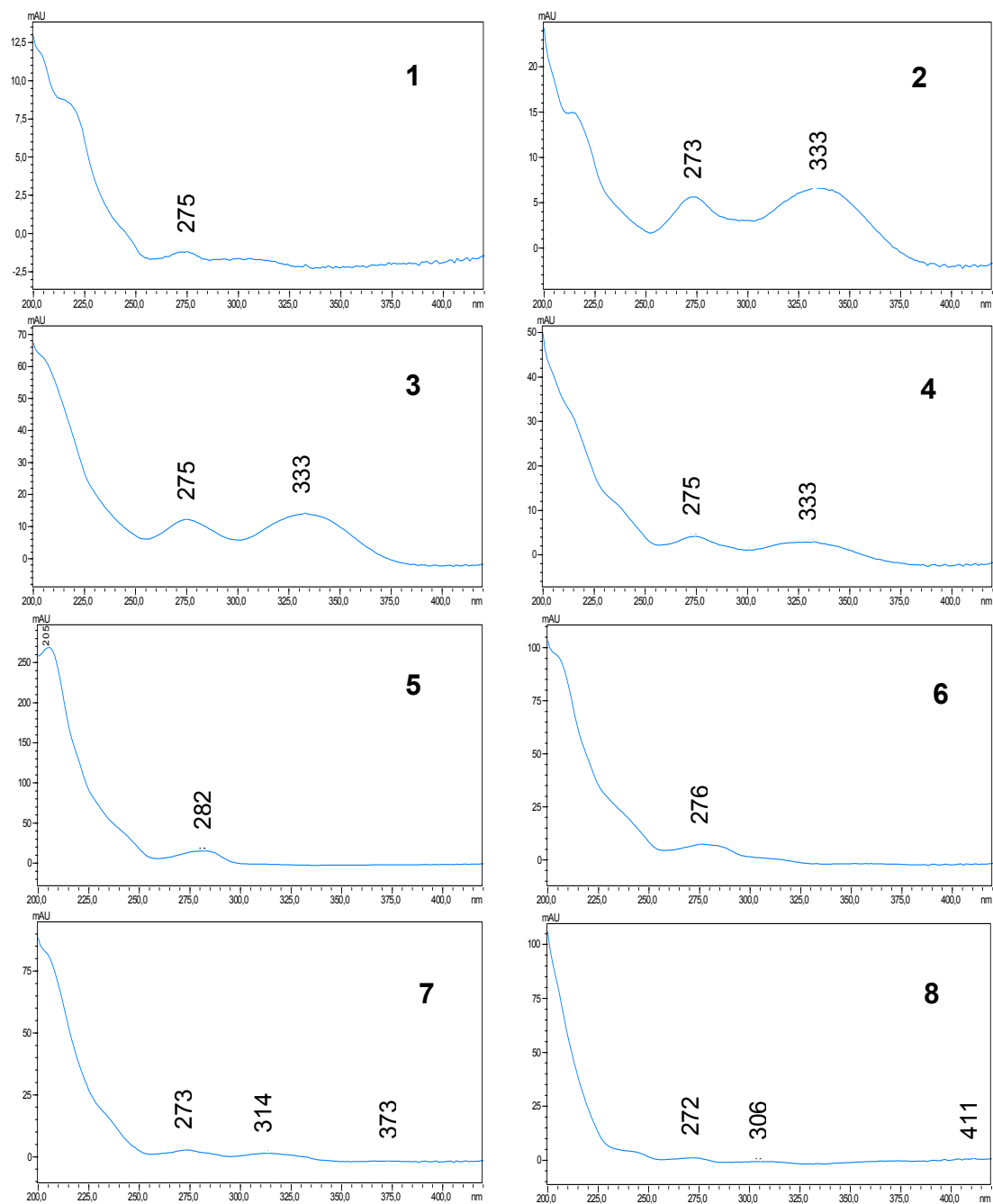


Figura 5. Espectro DAD/UV (200 a 400 nm) dos picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 obtidos no cromatograma de CLAE referentes ao extrato hexânico de folhas de *S. officinalis*.

O perfil de absorção nos espectros de ultravioleta dos picos 2, 3 e 4 (Figura 5) sugerem a presença de flavonoides dos grupos das flavonas e flavonóis, onde se pode observar a banda II com uma absorção máxima entre 220-280 nm que corresponde à porção benzoíla do anel flavonoídico e a banda

I com absorção máxima igual 300-350 nm correspondente à porção cinamoila, conforme demonstrado na figura 6.

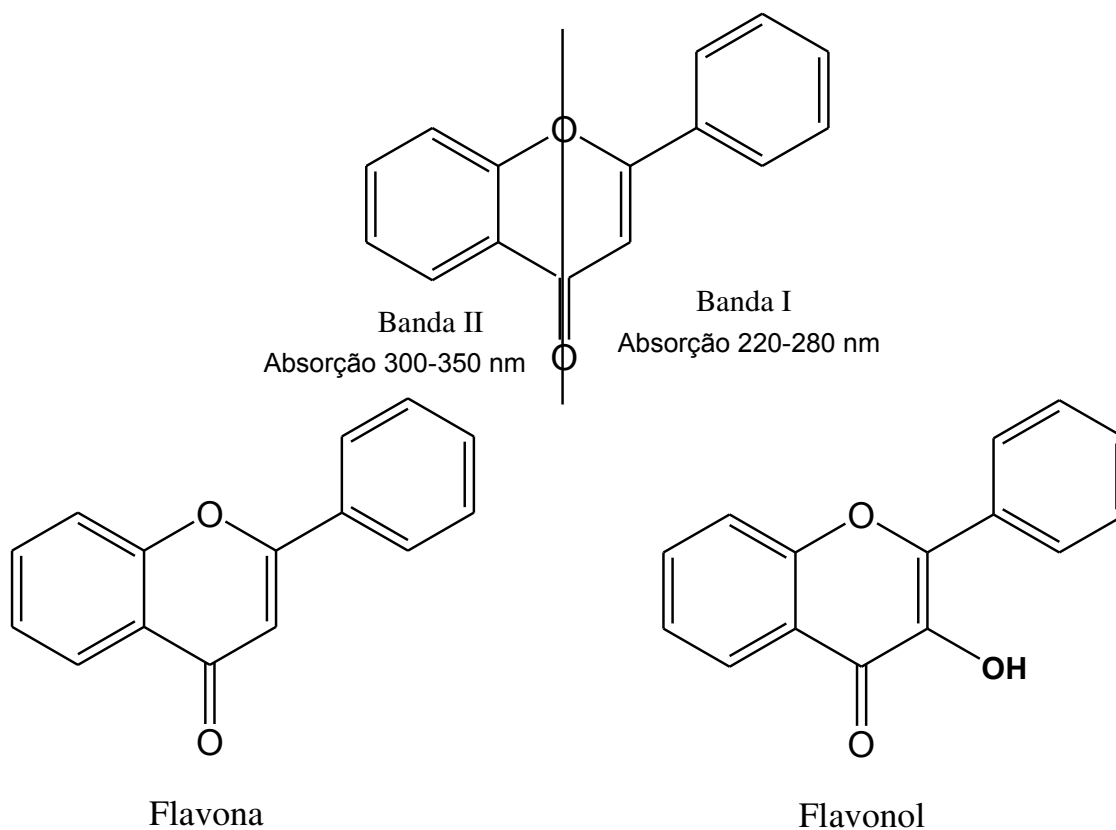
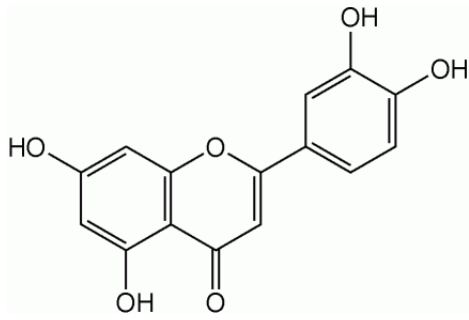


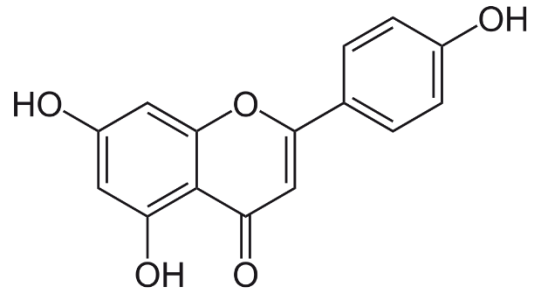
Figura 6. Estrutura básica dos flavonoides apresentando a banda I com absorção máxima entre 220-280 nm e banda II com absorção entre 300-350 nm e as classes de flavonoides (flavona e flavonol) que correspondem aos picos 2, 3 e 4.

A presença dessa classe de metabólitos secundários corrobora com os dados da literatura (GHORBANI e ESMAEILIZADEH, 2017) onde se descreve que atividade antibacteriana observada no extrato de *S. officinalis* possa estar associada à existência de flavonoides como quercetina, apigenina, luteonina e rutina (Figura 7) que pertencem a classe das flavonas e flavonóis.

Flavona

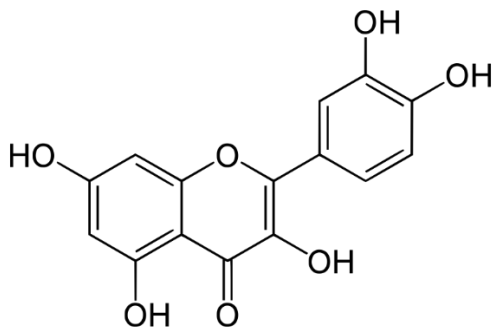


Luteonina

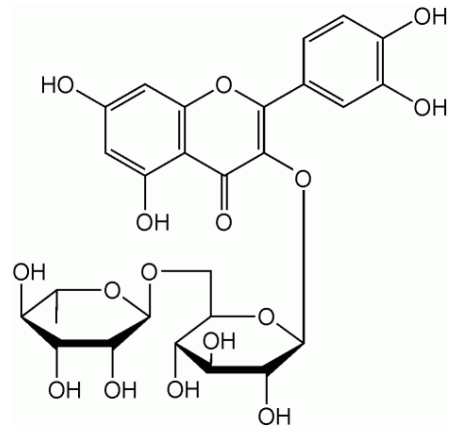


Apigenina

Flavonol



Quercetina

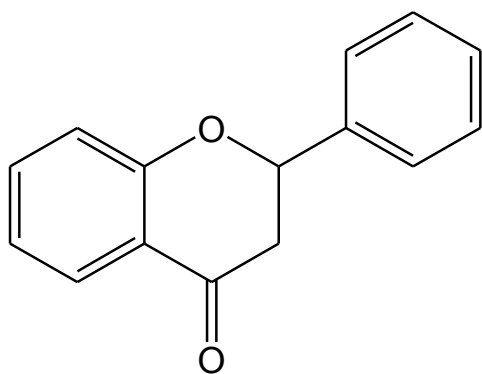


Rutina

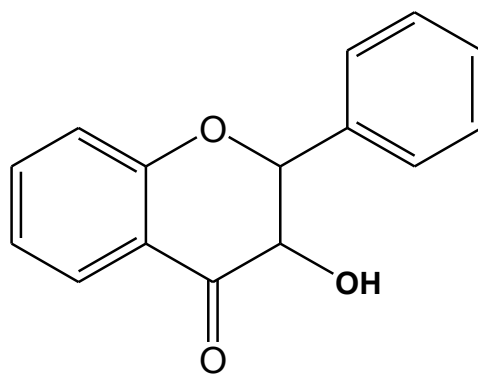
Figura 7. Compostos pertencentes ao grupo das flavonas e flavonóis descritos com atividade antibacteriana.

Já o perfil de absorção nos espectros de ultravioleta dos picos 1, 5 e 6 (Figura 5) sugerem a presença de flavonoides dos grupos das flavanonas, flavanonóis, isoflavonas, chalconas, diidrochalconas, flavan-4-ol e flavanas (Figura 8), onde se pode observar a banda II com absorção máxima igual a 220-280 nm que corresponde à porção benzoíla do anel flavonoídico (MABRY et al., 1970).

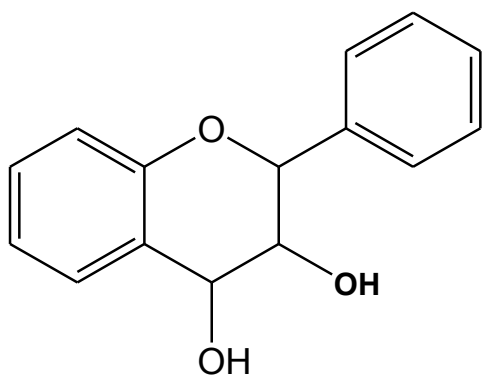
A absorção nos espectros de ultravioleta dos picos 7 e 8 não sugerem a presença de flavonoides.



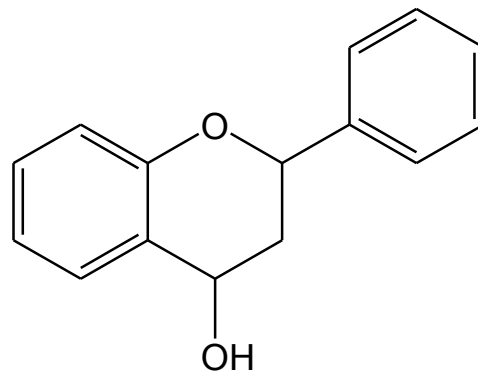
Flavanona



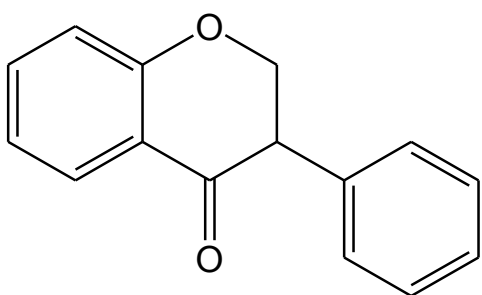
Flavanonol



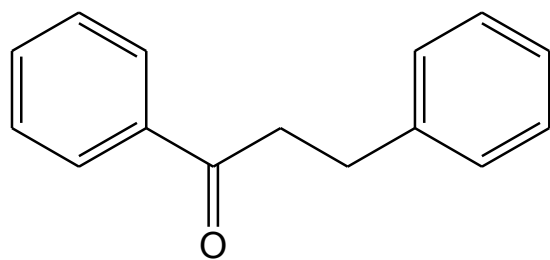
Flavana 3,4 diol



Flavan-4-ol



Isoflavanona



Diidrochalconas

Figura 8. Classes de flavonoides correspondentes aos picos 1, 5 e 6 do cromatograma obtido da análise por CLAE referente ao extrato hexânico de *S. officinalis*.

5.6.2 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM)

O extrato hexânico das folhas de *S. officinalis* foi analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). A partir da análise do cromatograma (Figura 9) é possível visualizar vários picos (compostos) de diferentes intensidades. Com base nos tempos de retenção (T_R) e nos espectros de massas (razão massa/carga e fragmentações) dos picos mais abundantes foi possível determinar os prováveis compostos presentes no extrato de *S. officinalis*. A definição dos compostos presentes na amostra foi feita ao se confrontar os resultados da análise de CG-EM com bancos de dados de compostos químicos e informações da literatura. A tabela 5 apresenta o tempo de retenção, massa, fórmula molecular, intensidade do pico e a similaridade do referido composto com bases em dados da literatura. A figura 10 apresenta a estrutura de alguns desses compostos.

O composto 9 (quercetina 7,3',4'-trimethoxi) corrobora com os dados encontrados no perfil do extrato hexânico de *S. officinalis* submetido ao CLAE, onde o perfil de absorção nos espectros de ultravioleta 2, 3 e 4 (Figura 5) sugerem a presença de flavonoides dos grupos das flavonas e flavonóis.

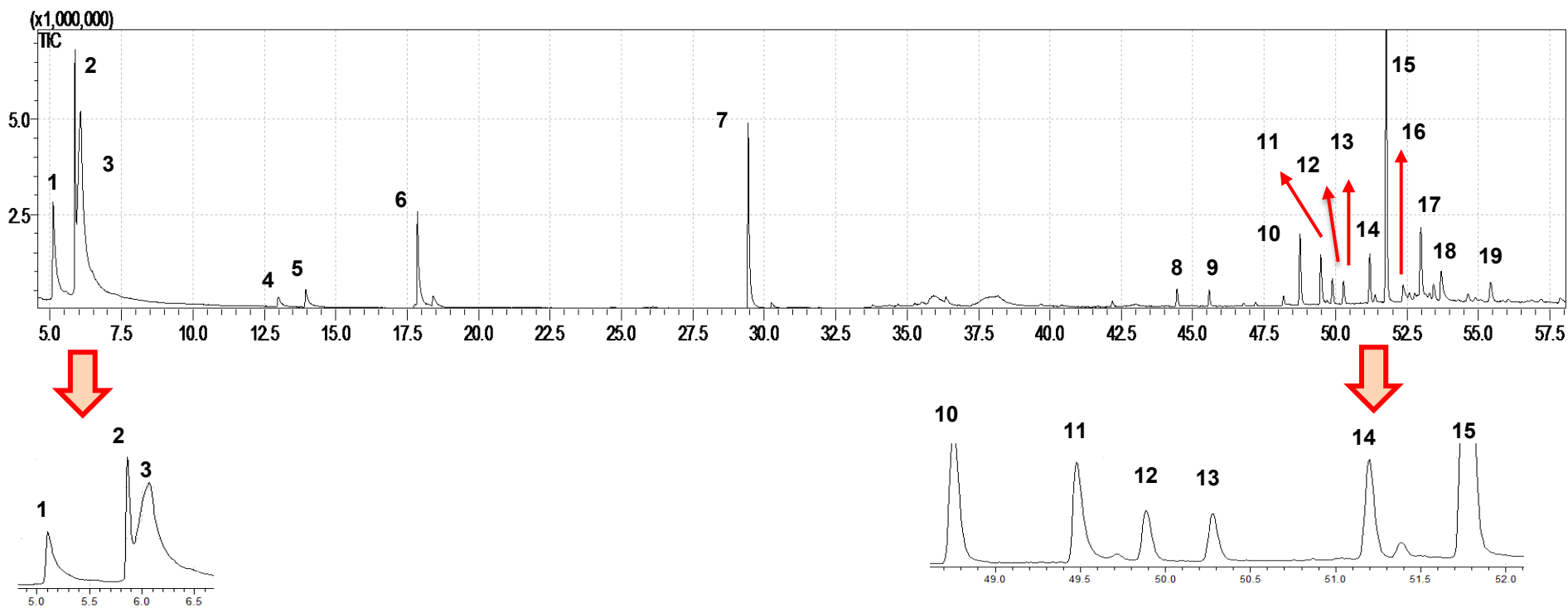


Figura 9. Cromatograma do extrato hexânico das folhas de *Salvia officinalis* obtido pela análise de CG-EM, os picos numerados de 1 a 19 correspondem aos compostos de maiores intensidades no extrato.

Tabela 5. Compostos identificados no extrato hexânico de *S. officinalis* pela análise de CG-EM (tempo de retenção (T_R), massa, fórmula molecular, intensidade do pico e similaridade com a biblioteca de compostos químicos (%)).

Número do pico	Nome do composto	T_R (min)	Massa	Fórmula molecular	Intensidade (%)	Similaridade (%)
1	α -Tujona	5,1	152	$C_{10}H_{16}O$	2,7	89
2	Cânfora	5,9	152	$C_{10}H_{16}O$	6,8	92
3	Ácido n-hexanóico	6,08	144	$C_8H_{16}O_2$	52,2	96
4	Farnesol	12,99	222	$C_{15}H_{26}O$	3,5	74
5	Linalol	13,94	154	$C_{10}H_{18}O$	5,6	76
6	Globulol	17,86	222	$C_{16}H_{16}O$	25,8	92
7	Óxido de cariofileno	29,41	220	$C_{15}H_{24}O$	47,4	84
8	Geranil linalol	44,45	290	$C_{20}H_{34}O$	5,2	78
9	Quercetina 7,3',4'-trimethoxi	45,60	344	$C_{18}H_{16}O_7$	5,6	89
10	2-metil-hexacosano	48,82	380	$C_{27}H_{56}$	17,8	85
11	Vitamina E	49,50	430	$C_{29}H_{50}O_2$	15,0	79
12	3-metilenicosano	49,92	310	$C_{22}H_{46}$	7,3	79
13	Heptacosano	50,27	380	$C_{27}H_{56}$	7,0	88
14	Nonacosano	51,22	408	$C_{29}H_{60}$	6,6	94
15	2-metiloctacosano	51,82	408	$C_{29}H_{60}$	75,1	95
16	Fucosterol	52,41	414	$C_{29}H_{50}O$	5,9	85
17	Eritrodiol	52,97	442	$C_{30}H_{50}O_2$	22,0	78
18	Acetato de lupeol,	53,72	468	$C_{32}H_{52}O_2$	7,8	85
19	Lupeol	55,45	426	$C_{30}H_{50}O$	7,1	85

5.7 Fracionamento biomonitorado do extrato ativo de *S. officinalis*

O extrato hexânico de *S. officinalis* foi submetido ao fracionamento utilizando a cromatografia em coluna (CC) com fase estacionária sílica gel e, gradiente de eluentes como fase móvel. A fase móvel foi empregada seguindo uma ordem crescente de polaridade. Primeiramente foi utilizado um solvente menos polar (hexano) de forma a eluir todos os compostos que tivessem características químicas semelhantes a este, posteriormente a polaridade foi aumentando com a adição de diferentes proporções de hexano/diclorometano; diclorometano; diclorometano/acetato de etila; acetato de etila; acetato de etila/etanol 99% até metanol (mais polar). Esse procedimento garantiu a eluição dos compostos presentes no extrato bruto, abrangendo uma ampla escala de polaridade.

Foram coletadas 342 frações de 200 mL cada, sendo estas concentradas em rota evaporador. Posteriormente, utilizando a técnica de cromatografia em camada analítica (CCD), as frações que apresentaram substâncias (manchas) semelhantes foram reunidas em 52 grupos.

Para determinação das frações bioativas foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM) com todos os grupos. Nesse teste foi utilizada como indicador de atividade a cepa *S. aureus* 8959. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 6.

Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL) das frações obtidas do extrato bruto de *S. officinalis* frente a *S. aureus* 8959.

Fração do extrato bruto (F)	CIM (mg/mL)
F1 à F8	2,000 ± 0,0
F9	0,015 ± 0,0
F10 à F18	2,000 ± 0,0
F19 à F27	1,000 ± 0,0
F28 à F32	0,500 ± 0,0
F33	0,250 ± 0,0
F34 à F40	0,015 ± 0,0
F41	0,030 ± 0,0
F42	0,250 ± 0,0
F43 à F45	0,120 ± 0,0
F46	0,030 ± 0,0
F47 à F52	2,000 ± 0,0

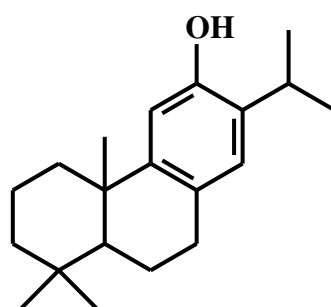
De acordo com os resultados obtidos, as frações que apresentaram um valor de CIM pelo menos 10 vezes inferior ao extrato hexânico foram escolhidas como as frações bioativas. A seguir (Tabela 7) está representado o solvente utilizado como fase móvel na cromatografia em coluna para eluição, a massa e a CIM dessas frações.

Tabela 7. Solvente eluidor, massa (mg) e concentração inibitória mínima (CIM) das frações bioativas do extrato hexânico de *S. officinalis*.

Fração (F)	Solvente eluidor	Massa (mg)	CIM (mg/mL)
F9	Hexano/diclorometano (9:1)	18,1	0,015 ± 0,0
F34	Diclorometano/acetato de etila (6:4)	52,8	0,015 ± 0,0
F35	Diclorometano/acetato de etila (6:4)	66,3	0,015 ± 0,0
F36	Diclorometano/acetato de etila (4:6)	71,8	0,015 ± 0,0
F37	Diclorometano/acetato de etila (4:6)	84,5	0,015 ± 0,0
F38	Diclorometano/acetato de etila (4:6)	211,4	0,015 ± 0,0
F39	Diclorometano/acetato de etila (4:6)	102,9	0,015 ± 0,0
F40	Diclorometano/acetato de etila (2:8)	47,8	0,015 ± 0,0
F41	Diclorometano/acetato de etila (2:8)	81,8	0,030 ± 0,0
F46	Acetato de etila/etanol (8:2)	50,1	0,030 ± 0,0

As frações ativas foram submetidas à cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) para determinar se existe um composto em comum a todas que possa ser o responsável pela atividade antibacteriana do extrato de *S. officinalis*.

De acordo com o resultado obtidos da análise dos cromatogramas das 10 frações, verificou-se que na fração ativa 9 foram identificados 6 compostos, sendo 3 deles em maior concentração. O composto 3 identificado com ferruginol (Figura 11 e 12, Tabela 8) é um diterpenóide que apresenta um forte efeito antimicrobiano. A atividade antibacteriana do ferruginol foi relatada contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (LI et al., 2008; MOTHANA et al., 2018; PASSOS et al., 2018). Desta forma, o ferruginol é provavelmente um dos compostos responsáveis pelo efeito antibacteriano dessa fração.



Ferruginol

Figura 11. Composto presente na fração ativa F9 em maior proporção.

No cromatograma das frações ativas F34, F35, F36, F37, F38, F39 e F40 (Figura 13, Tabela 9) observou-se somente um pico que foi atribuído de acordo com a biblioteca do aparelho CG/MS ao composto sugiol, cujo espectro de massas e a fragmentação proposta podem ser vistos nas figuras 14 e 15. O sugiol é um composto diterpênico derivado diretamente do ferruginol (WANG et al., 2002) e apresenta ação antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* resistente à metilicina (LI et al., 2008; MOTHANA et al., 2018; NETO et al., 2015).

Neto e colaboradores (2015) mostraram que a presença do grupo hidroxila em C-12 presente no ferruginol e a carbonila adicional presente em C-7 no sugiol é responsável por aumentar a atividade antimicrobiana desses terpenos. A semelhança estrutural entre esses compostos corrobora para que o ferruginol seja o composto ativo na fração 9.

Nas frações ativas F41 e F46 foram identificados 4 compostos (Figura 16, Tabela 10). Embora o sugiol esteja presente em menor intensidade nessas frações, ele também é possivelmente o responsável pela atividade antibacteriana, uma vez que não foi relatado na literatura nenhum efeito antimicrobiano para os demais compostos.

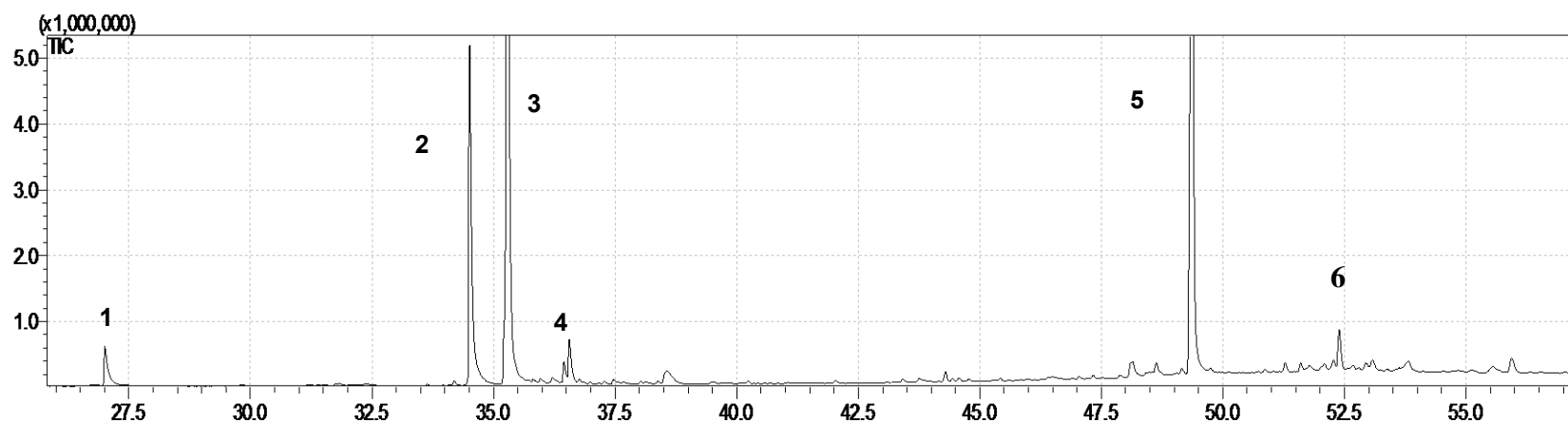


Figura 12. Cromatograma obtido pela análise de CG-EM da fração ativa F9, os picos numerados de 1 a 6 correspondem aos compostos de maiores intensidades presentes nessa fração.

Tabela 8. Compostos identificados pela análise de CG-EM na fração ativa 9 do extrato hexânico de *S. officinalis*.

Número do pico	Nome do composto	Massa	Fórmula molecular	Tempo de retenção (min)
1	Globulol	222	$C_{15}H_{26}O$	26,99
2	Sclarenol	272	$C_{20}H_{32}$	34,58
3	Ferruginol	286	$C_{20}H_{30}O$	35,29
4	Epiglobulol	222	$C_{15}H_{26}O$	36,56
5	Vitamina E	430	$C_{29}H_{50}O_2$	49,35
6	Lupeol	426	$C_{30}H_{50}O$	52,13

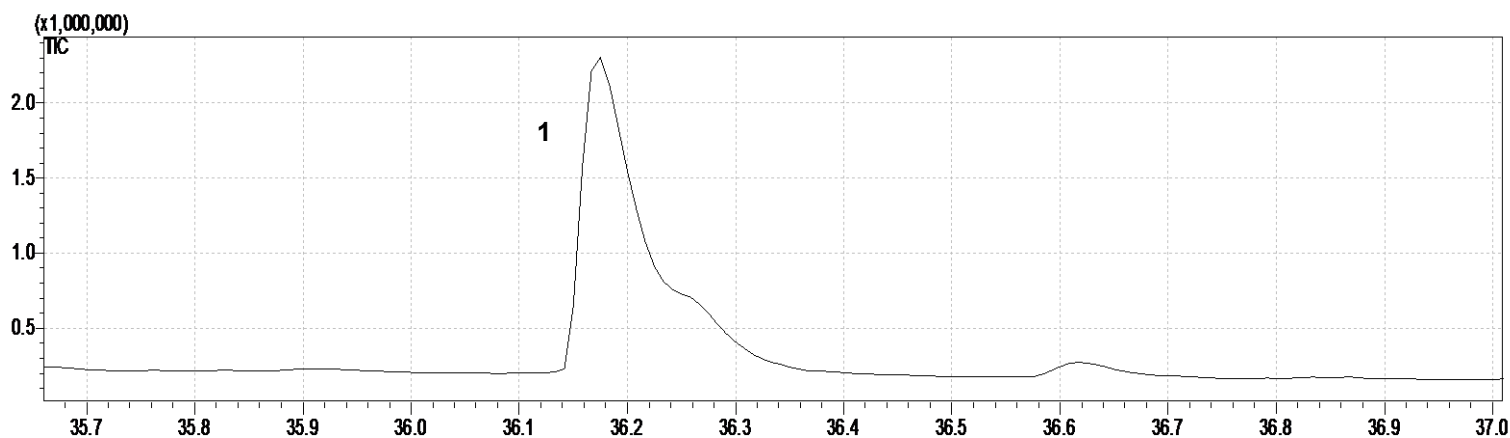
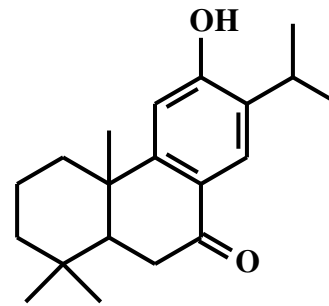


Figura 13. Cromatograma obtido pela análise de CG-EM das frações ativas F34, F35, F36, F37, F38, F39 e F40.

Tabela 9. Composto identificado pela análise de CG-EM nas frações ativas F34, F35, F36, F37, F38, F39 e F40 do extrato hexânico de *S. officinalis*.

Número do pico	Nome do composto	Massa	Fórmula molecular	Tempo de retenção (min)
1	Sugiol	300	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	36,17



Sugiol

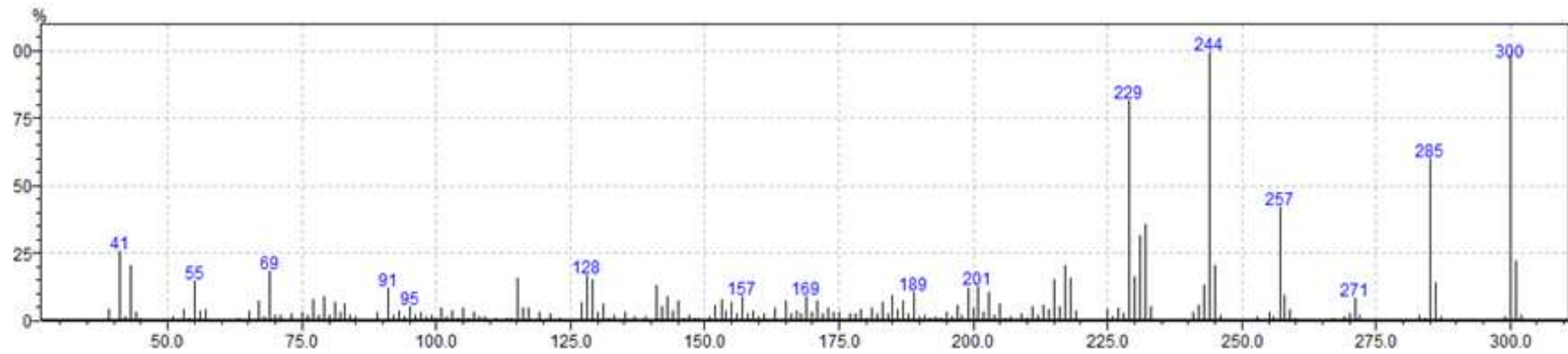


Figura 14. Estrutura química e espectro de massas obtido do composto sugiol.

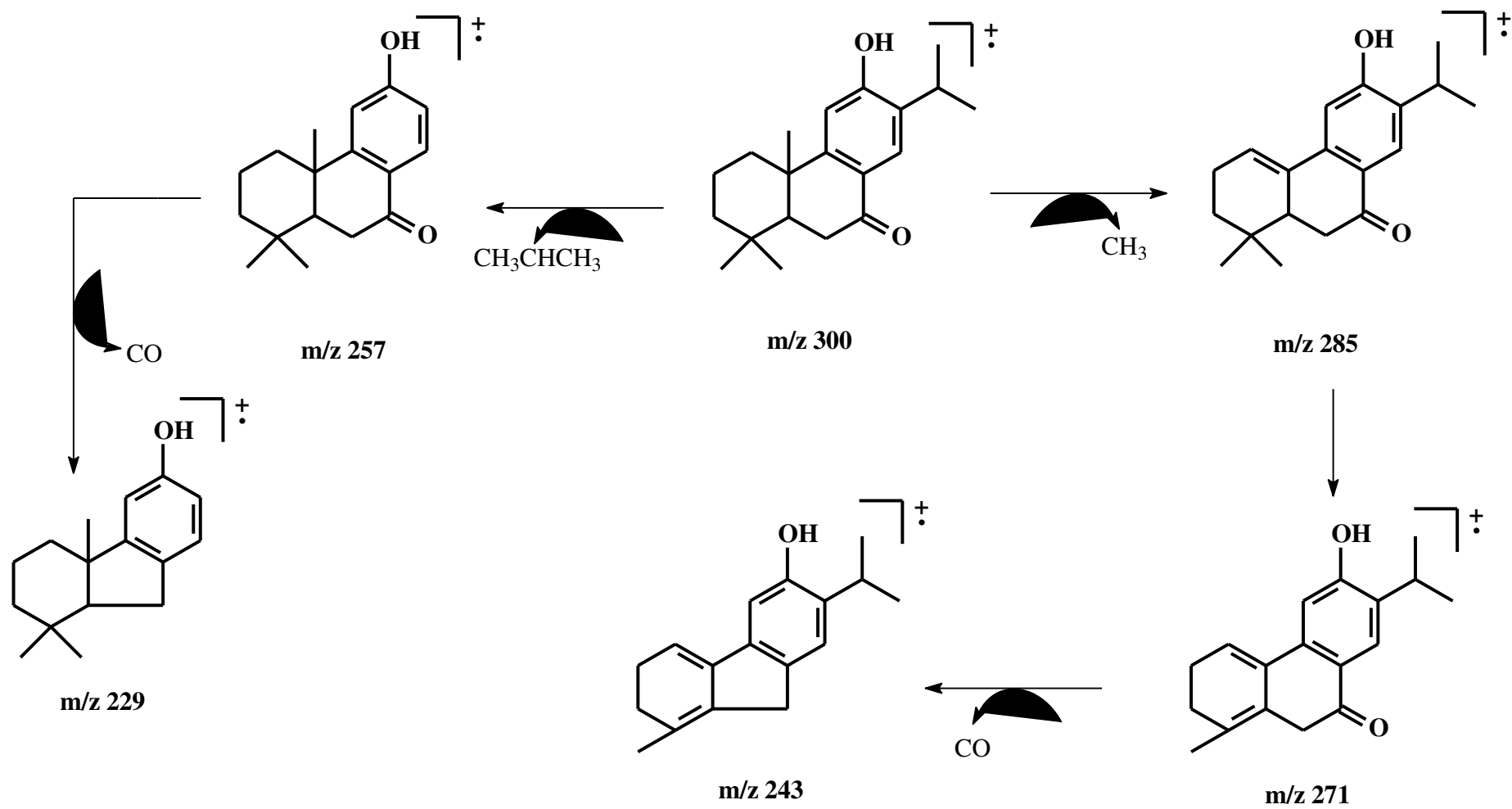


Figura 15. Fragmentação proposta para o composto sugiol.

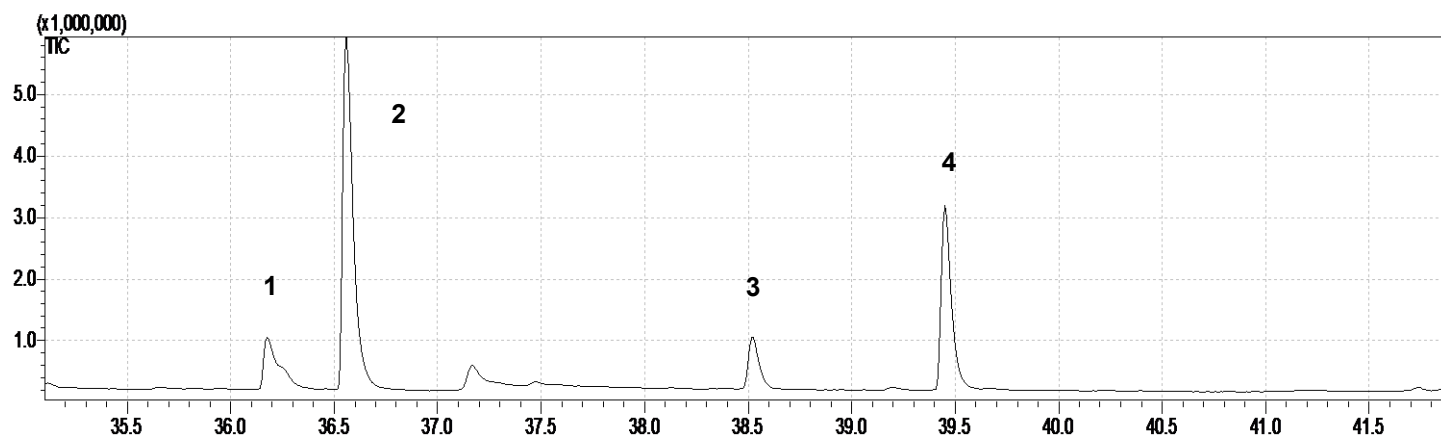


Figura 16. Cromatograma obtido pela análise de CG-EM da fração ativa F41 e F46, os picos numerados de 1 a 4 correspondem aos compostos de maiores intensidades presentes nessas frações.

Tabela 10. Compostos identificados pela análise de CG-EM nas frações ativas F41 e F46 do extrato hexânico de *S. officinalis*.

Número do pico	Nome do composto	Massa	Fórmula molecular	Tempo de retenção (min)
1	Sugiol	300	$C_{20}H_{28}O_2$	36,17
2	Ácido hexanodioico	370	$C_{22}H_{42}O_4$	36,56
3	Ácido octanóico	256	$C_{16}H_{32}O_2$	38,51
4	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico	390	$C_{24}H_{38}O_4$	39,45

5.8 Concentração Inibitória Mínima (CIM) da formulação à base do extrato ativo de *S. officinalis*

A formulação à base do extrato hexânico de *S. officinalis* foi preparada na concentração de 1,5 mg/mL, valor este que não apresenta citotoxicidade para a aplicação no animal. Para determinar se extrato ativo continua exibindo efeito antibacteriano quando incorporado à formulação foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM) para as cepas de *S. aureus* 8996, 8955, 9000, 8925, 8958 e 8907. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 17 e tabela 11.

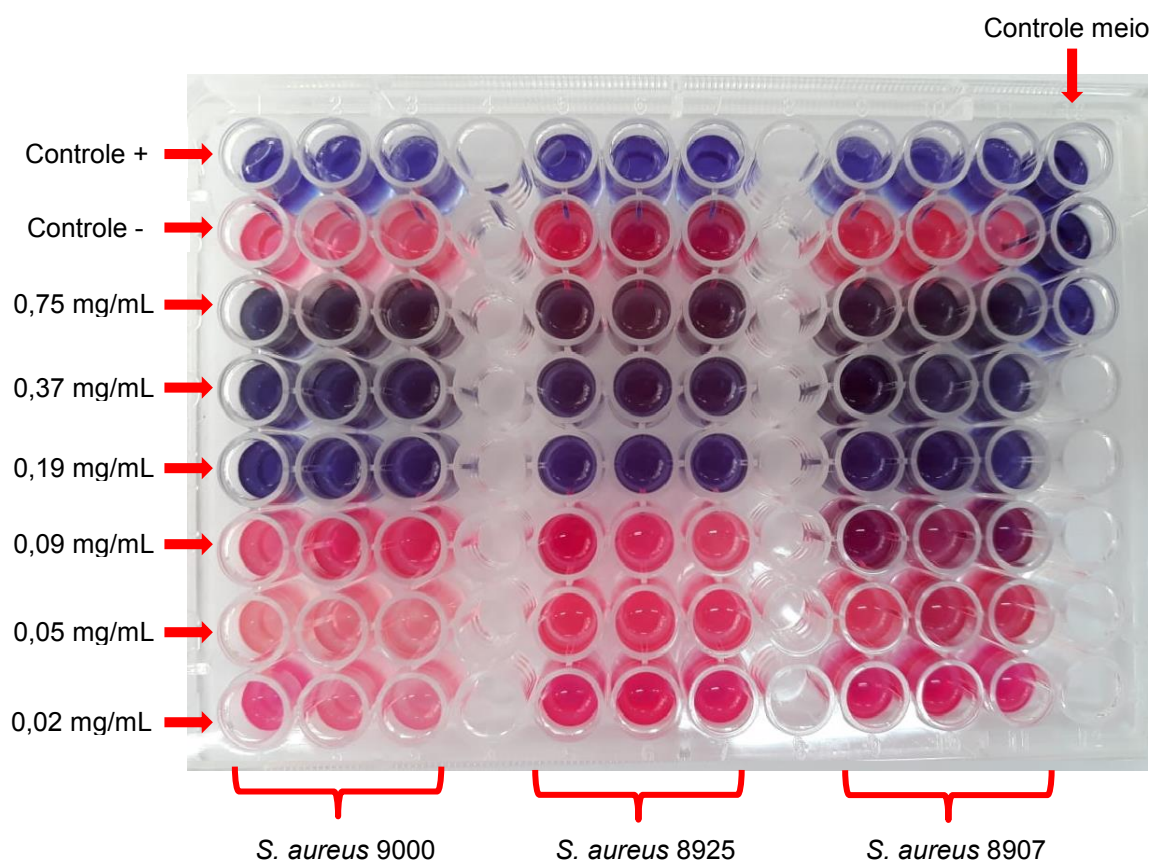


Figura 17. Concentração inibitória mínima (CIM) da formulação à base do extrato hexânico de *S. officinalis* sobre as cepas de *S. aureus* 9000, 8925 e 8907. Poços com coloração azul indicam a presença de bactérias inviáveis e poços com coloração rósea a presença de bactérias viáveis. Controle positivo: cefoperazone. Controle negativo: formulação sem extrato.

Tabela 11. Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL) da formulação à base de *S. officinalis* frente aos isolados de *S. aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>	CIM (mg/mL)
8996	0,37 ± 0,0
8955	0,37 ± 0,0
9000	0,19 ± 0,0
8925	0,19 ± 0,0
8958	0,37 ± 0,0
8907	0,19 ± 0,0

Os resultados demonstraram (Tabela 11) uma CIM variando entre 0,19 mg/mL e 0,37 mg/mL. De acordo com os critérios estabelecidos por Aligiannis e colaboradores (2001) a formulação possui uma forte atividade antibacteriana. Desta forma, é possível observar que o extrato hexânico não perdeu sua bioatividade quando incorporado à formulação, uma vez que a CIM foi praticamente a mesma ao se comparar com o extrato puro.

A formulação preparada na concentração igual a 1,5 mg/mL além garantir uma segurança para utilização em animal, uma vez que apresentou baixa toxicidade para células MAC-T. Esta apresenta uma boa efetividade antibacteriana, dado que foi uma concentração ainda maior daquela necessária para inviabilizar o crescimento de todas as bactérias isoladas de animais acometidos com mastite bovina testadas. À vista disso, a formulação se trata de um promissor fitoterápico para o tratamento e/ou prevenção da mastite bovina.

5.9 Efeito da formulação à base de *S. officinalis* sobre o biofilme em formação

De acordo com os resultados apresentados na tabela 12 é possível observar que a formulação com o extrato de *S.officinalis* possui uma alta capacidade de inibir a formação do biofilme bacteriano. Na concentração igual a 2CIM o extrato conseguiu inibir até 100% a formação do biofilme para *S. aureus* 8955, 8907, 8958, 8996 e 9000. Na concentração igual a CIM os

valores variaram de 51,6% a 93,2% dependendo da cepa de *S. aureus* utilizada. À medida que a proporção do extrato foi diminuindo (1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM) houve uma redução da taxa de inibição, porém é possível observar que mesmo na menor concentração subnibitória testada (1/8CIM) teve-se uma inibição de 76,3 % para a cepa 8907. Nas concentrações subnibitória (1/2CIM e 1/4CIM) houve redução de até 83,9 e 79,1%, respectivamente.

Tabela 12. Taxa de inibição da formação do biofilme bacteriano na presença da formulação à base do extrato hexânico de *S. officinalis* nas concentrações de 2CIM, CIM, 1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM.

<i>S. aureus</i>	Taxa de inibição do biofilme (%)				
	2CIM	CIM	1/2CIM	1/4CIM	1/8CIM
8955	100,0 ± 0	93,2 ± 3	80,4 ± 3	56,8 ± 8	43,0 ± 8
8907	100,0 ± 0	93,7 ± 1	83,9 ± 5	79,1 ± 9	76,3 ± 8
8958	100,0 ± 0	46,7 ± 8	43,4 ± 8	39,6 ± 8	34,8 ± 4
8925	99,9 ± 0	51,6 ± 8	15,8 ± 2	0,0 ± 2	0,0 ± 3
8996	100 ± 0	60,5 ± 3	44,6 ± 9	45,9 ± 7	32,9 ± 8
9000	100 ± 0	53,1 ± 8	54,6 ± 6	37,0 ± 8	10,6 ± 9

5.10 Efeito da formulação à base de *S. officinalis* sobre o biofilme pré-formado

A formulação a base do extrato de *S. officinalis* foi avaliada quanto a sua capacidade de inibir o biofilme previamente formado.

A formulação foi testada nas concentrações de 2CIM, CIM, 1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM para as cepas de *S. aureus* 8955, 8907, 8958, 8925, 8996 e 9000. A tabela 13 mostra a porcentagem de redução do biofilme já formado para as cinco concentrações da formulação.

Tabela 13. Taxa de redução do biofilme bacteriano pré-formado na presença da formulação de *S. officinalis* nas concentrações de 2CIM, CIM, 1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM.

<i>S. aureus</i>	Taxa de redução do biofilme pré-formado (%)				
	2CIM	CIM	1/2CIM	1/4CIM	1/8CIM
8955	80,1 ± 3	64,1 ± 5	58,7 ± 7	42,2 ± 8	38,4 ± 3
8907	84,0 ± 0	82,0 ± 2	78,2 ± 0	76,9 ± 3	75,7 ± 4
8958	59,4 ± 6	22,1 ± 8	1,8 ± 8	0,4 ± 2	0,7 ± 4
8925	84,1 ± 6	80,5 ± 5	66,9 ± 5	50,9 ± 2	48,8 ± 5
8996	86,0 ± 1	84,9 ± 3	68,6 ± 4	68,3 ± 6	44,0 ± 4
9000	75,6 ± 5	72,7 ± 8	69,0 ± 9	63,4 ± 8	62,6 ± 6

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 13) é possível notar que para as bactérias 8955, 8907, 8958, 8925, 8996 e 9000 utilizadas a formulação possui uma inibição do biofilme nas concentrações 2CIM e CIM. A taxa de inibição variou de 86,0% a 59,4% na maior concentração testada (2CIM). Nas concentrações subinibitórias a formulação também foi ativa, exceto para a cepa 8958 cuja atividade foi baixa. De modo geral a formulação à base de *S. officinalis* apresentou uma boa atividade quando a redução do biofilme bacteriano pré-formado, mostrando que este tem a capacidade de romper essa barreira para então inviabilizar as bactérias o que garante uma boa efetividade da formulação.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, 3 extratos orgânicos e o óleo essencial de *Salvia officinalis* L. foram avaliados quanto a sua atividade antibacteriana. Dentre estes, o extrato hexânico apresentou os menores valores de CIM para todas as bactérias analisadas. Em relação a atividade antibiofilme o extrato ativo apresentou uma taxa de inibição de até 100% na formação ou no rompimento do biofilme já formado dependendo da bactéria e concentração utilizada.

No teste de citotoxicidade em células da linhagem MAC-T o extrato não apresentou toxicidade em baixas concentrações. O fracionamento biomonitorado do mesmo e as análises de CG-EM revelou que os compostos ferruginol e sugiol são os responsáveis pela atividade antibacteriana do extrato.

A formulação à base do extrato ativo de *S. officinalis* na concentração 1,5 mg/mL demonstrou que é segura para aplicação animal e apresenta grande efetividade antibacteriana.

Conclui-se com o dado estudo que o extrato hexânico de *Salvia officinalis* apresentou atividade antibacteriana e antibiofilme contra bactérias causadoras de mastite bovina tanto puro quanto incorporado à formulação, sendo considerado um promissor fitoterápico para aplicação profilática e/ou terapêutica dessa enfermidade. Porém, estudos mais detalhados *in vivo* e *in vitro* devem ser realizados para poder inserir o fitoterápico no mercado veterinário.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aliyiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9), 4168-4170.

André, C. (2015). Adesão, formação e composição de biofilme por *Staphylococcus aureus* em poliestireno na presença de nisina. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Viçosa (UFV), 1988-A555a 2015.

André, W. P. P., Ribeiro, W. L. C., de Oliveira, L. M. B., Macedo, I. T. F., Rondon, F. C. M., & Bevilaqua, C. M. L. (2018). Óleos essenciais e seus compostos bioativos no controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46, 1522.

Asli, A., Brouillette, E., Ster, C., Ghinet, M. G., Brzezinski, R., Lacasse, P., ... & Malouin, F. (2017). Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *PloS one*, 12(5), e0176988.

Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... & Rollinger, J. M. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614.

Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156-164.

Bruno, L. O., Marques, L. C., & Cardoso, C. M. Z. (2017). ANÁLISE DAS NORMAS VIGENTES PARA REGISTRO DE FITOTERÁPICOS VETERINÁRIOS NO BRASIL. *Science And Animal Health*, 4(3), 209-227.

Bolzani, V. D. S. (2016). Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. *Ciência e Cultura*, 68(1), 04-05.

Callefe, J. L. R., & Langoni, H. (2015). Qualidade do leite: uma meta a ser atingida. *Veterinária e Zootecnia*, 22(2), 151-162.

Cardozo, V. F., Lancheros, C. A., Narciso, A. M., Valereto, E. C., Kobayashi, R. K., Seabra, A. B., & Nakazato, G. (2014). Evaluation of antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis. *International journal of pharmaceutics*, 473(1-2), 20-29.

CLSI, W. (2012). Clinical and laboratory standards institute methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. *Approved Standard M7-A7, CLSI, seventh ed., PA, USA*.

DUARTE, M. R., & SIEBENROCK, M. (2016). MICROSCOPIC FEATURES OF THE LEAF AND STEM OF *Salvia microphylla* KUNTH, LAMIACEAE. *Visão Acadêmica*, 17(1).

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (2016). Gado do Leite – *Importância Econômica*. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>>. Acesso em 16 de agosto de 2018.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (2017). Gado do Leite – *Indicadores: Leite e Derivados*. Ano 8, n. 72, novembro de 2017. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/167787/1/Cnppl-2017-Indicadores-Leite-72.pdf>>. Acesso em: 16 de agosto de 2018.

Estadão Conteúdo (2017). Produção leiteira do Brasil deve crescer 1,8% em 2018, diz USDA. *Globo rural*, São Paulo, 30 de novembro de 2017. Disponível em: <<https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/Leite/noticia/2017/11/globo-rural-producao-leiteira-do-brasil-deve-crescer-18-em-2018-diz-usda.html>>. Acesso em: 16 de agosto de 2018.

- Faleiro, M. L., & Miguel, M. G. (2013). Use of essential oils and their components against multidrug-resistant bacteria. In *Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components* (pp. 65-94).
- Felipe, L. D. O., Júnior, S., Araújo, K. C. D., & Fabrino, D. L. (2018). Lactoferrin, chitosan and *Melaleuca alternifolia*-natural products that show promise in candidiasis treatment. *Brazilian journal of microbiology*, 49(2), 212-219.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 49.
- Francoz, D., Wellemans, V., Dupré, J. P., Roy, J. P., Labelle, F., Lacasse, P., & Dufour, S. (2017). Invited review: A systematic review and qualitative analysis of treatments other than conventional antimicrobials for clinical mastitis in dairy cows. *Journal of dairy science*, 100(10), 7751-7770.
- Ghorbani, A., & Esmailizadeh, M. (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(4), 433-440.
- Gomes, F., & Henriques, M. (2016). Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current microbiology*, 72(4), 377-382.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2018). Tabulações especiais do censo agropecuário 2018. Rio de Janeiro: IBGE.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., ... & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7-11.
- Jiang, Y., Zhang, L., & Rupasinghe, H. V. (2017). Antiproliferative effects of extracts from *Salvia officinalis* L. and *Salvia miltiorrhiza* Bunge on hepatocellular carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 85, 57-67.
- Júnior, A. A. M., & Jung, C. F. (2017). Produção leiteira no Brasil e características da bovinocultura leiteira no Rio Grande do Sul. *Ágora*, 19(1), 34-47.

Klein, R. C., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira, L. L., Feio, R. N., Malouin, F., & Ribon, A. D. O. B. (2015). A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts *Staphylococcal* biofilms. *PloS one*, *10*(3), e0120514.

Langoni, H., Guimarães, F. F., Wanderley, G. G., Salina, A., & Lavor, U. L. D. (2013). *Geotrichum candidum* e sua importância nas mastites. *Veterinária e Zootecnia*, 264-269.

Lee, J. H., Park, J. H., Cho, H. S., Joo, S. W., Cho, M. H., & Lee, J. (2013). Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*, *29*(5), 491-499.

Li, J., Zhang, L., & Liu, W. (2018). Cell-free synthetic biology for *in vitro* biosynthesis of pharmaceutical natural products. *Synthetic and systems biotechnology*.

Li, M., Li, Q., Zhang, C., Zhang, N., Cui, Z., Huang, L., & Xiao, P. (2013). An ethnopharmacological investigation of medicinal *Salvia* plants (Lamiaceae) in China. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *3*(4), 273-280.

Li, W. H., Chang, S. T., Chang, S. C., & Chang, H. T. (2008). Isolation of antibacterial diterpenoids from *Cryptomeria japonica* bark. *Natural product research*, *22*(12), 1085-1093.

Liu, M., Song, S., Li, H., Jiang, X., Yin, P., Wan, C., ... & Xu, J. (2014). The protective effect of caffeic acid against inflammation injury of primary bovine mammary epithelial cells induced by lipopolysaccharide. *Journal of dairy science*, *97*(5), 2856-2865.

Mabry, T. J., Markham, K. R. Thomas. M. B. (1970). The Systematic Identification of Flavonoids, *Springer-Verlag*, 1970.

Malaquias, G., Cerqueira, G. S., Ferreira, P. M. P., Pacheco, A. C. L., de Castro, J. M., de Deus, M. D. S. M., & Peron, A. P. (2015). Utilização na medicina popular, potencial terapêutico e toxicidade em nível celular das plantas *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. e *Mentha piperita* L. (Família Lamiaceae). *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, *7*(3).

Moreira, M. R., Souza, A. B., Moreira, M. A., Bianchi, T. C., Carneiro, L. J., Estrela, F. T., ... & Veneziani, R. (2013). RP-HPLC analysis of manool-rich *Salvia officinalis* extract and its antimicrobial activity against bacteria associated with dental caries. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(6), 870-876.

Mothana, R. A., Khaled, J. M., El-Gamal, A. A., Noman, O. M., Kumar, A., Alajmi, M. F., ... & Al-Said, M. S. (2018). Comparative evaluation of cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of the crude extracts of three *Plectranthus* species grown in Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal*.

Müller, E.E (2002). Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Anais do II Sul - Leite: *Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil*. 206-217.

Mushtaq, S., Rather, M. A., Qazi, P. H., Aga, M. A., Shah, A. M., Shah, A., & Ali, M. N. (2016). Isolation and characterization of three benzyloisoquinoline alkaloids from *Thalictrum minus* L. and their antibacterial activity against bovine mastitis. *Journal of ethnopharmacology*, 193, 221-226.

Mushtaq, S., Shah, A. M., Shah, A., Lone, S. A., Hussain, A., Hassan, Q. P., & Ali, M. N. (2017). Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microbial pathogenesis*.

Neto, I., Faustino, C., & Rijo, P. (2015). Antimicrobial abietane diterpenoids against resistant bacteria and biofilms. *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs*, 1, 15-26.

Oliveira, C.M.C.; Sousa, M.G.S.; Silva, W.S.; Mendonça, C.L.; Silveira, J.A.S. (2011). Prevalência e etiologia da mastite bovina em rebanhos leiteiros na região de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(2):104-110.

Oliveira, K. B., Palú, É., Weffort-Santos, A. M., & Oliveira, B. H. (2013). Influence of rosmarinic acid and *Salvia officinalis* extracts on melanogenesis of B16F10 cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(2), 249-258.

Onsare, J. G., & Arora, D. S. (2015). Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

aeruginosa and *Candida albicans*. *Journal of applied microbiology*, 118(2), 313-325.

Oyarzabal, M. E. B. (2011). Aplicação do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare*) no tratamento da mastite bovina e presença de fungos no leite bovino *in natura*.

Passos, M. D. S., de Carvalho Junior, A. R., Boeno, S. I., das Virgens, L. D. L. G., Calixto, S. D., Ventura, T. L. B., ... & Vieira, I. J. (2018). Terpenoids isolated from *Azadirachta indica* roots and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.

Sabbag, O. J., & Costa, S. M. A. L. (2015). Análise de custos da produção de leite: aplicação do método de Monte Carlo. *Extensão Rural, Santa Maria*, 22(1), 125-145.

Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of food and drug analysis*, 25(3), 488-500.

SANTOS, E. (2018). *Salvia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*.

Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321-324.

Schabauer, A., Zutz, C., Lung, B., Wagner, M., & Rychli, K. (2018). Gentisaldehyde and Its Derivative 2,3-Dihydroxybenzaldehyde Show Antimicrobial Activities Against Bovine Mastitis *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in veterinary science*, 5.

Sharifi-Rad, M., Ozcelik, B., Altın, G., Daşkaya-Dikmen, C., Martorell, M., Ramírez-Alarcón, K., ... & Sharifi-Rad, J. (2018). *Salvia* spp. plants-from farm to food applications and phytopharmacotherapy. *Trends in Food Science & Technology*.

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., de Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2016). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora.

Simões, T. V. M. D., & Oliveira, A. A. D. (2012). Mastite bovina: considerações e impactos econômicos. *Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros*,. 25p.(Documentos/Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953, 170.

Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179.

Tintino, S. R., de Carvalho Neto, A. A., Menezes, I. R., Oliveira, C. D. D. M., & Coutinho, H. D. (2015). Atividade antimicrobiana e efeito combinado sobre Drogas antifúngicas e antibacterianas do fruto de *Morinda citrifolia* L. *Acta Biológica Colombiana*, 20(3), 193-200.

Valiyari, S., Baradaran, B., Abdolalizadeh, J., Bandehagh, A., Azadmehr, A., & Hajiaghaee, R. (2013). Inhibitory and cytotoxic activities of *Salvia officinalis* L. extract on human lymphoma and leukemia cells by induction of apoptosis. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 3(1), 51.

Vosoughi, N., Gomarian, M., Pirbalouti, A. G., Khaghani, S., & Malekpoor, F. (2018). Essential oil composition and total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extract under chitosan application and irrigation frequencies. *Industrial Crops and Products*, 117, 366-374.

Wang, S. Y., Wu, J. H., Shyur, L. F., Kuo, Y. H., & Chang, S. T. (2002). Antioxidant activity of abietane-type diterpenes from heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata. *Holzforschung*, 56(5), 487-492.

Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Høiby, N., & Song, Z. J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International journal of oral science*, 7(1), 1.

Wu, Y. B., Ni, Z. Y., Shi, Q. W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y. C., & Cong, B. (2012). Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chemical reviews*, 112(11), 5967-6026.

Zoccal, R. (2017). A força do agro e do leite no Brasil. *Balde Branco*, São Paulo, 22 de agosto de 2017. Disponível em: <<http://www.baldebranco.com.br/forca-agro-e-leite-no-brasil/>>. Acesso em: 16 de agosto de 2018.

8. ANEXO

Artigo aceito para publicação em 2019 no periódico *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* ID AABC-2018-0117.R2

1 **Plant Extracts Display Synergism with Different Classes of Antibiotics**

2 Danielle Mendes Silva¹, Priscilla Almeida da Costa¹, Andréa de Oliveira Barros Ribon¹, Gislaine
3 Aparecida Purgato¹, Gaspar Diaz² and Marisa Alves Nogueira Diaz^{1,*}

4

5 ¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade
6 Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs s/n, Campus Universitário, 36570-000, Viçosa-MG, Brasil.

7 ²Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida
8 Presidente Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil.

9

ABSTRACT

10 One manner in which plant-derived compounds exert their antibiotic potential is the synergism, a
11 positive interaction between two compounds. Studies indicate that the use of plant extracts
12 combined with antimicrobials may promote a significant reduction of the minimum inhibitory
13 concentrations of antibiotics for bacterial strains. This study aimed to evaluate the activity of plant
14 extracts and antibiotics as well as their combination on *Staphylococcus aureus*. The activity of 15
15 plant extracts was evaluated using diffusion assay. The minimum inhibitory concentrations (MICs)
16 and the interactions between the extracts and antibiotics as well as compound emodin were
17 evaluated with the checkerboard method. The active extracts were a hexane extract of the leaves
18 of *Baccharis dracunculifolia* and the ethanol extracts of the leaves of *Plectranthus ornatus*, *Inga*
19 *edulis*, *Salvia officinalis* and *Senna macranthera*. The *Plectranthus ornatus* extract displayed
20 synergism with ampicillin (a β -lactam), kanamycin and gentamicin (aminoglycosides), with 8-fold
21 reductions in the MIC. The same reduction was observed for the extracts of *Salvia officinalis* and
22 *Senna macranthera*, which displayed the lowest MIC. Using these combinations resulted in a
23 reduction in the minimum dose required for effective antimicrobial effects, which is interesting
24 because it may decrease both the risk of side effects and the costs of treatment.

25

26 **Keywords:** Antibiotics, Bovine mastitis, Plant extract, *Staphylococcus aureus*

27

Plant Extracts Display Synergism

28 * Autor correspondence. E-mail: marisanogueira@ufv.br Tel: +55 31 3899 3041, Fax +55 31 3899 2374.

29

Trabalhos apresentados em congressos em 2018



ENSINO PESQUISA EXTENSÃO

Simpósio de Integração Acadêmica

SIA UFV



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho "Estudo inicial do efeito citotóxico *in vitro* de extratos de *Salvia officinalis* contra células de câncer de pele tipo melanoma utilizando linhagem B16F10", de autoria de Karoline Hellen Madureira de Melo, ANESIA APARECIDA DOS SANTOS (Orientador), MARISA ALVES NOGUEIRA DIAZ, Jefferson Viktor de Paula Barros Baêta, Gislaine Aparecida Purgato, foi apresentado em sessão painel no Simpósio de Integração Acadêmica, realizado no período de 15 a 20 de outubro de 2018, no Campus Viçosa da Universidade Federal de Viçosa.

Viçosa, 20 de janeiro de 2019.



Frederico José Vieira Passos
Pró-Reitor de Ensino



Luiz Alexandre Peternelli
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação



Clóvis Andrade Neves
Pró-Reitor de Extensão e Cultura



ENSINO PESQUISA EXTENSÃO

Simpósio de Integração Acadêmica

SIA UFV



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho "Atividade antimicrobiana de extrato de *Salvia officinalis* (L.) frente à *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina.", de autoria de Luisa Soares Neves, VIRGINIA RAMOS PIZZIOLO (Orientador), Gislaine Aparecida Purgato, Jefferson Viktor de Paula Barros Baêta, Hyanne Pereira Lima, MARISA ALVES NOGUEIRA DIAZ, foi apresentado em sessão painel no Simpósio de Integração Acadêmica, realizado no período de 15 a 20 de outubro de 2018, no Campus Viçosa da Universidade Federal de Viçosa.

Viçosa, 20 de janeiro de 2019.



Frederico José Vieira Passos
Pró-Reitor de Ensino



Luiz Alexandre Peternelli
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação



Clóvis Andrade Neves
Pró-Reitor de Extensão e Cultura