

THALITA DE FARIA MAIA

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS PARA OBTENÇÃO DE SABONETES
COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015
THALITA DE FARIA MAIA**

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

T

Maia, Thalita de Faria, 1985-
M217a Avaliação de extratos vegetais para obtenção de sabonetes
2015 com atividade antimicrobiana / Thalita de Faria Maia. – Viçosa,
MG, 2015.
x, 66f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.52-63.

1. Extratos vegetais. 2. Sabonete. 3. Agentes antibacterianos. 4. Bovino - Doenças. 5. Mastite. 6. *Staphylococcus aureus*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 636.2089819

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS PARA OBTENÇÃO DE SABONETES
COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

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

APROVADA: 25 de Junho de 2015

Andréa de Oliveira Barros Ribon

Andressa Antunes Prado de França

Virgínia Ramos Pizziolo

Marisa Alves Nogueira Diaz
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Capes e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Agradeço a UFV e ao Departamento de Bioquímica pela oportunidade.

Agradeço à minha mãe, por seu apoio e direcionamento em cada conquista.

Agradeço a Eva por todo carinho e pela força em todas as conquistas.

Agradeço ao meu amigo Eduardo (PEP) por trazer a magia.

Agradeço aos meus amigos Jenyfer, Éder, Douglas e André por todos os todyinhos e risos divididos.

Agradeço aos amigos, que sempre incentivaram os meus sonhos e estiveram sempre ao meu lado e também aos meus colegas de departamento, especialmente Sâmia e Gislaine, pela ajuda e demais colegas do laboratório, pela amizade e companheirismo.

Agradeço à Profa. Marisa Alves Nogueira Diaz que me acompanhou e orientou, transmitindo-me tranquilidade e conhecimento.

Agradeço aos professores Gaspar Diaz Muñoz, Virgínia Ramos Pizziolo pela orientação e apoio.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Produtos Naturais	2
2.1.1. Uso de Extratos Vegetais na Terapêutica de Microrganismos Patogênicos	2
2.1.2. Plantas com Atividade Antimicrobiana	5
2.1.2.1. <i>Salvia officinalis</i>	5
2.1.2.2. <i>Psychotria vellosiana Benth</i>	6
2.1.2.3. <i>Baccharis dracunculifolia</i>	7
2.1.2.4. <i>Alternanthera brasiliana</i>	9
2.1.2.5. <i>Senna macranthera</i>	10
2.1.2.6. <i>Miconia latecrenata</i>	13
2.2. Domissaneantes	14
2.2.1. Sabonetes	15
2.2.2. Sabonetes Ativos	16
2.3. Mastite Bovina	17
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos Específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Extratos Utilizados	22
4.2. Bioensaio para atividade antibacteriana dos extratos.....	22
4.2.1. Microrganismos utilizados	22
4.2.2. Preparo das soluções de extratos e do controle positivo	23
4.2.3. Avaliação da atividade antibacteriana	23

4.2.4. Determinação da concentração inibitória mínima dos extratos	23
4.2.5. Avaliação de viabilidade celular em função da concentração dos extratos	25
4.2.6. Efeito do(s) extrato(s) sobre o Biofilme	25
4.2.6.1. Incubação das bactérias nas microplacas	26
4.2.6.2. Aplicação dos extratos no biofilme formado	26
4.2.6.3. Revelação das microplacas	26
4.3. Produção dos Sabonetes.....	26
4.4. Determinação da concentração inibitória mínima dos sabonetes.....	27
4.4.1. Cálculo da Densidade Ótica (D.O.) para confirmação de 10^6 UFC mL ⁻¹ ..	27
4.5. Avaliação da Eficácia dos sabonetes.....	28
4.5.1. Teste das luvas	28
4.6. Análises Estatísticas	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Avaliação da atividade bactericida dos extratos	30
5.2. Concentração Inibitória Mínima dos extratos	34
5.3. Viabilidade Celular	37
5.4. Efeito dos Extratos sobre o Biofilme	39
5.5. Obtenção dos Sabonetes	44
5.6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos sabonetes	44
5.7. Teste das Luvas	46
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS.....	52
8. ANEXOS	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusão de Cérebro e Coração Bovino
CCS	Contagem de células somáticas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CIB	Concentração Inibitória de Biofilme
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimeltisufóxido
D.O.	Densidade Ótica
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
GL	Graus de Liberdade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LB	Luria-Bertani
MH	Mueller-Hinton
MQ	Erro Médio Quadrático
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
MTT	Ensaio de Metiltiazol
SQ	Soma Quadrática
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 <i>Salvia officinalis</i>	6
Figura 2 <i>Psychotria vellosiana Benth</i>	7
Figura 3 <i>Baccharis dracunculifolia</i>	8
Figura 4 <i>Alternanthera brasiliana</i>	10
Figura 5 Compostos ativos isolados de raízes e flores de <i>Senna macranthera</i>	11
Figura 6 <i>Senna macranthera</i>	12
Figura 7 <i>Miconia latecrenata</i>	14
Figura 8 Molécula do Triclosan.....	15
Figura 9 Esquema da Placa de ELISA para determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	24
Figura 10 Efeito dos extratos testados sobre a linhagem bacteriana <i>Staphylococcus aureus</i> 3828.....	31
Figura 11 Efeito dos extratos testados sobre a linhagem bacteriana <i>Staphylococcus aureus</i> 4125.....	32
Figura 12 Efeito dos extratos testados sobre a linhagem bacteriana <i>Staphylococcus aureus</i> 4158.....	33
Figura 13 Exemplo de ensaio de determinação de Concentração Inibitória Mínima de extrato de <i>Salvia officinalis</i> sobre a cepa 4158 de <i>Staphylococcus aureus</i>	35
Figura 14 Redução da Viabilidade Celular em função de diluições da Concentração Inibitória Mínima para <i>Staphylococcus aureus</i> 3828.....	38
Figura 15 Redução da Viabilidade Celular em função de diluições da Concentração Inibitória Mínima para <i>Staphylococcus aureus</i> 4125	38

Figura 16	Redução da Viabilidade Celular em função de diluições da Concentração Inibitória Mínima para <i>S. aureus</i> 4158..	39
Figura 17	Efeito do extrato de <i>Psychotria vellosiana</i> sobre o crescimento de biofilmes para as cepas 3828, 4158 e 4125 de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Figura 18	Efeito do extrato de <i>Salvia officinalis</i> sobre crescimento de biofilmes para as cepas 3828, 4158 e 4125 de <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Figura 19	Efeito do extrato de <i>Senna macranthera</i> sobre crescimento de biofilmes para as cepas 3828, 4158 e 4125 de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Figura 20	Sabonetes produzidos com extratos ativos das plantas <i>Salvia officinalis</i> , <i>Psychotria vellosiana</i> Benth, <i>Baccharis dracunculifolia</i> , <i>Alternanthera brasiliana</i> , <i>Senna macranthera</i> , <i>Miconia latecrenata</i> e sabonete controle....	44
Figura 21	Teste em campo.....	47
Figura 22	Controles de atividade antibacteriana em campo de sabonetes com os extratos ativos.....	48
Figura 23	Atividade antibacteriana em campo de sabonetes com os extratos ativos de <i>Senna macranthera</i> , <i>Salvia officinalis</i> e <i>Psychotria vellosiana</i>	49

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos compostos isolados de <i>Senna macranthera</i>	12
Tabela 2 Solventes, técnica e parte utilizada na extração das plantas utilizadas.....	22
Tabela 3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos ativos de <i>Senna macranthera</i> , <i>Salvia officinalis</i> e <i>Psychotria vellosiana Benth</i> para as cepas 3828, 4125 e 4158 de <i>S. aureus</i>	36
Tabela 4 Valores em porcentagem de redução da viabilidade celular na Concentração Inibitória Mínima.....	37
Tabela 5 Concentração Inibitória de Biofilme (BIC) dos extratos ativos para <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Tabela 6 Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos sabonetes com extratos ativos de <i>Senna macranthera</i> , <i>Salvia officinalis</i> e <i>Psychotria vellosiana Benth</i> para as cepas 3828, 4125 e 4158 de <i>Staphylococcus aureus</i>	45

RESUMO

MAIA, Thalita de Faria, MSc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2015. **Avaliação de Extratos Vegetais para Obtenção de Sabonetes com Atividade Antimicrobiana.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Gaspar Diaz Muñoz e Virgínia Ramos Pizziolo.

O anúncio de novas linhagens resistentes a antibióticos sempre preocuparam a comunidade científica. O estudo de produtos naturais ativos representa uma alternativa para a diminuição de infecções bacterianas através da busca por novas moléculas capazes de inibir o crescimento bacteriano. Neste trabalho foi testado e comparado o efeito antibacteriano de extratos vegetais sobre três cepas de *Staphylococcus aureus*, um dos principais agentes etiológicos causadores da mastite bovina. A atividade de seis extratos vegetais (*Salvia officinalis*, *Psychotria vellosiana*, *Baccharis dracunculifolia*, *Alternanthera brasiliana*, *Senna macranthera*, *Miconia latecrenata*) foi testada sobre as cepas 3828, 4125 e 4158 de *S. aureus*. As melhores atividades de inibição do crescimento bacteriano nas condições apresentadas foram dos extratos de *Senna macranthera*, *Salvia officinalis* e *Psychotria vellosiana Benth*. Posteriormente, esses extratos foram submetidos às inferências de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Ensaio de Redução de Viabilidade Celular e determinação da Concentração Inibitória Mínima de Biofilme. A partir daí, foram produzidos sabonetes contendo os extratos vegetais para teste de campo. Foram realizados também testes em campo na Divisão de Gado de Leite da Universidade Federal de Viçosa com as luvas contaminadas de ordenhadores, que manipularam animais com mastite. Os sabonetes produzidos com os extratos de *S. macranthera*, *P. vellosiana Benth* e *S. officinalis* tiveram grande impacto sobre a microbiota da luva, já que não foi possível visualizar crescimento bacteriano após a lavagem da mesma com os sabonetes. Os resultados deste estudo sugerem a utilização dos sabonetes contendo os extratos de *S. macranthera* e *S. officinalis* no controle da população bacteriana para reduzir agentes causadores de mastite bovina.

ABSTRACT

MAIA, Thalita de Faria, MSc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2015. **Evaluation of Plant Extracts for Obtainment of Soaps with Antimicrobial Activity.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Gaspar Diaz Munoz and Virgínia Ramos Pizziolo

Announcements of new resistant strains to antibiotic always alerts the scientific community. The study of active natural products is an alternative to the reduction of bacterial infections through the search for new molecules able to inhibit bacterial growth. This study assayed and compared the antibacterial effect of vegetal extracts on three *Staphylococcus aureus* strains, one of the main etiological agent's responsible for the bovine mastitis. The activity of six plant extracts (*Salvia officinalis*, *vellosiana Psychotria*, *Baccharis dracunculifolia*, *Alternanthera brasiliana*, *Senna macranthera*, *Miconia latecrenata*) was tested on strains 3828, 4125 and 4158 of *S. aureus*. The best inhibition activity of bacterial growth in the presented conditions was from *Senna macranthera*, *Salvia officinalis* and *Psychotria vellosiana* Benth extracts. Subsequently, these statements were submitted to inferences of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), cell viability and determination of the MIC of Biofilm. Soaps were produced containing plant extracts for field testing. Field tests were also conducted in the Divisão de Gado de Leite of Universidade Federal de Viçosa with the gloves contaminated by animals with mastitis manipulated by milkers. The soaps made from extracts of *S. macranthera*, *P. vellosiana* Benth and *S. officinalis* had great impact on the microbiota sleeve, since it was not possible to see bacterial growth after washing the same with the soaps. The results of this study suggest the use of soaps containing the *S. macranthera* and *S. officinalis* extracts in controlling the bacterial population to reduce etiological agents of bovine mastitis.

1. INTRODUÇÃO

A busca de soluções seguras e eficazes para o combate de agentes antibacterianos representa uma prioridade para o campo biomédico atual (MOHEBI et al, 2011). Desde os tempos antigos, as plantas vêm sendo utilizadas nas sociedades humanas com propósitos terapêuticos, sendo que suas propriedades tóxicas ou curativas foram descobertas pelo homem principalmente enquanto este buscava por alimento (MARASCHIN e VERPOORTE, 1999).

A resistência aos antibióticos é um problema que desafia o setor da saúde. Neste aspecto, a resistência a múltiplas drogas tem sido muito reportado em agentes patogênicos como, por exemplo, o *Staphylococcus aureus*. Novas drogas poderiam ser desenvolvidas graças aos avanços na identificação de novas fontes naturais antibióticas e no maior conhecimento da diversidade química (WRIGHT, 2007).

O reino vegetal apresenta possibilidade de compostos químicos ainda não identificados que poderiam ter importantes aplicações após estudo derivado do seu uso constante na medicina tradicional e popular (SOBERÓN et al., 2007). Drogas constituídas por extratos brutos ou compostos biologicamente ativos isolados de espécies vegetais usadas na medicina popular poderiam ser fontes promissoras para a pesquisa de novos fármacos antimicrobianos (AL-FATIMI et al., 2007). Muitos compostos, encontrados em plantas, são do metabolismo secundário e englobam diversas substâncias farmacologicamente ativas, regularmente empregadas como fármacos (FIGUEIREDO et al., 2007).

As principais classes de metabólitos secundários são: flavonóides, alcalóides, taninos, cumarinas, agliconas, antraquinônicas, triterpenos e/ou esteróides, saponinas e polifenóis (ALVES et. al, 2009). De maneira geral, óleos essenciais, flavonóides, alcalóides, taninos e quinonas, todos isolados de plantas, são descritos na literatura por apresentarem atividades biológicas, dentre elas atividade antibacteriana (SAVOIA, 2012).

Assim, produtos naturais podem ser uma boa fonte de novos compostos com atividade antimicrobiana e fornecer novos medicamentos para a diminuição de bactérias causadoras de doenças.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produtos Naturais

A busca por produtos naturais como método terapêutico está presente de forma marcante na cultura popular (DI STASI, 2007). Muitos fatores têm contribuído para o aumento da utilização de plantas medicinais, entre eles, o difícil acesso da população às assistências médica e farmacêutica, o custo dos medicamentos, bem como a influência exercida pelos meios de comunicação para consumo de produtos vindos de fontes naturais (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Nas últimas décadas, a pesquisa sobre as propriedades antibacterianas das plantas tem aumentado em todo o mundo por essas serem consideradas uma fonte de compostos farmacologicamente ativos e, de potenciais novos antibióticos (MATHABE et al., 2006; MELÉNDEZ et al., 2006).

Os metabólitos secundários, moléculas de estrutura complexa e baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes em determinadas famílias de plantas, aparentemente não possuem relação com crescimento e desenvolvimento da planta e diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações (TAIZ, 2006; BERG, 2008). Devido às diferentes atividades biológicas dos metabólitos secundários de plantas em humanos, essas são utilizadas há séculos na medicina popular e nos dias atuais, como medicamentos, cosméticos, matéria-prima para a química fina, ou mais recentemente como nutracêuticos (BARBOSA-FILHO et al., 2008).

Os metabólitos secundários de plantas são usualmente classificados de acordo com a sua rota biossintética (HARBONE, 1999). As plantas apresentam várias vias metabólicas secundárias que produzem classes de compostos que incluem alcalóides, flavonoides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos e poliacetilenos, dentre outros, alguns dos quais muito estudados por suas atividades antioxidantes, antitumorais e antibacterianas (DINIZ et al., 1997; KIM et al., 2008).

2.1.1. Uso de Extratos Vegetais na Terapêutica de Microrganismos Patogênicos

Um produto natural é um composto químico ou substância produzida por um ser vivo, encontrado na natureza e que geralmente tem atividade biológica ou farmacológica e pode ser usado na descoberta ou concepção de produtos

farmacêuticos (CUTLER, 2000). As plantas medicinais são fontes de produtos naturais de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos e por proporcionarem grandes chances de obterem-se moléculas protótipos devido à diversidade de seus constituintes (LIMA et al., 2006).

Estudos realizados com produtos naturais com atividade biológica têm sido realizados no sentido de oferecer alternativas confiáveis para o controle bacteriano, principalmente a partir de produtos bioativos obtidos de plantas com propriedades terapêuticas de uso rotineiro (ALBUQUERQUE, 2001). A importância dos produtos naturais na descoberta e desenvolvimento de fármacos é bem documentada. As plantas e microrganismos cultiváveis são as principais fontes de moléculas biologicamente ativas e teurapeuticamente úteis, embora as triagens contínuas dessas fontes frequentemente levem a altos índices de isolamento de substâncias já caracterizadas (PUPO et al., 2007).

Flavonoides, compostos da classe dos polifenóis, tem o potencial de modificar a biossíntese de eicosanoides (resposta anti-prostanoide e antiinflamatória); de proteger o colesterol-LDL da oxidação (inibindo formação de placa aterosclerótica); de prevenir a agregação plaquetária tendo efeitos antitrombóticos; de promover o efeito anti-hipertensivo e anti-isquêmico; de regenerar antioxidantes primários, como a vitamina C, no organismo; de ter efeito antipromocionais na carcinogênese de alguns tipos de câncer; de amenizar os sintomas da menopausa; de aumentar a lipólise; de desacelerar o processo degenerativo em bainhas de mielina; de aumentar a secreção de insulina; de aumentar a expressão de genes responsáveis pela produção de proteínas sinápticas; de estimular os linfócitos B a produzirem anticorpos e de possuir atividade leishmanicida. Atualmente são de grande interesse por suas atividades biológicas de efeito neuroprotetor, anti-inflamatórios, anticâncer, anti-Alzheimer, antígenotóxico e atividade antiglicativa (CANCLIRACCI et al., 2012; MASTER et al., 2012; MURTHY et al., 2012; JIANGUOET al., 2013; DA SILVA et al., 2015), as quais estão relacionadas com suas propriedades antioxidantes (XIAO et al., 2012).

Taninos, polifenóis de plantas com pesos moleculares entre 500 e 3000, conferem aos frutos e outros alimentos, características adstringentes. A sensação de adstringência é gerada devido à propriedade que os taninos apresentam de precipitar proteínas (DEGÁSPARI, 2004), o que diminui a palatabilidade. Sua degradação pode gerar compostos tóxicos, protegendo a planta de herbívoros e

microrganismos. Além dessas classes de compostos, os alcaloides constituem um grupo heterogêneo de substâncias nitrogenadas e possuem caráter básico. Os alcaloides foram relacionados com atividades antioxidantes (KONRATH et al., 2011). Já as cumarinas, foram descritas por possuírem atividades broncodilatadora, antiasmática, expectorante e antitussígena (ABOY et al., 2002).

As propriedades antimicrobianas de substâncias e óleos essenciais originários de plantas, através do seu metabolismo secundário, têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas recentemente. Vários grupos de pesquisa estudam a atividade biológica de plantas medicinais de diversas regiões do mundo, orientados pelo uso popular das espécies nativas na tentativa de achar extratos com atividades biológicas e com ações terapêuticas contra patógenos causadores de doenças (Duarte, 2006).

Uma das atividades biológicas interessantes apresentadas pelos metabólitos secundários em microrganismos são as atividades contra biofilmes bacterianos. Os biofilmes são comunidades de microrganismos imobilizados conjuntamente numa matriz organizada de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) de origem microbiana após a adesão a uma superfície. Constituem, assim, um modo de crescimento que permite ao microrganismo proteção contra ambientes hostis aumentando sua sobrevivência, sendo sua fisiologia e comportamento significativamente diferentes de seus homólogos planctônicos (SIMÕES et al., 2010). Um biofilme forma-se naturalmente em qualquer superfície sólida em contato com água não esterilizada (XAVIER et al., 2003). Estudos com extratos vegetais e substâncias isoladas oriundas desses sugeriram a existência de atividade inibitória sobre microrganismos cultivados na forma livre e em biofilme quando comparado aos antibióticos utilizados como controle. Por exemplo, o extrato metanólico de aroeira apresentou atividade significativa contra a adesão e consequente formação de biofilme da bactéria *Streptococcus mutans* em blocos de resina simulando a estrutura dental (BARBIERI et al., 2014).

Na Universidade Federal de Viçosa, o Laboratório de Bioquímica e Química de Produtos Naturais (BioNat) possui uma biblioteca de extratos vegetais oriundas de plantas comumente utilizadas na medicina tradicional e popular, o acesso aos extratos de *Salvia officinalis*, *Psychotria vellosiana*, *Baccharis dracunculifolia*, *Alternanthera brasiliana*, *Senna macranthera*, *Miconia latecrenata* permitiu a

pesquisa sobre os efeitos antimicrobianos e efeitos sobre o biofilme de bactérias neste trabalho.

2.1.2. Plantas com Atividade Antimicrobiana

2.1.2.1. *Salvia officinalis*

Salvia officinalis (L.) (Figura 1), popularmente conhecida como salva, salva-das-boticas, salva-dos-jardins, salva-ordinária, salveta, erva-santa, salva-menor, entre outras, é uma erva aromática que tem sido usada na medicina e na culinária desde tempos antigos, sendo nativa de países mediterrâneos, e tem sido investigada para o tratamento de várias doenças, especialmente infecções e inflamação da pele (GARCIA et al., 2012). Seus óleos essenciais têm sido relatados como constituídos de cinerol, cânfora, borneol, turjona, ácido rosmarínico, flavonoides, taninos, saponinas e substâncias estrogênicas (CUNHA, 2004; VIECELLI E CRUZ-SILVA, 2009). Além disso, Yinrong et al., 2001, demonstraram a existência de atividades antioxidantes dos polifenóis da sálvia, consistindo de glicosídeos flavonoides e uma variedade de derivados do ácido rosmarínico. A atividade antioxidante foi avaliada quanto à sua capacidade de sequestrar radicais DPPH e ânions de superóxido.

As folhas e raízes de Sálvia são muito populares por suas propriedades antioxidativas e tem sido utilizadas na indústria alimentícia e na medicina humana. Na medicina tradicional, a planta tem sido utilizada para vários propósitos como: anti-inflamatório, antioxidante e tratamento de distúrbios gástricos. Além disso, extratos etanólicos de Sálvia são utilizados contra inflamações na cavidade oral, trato intestinal, contra gastrite e inflamações de garganta (CAPEK et al., 2003; Mayer et al., 2009). Várias outras atividades biológicas foram descritas na literatura, tais como bactericida, fungicida, virucida, adstringente, hipoalergênica, anti-espasmódico, anti-hidrolítica e citolítica (BARICEVIC et al., 2003; KAMATOU et al., 2008)

Estudos das folhas, raízes e extrações solúveis em água de *S. officinalis* mostraram conter ácidos graxos voláteis, diterpenos, saponinas, flavonoides, ácidos fenólicos, resina e substâncias estrogênicas (MILIAUSKAS et al., 2004). Também foi reportado que os compostos principais dos óleos essenciais de sálvia da Estônia e outros países europeus eram 1,8-cineole, cânfora, α -tujona, β -tujona, borneol e viridiflorol (RAAL et al., 2007).

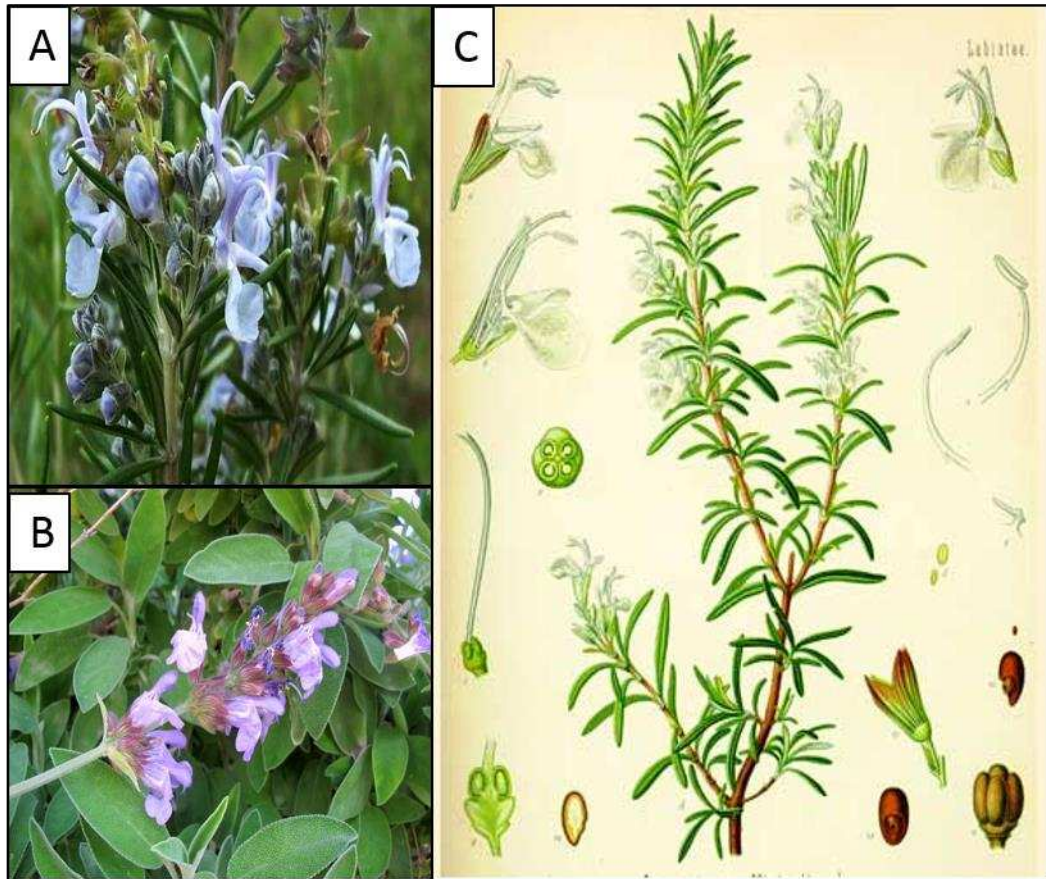


Figura 1. *Salvia officinalis*. Em A e B podemos observar a sumidade florida da planta. Em C é possível observar representação de detalhes do ramo florido. Fonte disponível em: <http://quintadovillar.com/fauna-e-flora/ervas-aromaticas>

2.1.2.2. *Psychotria vellosiana Benth*

Plantas do gênero *Psychotria* (família Rubiaceae) são conhecidas por suas habilidades de produzir novos alcaloides multiméricos de indol (ZHOU et al., 2010). Grande parte do gênero mostrou propriedades farmacológicas relevantes como atividade analgésica, antiinflamatória, ansiolítica, antidepressivo e efeito antioxidante (BOTH et al., 2002; ELISABETSKY et al., 1997; FRAGOSO et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2007). É conhecida popularmente por café do mato (Figura 2), cafezinho do mato e tem como habitat e origem a Mata Atlântica.

Popularmente são utilizadas casca do caule, folhas e flores. O extrato vegetal de *P. vellosiana Benth* possui atividade bactericida contra *M. tuberculosis* (RAMOS et al., 2008) e provavelmente contra outras bactérias, apesar de ainda não muito utilizada na medicina popular. Plantas da família Rubiaceae, comumente

apresentam alcaloides indol (SCHRIPSEMA et al., 2003). Análises fitoquímicas de *P. vellosiana* também mostraram a presença de psychotridinas, que têm sido associadas com efeitos analgésicos dose-dependente (AMADOR et al., 2001).

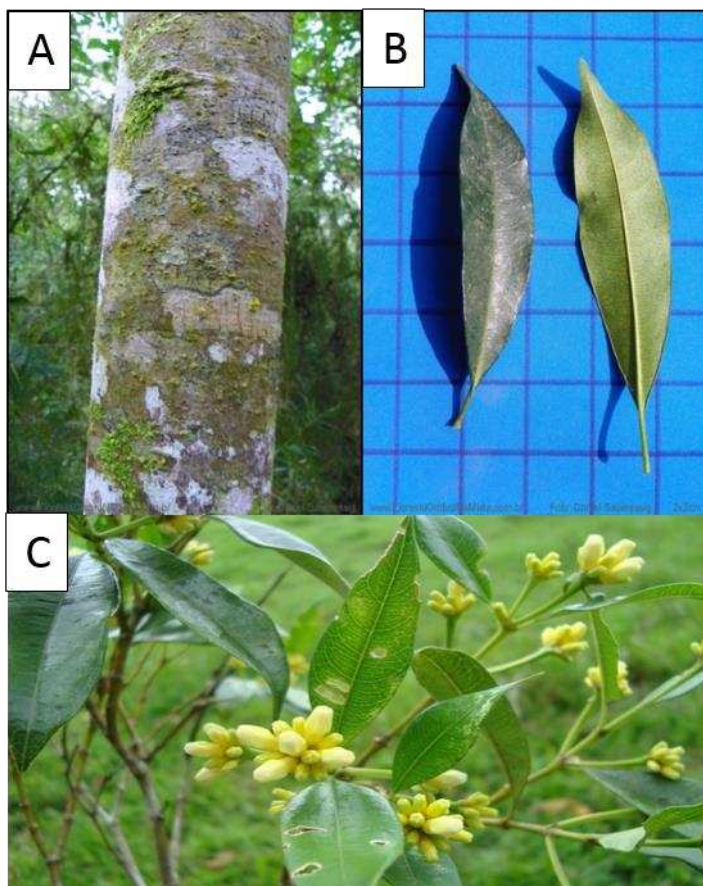


Figura 2. *Psychotria vellosiana* Benth (Café do mato). Podemos observar as principais estruturas desta planta utilizadas na medicina tradicional. Em A temos o caule da planta, de onde são retiradas as cascas para as preparações. Em B temos as folhas enquanto em C temos o detalhe da sumidade florida. (Fonte disponível em: <http://florestaombrofilamista.com.br/sidol>)

2.1.2.3. *Baccharis dracunculifolia*

Baccharis dracunculifolia, membro da família Asteraceae, comumente conhecida como “Alecrim do campo” e “Vassoura” (Figura 3), é o componente botânico principal da própolis brasileira. É uma planta nativa do Brasil largamente utilizada na medicina tradicional como anti-inflamatório (PARK et al., 2002; SIMÕES et al., 2004). Testes *in vivo* e *in vitro* de extratos de *B. dracunculifolia* apresentaram

efeitos anti-inflamatórios e analgésicos em camundongos e ratos (SANTOS et al., 2010). Além disso, os extratos também sugeriram atividade antioxidante, antitumoral e de imunomodulação (LEITÃO et al., 2004; SANTOS et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2012).

Infusões das folhas são usadas na medicina tradicional brasileira como anti-inflamatório (SANTOS et al., 2010) e como um protetor das mucosas hepáticas (FERNANDEZ et al., 2003). Os óleos essenciais também são utilizados com grande valor comercial devido ao seu aroma exótico e diversas aplicações como um aditivo em cosméticos, alimentos e agroquímicos (SOUZA et al., 2009). Extratos glicólicos também exibiram atividades antioxidantes *in vitro* (GUIMARÃES et al., 2012)

Análises de HPLC de *Baccharis dracunculifolia* identificaram ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido 3,4-di-O-cafeoilquinico, ácido 3,5-di-O-cafeoilquinico, ácido 4,5-di-O-cafeoilquinico, ácido cinâmico, aromadendrin-4'-O-metileter, drupanina, artemillina C, e bacularina como compostos principais (REZENDE et al., 2014).

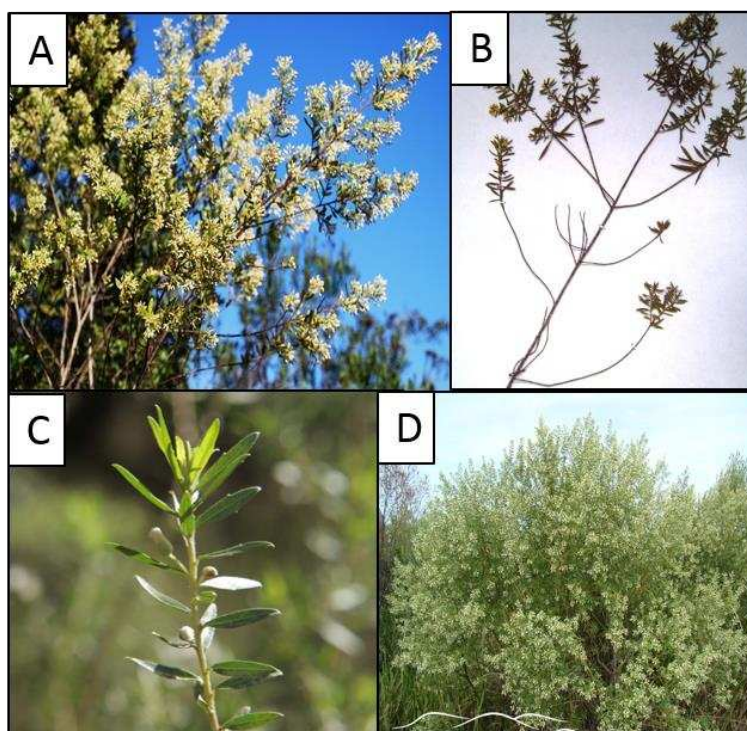


Figura 3. *Baccharis dracunculifolia* (Vassoura). Em A temos a fotografia da sumidade florida da planta, enquanto em B temos uma exsicata. Em C temos o detalhe do galho e folhas enquanto em D uma fotografia da planta inteira. Fonte das imagens disponível em: (<http://www.dataplant.org.br/bd.php>)

2.1.2.4. *Alternanthera brasiliana*

Alternanthera brasiliana (Figura 4), membro da família Amaranthaceae, comumente conhecida como Terramicina é uma planta herbácea usada contra inflamação, tosse e diarreia na medicina popular brasileira (STASI et al., 1994). A infusão de suas folhas é utilizada como diurético, digestivo, depurativo, sendo empregada para moléstias do fígado e bexiga, antibiótico, para disfunções estomacais, infecção de garganta, dor de cabeça e dores em geral (GARLET, 2001). Os extratos de *A. brasiliana* em pesquisas anteriores sugeriram efeitos antibacterianos (BIVATTI et al., 2003) e efeitos contra o vírus do herpes (LAGROTA et al., 1994). O extrato etanólico de *A. brasiliana* também é conhecido por bloquear a proliferação mitogênica induzida de linfócitos sem nenhum efeito tóxico (WAGNER et al., 1984). A planta também pode ser conhecida como sempre-viva, caaponga, carrapichinho, carrapichinho-do-mato, perpétua-do-brasil, perpétua-do-mato, quebra-panela, cabeça-branca, acônito-do-mato, ervanço, nateira, terramicina, infalível, doril, penicilina. Tem sua origem na América tropical.

Estudos fitoquímicos preliminares feitos com *A. brasiliana* indicaram a presença de terpenos, esteróides e compostos fenólicos. No extrato hexânico foi confirmada a presença de fitosterol e β -sitosterol. Esses compostos, juntamente com outros grupamentos existentes nas frações mais polares, podem justificar a ação analgésica, com potência equivalente ao ácido acetilsalicílico e ao paracetamol, evidenciada com o extrato hidroalcoólico desta espécie. Seis flavonóides foram isolados da *A. brasiliana*: canferol 3-O-robinobiosídeo-7-O-alfa-ramnopiranosídeo, quercetina 3-O-robinobiosídeo-7-O-alfa-L-ramnopiranosídeo, quercetina 3-O-robinobiosídeo, canferol 3-O-robinobiosídeo, canferol 3-O-rutinosídeo-7-O-alfa-L-ramnopiranosídeo e canferol 3-O-rutinosídeo (BROCHADO et al. 2003).



Figura 4. *Alternanthera brasiliana*. Em A pode se visualizar o galho da planta, enquanto em B é mostrado um detalhe dos galhos. Em C pode-se observar a sumidade florida e em D uma inflorescência axilar existente nesta planta. Fonte: <http://www.hortomedicinaldohu.ufsc.br>

2.1.2.5. *Senna macranthera*

Senna é um gênero parafilético e um dos maiores pertencentes à subfamília Caesalpinioideae. No Brasil, existem 81 espécies, 4 subespécies e 55 variedades (SOUZA, 2013). É comumente conhecida no Brasil como fedegoso, pau-fava, aleluia, mamangá, cabo-verde, manduirana, tararaçu, ibixuma. Em pesquisas clínicas, folhas de *S. macranthera* (Figura 6) demonstraram atividade *in vitro* antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, inseticida e propriedades antimaláricas (DAULAT et al., 2013). Em estudos com animais, folhas de Senna demonstraram efeitos anti-inflamatórios, anti-hepatósico, hipotensivo, espasmogênico, estimulador uterínico fraco, vasoconstritor, inibidor de hemólise e atividade inibitória de formação de peróxido de lipídio (OUDHIA, 2003).

Comunidades de um assentamento localizado em Araguari, Minas Gerais, utilizam chá medicinal de folhas de *S. macranthera* para combaterem a gripe (SILVA, 2005). O extrato etanólico de folhas de *S. macranthera* apresentou atividade biológica contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (NOGUEIRA, 2009) e potencial atividade contra bactérias de maneira geral. Em outra pesquisa, *S.*

macranthera mostrou sinergismo com ampicilina, canamicina, gentamicina e tetraciclina, conhecidos antibióticos, com uma redução no CIM em até oito vezes (SILVA et al., 2013).

A triagem fitoquímica do extrato metanólico e partições de *S. macranthera* permitiu a identificação de compostos fenólicos como flavonoides, taninos e cumarinas na maioria das amostras, com exceção da partição em hexano, que apresentou antronas, triterpenos e esteroides em sua composição (NOGUEIRA, 2009). Em extratos de diclorometano das raízes e acetato de etila das folhas foram isolados antraquinonas que se mostraram ativas contra cepas de *S. aureus* isoladas de animais com manifestação de mastite bovina (INOUE, 2014). O extrato acetato de etila de flores e raízes de *S. macranthera* foi estudado fitoquimicamente para isolamento dos seus compostos bioativos, sendo então isoladas as antraquinonas emodina, fisiona, e crisofanol, que possivelmente estão envolvidas no efeito antibacteriano (INOUE et al., 2015) (Figura 5 e Tabela 1).

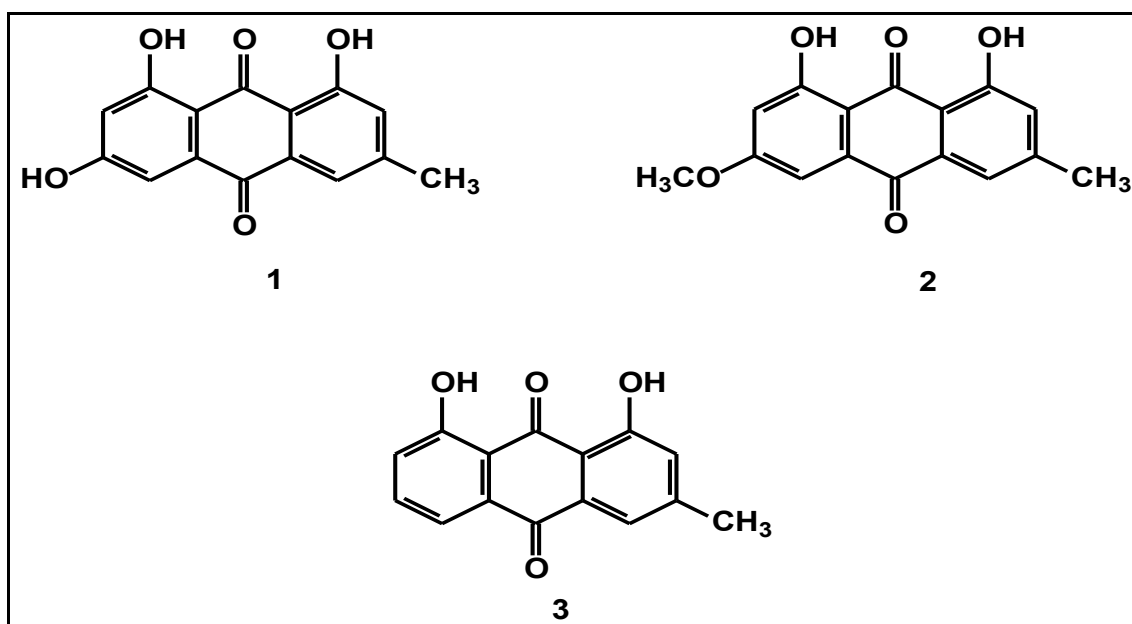


Figura 5. Compostos ativos isolados de raízes e flores de *Senna macranthera*.

A fórmula estrutural plana das antraquinonas emodina (1), fisiona (2), e crisofanol (3) pode ser visualizada. Sugere-se que estas antraquinonas estejam envolvidas em efeitos antibacterianos em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa (INOUE et al., 2015).

Tabela 1. Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos compostos isolados de *Senna macranthera*.

<i>S aureus</i>	Compostos			
	Emodina (1)	Fisiona (2)	Crisofanol (3)	Ciclopirox olamine
3828	60	120	190	50
4125	20	90	90	50
4158	40	100	190	50

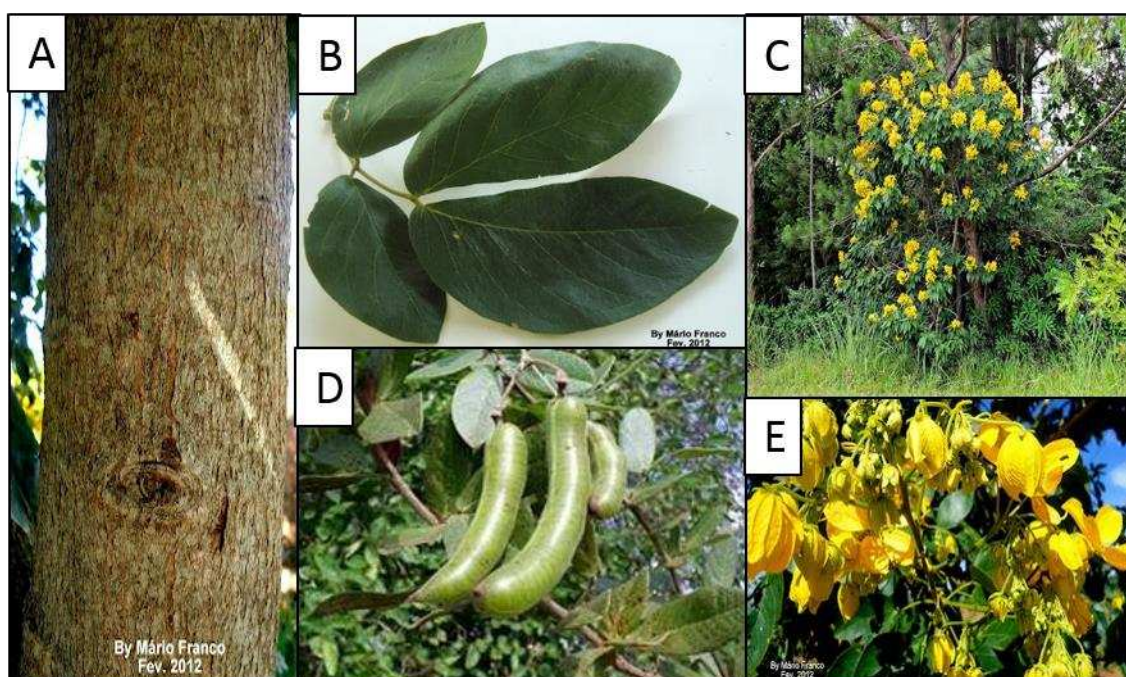


Figura 6. *Senna macranthera* ou fedegoso. Em A observa-se formato e detalhes do caule, enquanto que em B é possível visualizar as folhas e em D os frutos. Já em C temos uma visão da planta em seu habitat natural e em E são mostrados detalhes da sumidade florida. Fonte: <http://plantas-ornamentais.blogspot.com.br/2012/02/pau-fava-aleluia-senna-macranthera.html>

2.1.2.6. *Miconia latecrenata*

Miconia latecrenata (Figura 7) é uma espécie pertencente à família Melastomataceae, nativa do estado do Rio Grande do Sul na Mata Atlântica brasileira (SOBRAL et al., 2006). Comumente conhecida como jacatirão, pixeicuçu ou pixiricão, ainda não possui relato de utilização na medicina popular, apesar de possuir atividade antibacteriana relatada (SCIO et al., 2012). Foram encontrados em extratos metanólicos de *M. latecrenata* metabólitos secundários alcaloides, esteróis, saponinas e flavonoides (SCIO et al., 2012). A presença de tais metabólitos, associada a atividade antibacteriana do extrato vegetal abre a perspectiva de estudo no controle de bactérias. Estudos de espécies do gênero *Miconia* têm indicado potencial ação antibacteriana no extrato etanólico de folhas de *M. albicans*, *M. rubiginosa* e *M. stenostachiaya* em cepas de *S. aureus* e *E. coli* através de testes de difusão em ágar (RODRIGUES et al., 2008). Apesar do gênero apresentar perspectivas de atividade biológica e uso, poucos estudos foram realizados com a espécie *M. latecrenata*. Até o presente momento não existem estudos de caracterização química dos extratos da planta.

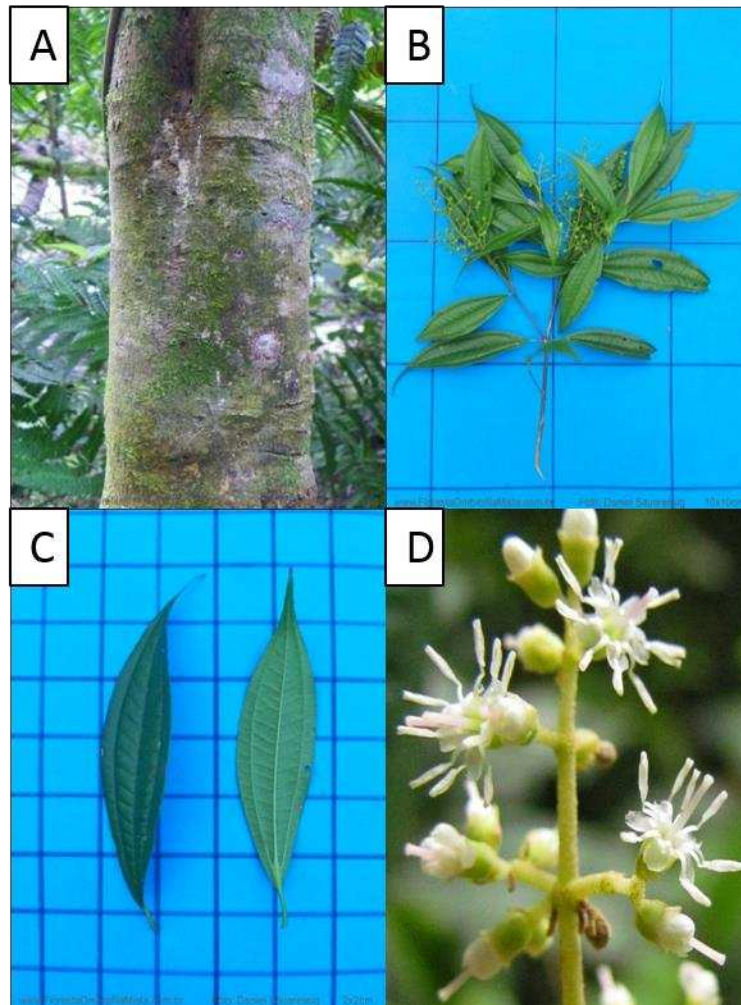


Figura 7. *Miconia latecrenata* ou Jacatirão. Podemos visualizar nesta figura regiões da planta potencialmente produtoras de metabólitos secundários com atividade biológica. Extratos feitos com cascas do caule (A) da planta, Galhos (B), Folhas (C) e flores (D) poderiam ter aplicações na medicina humana. Fonte em: (<http://florestaombrofilamista.com.br/sidol>)

2.2. Domissaneantes

Um produto se encaixa na categoria saneante/domissanitário, quando se destina à utilização em ambientes domiciliares, coletivos ou públicos ou no tratamento da água, em ambientes domiciliares (DE PAULA JUNIOR et. al, 2013). Denomina-se antissepsia as medidas propostas para inibir o crescimento ou destruir os microrganismos existentes nas camadas superficiais, microbiota transitória ou nas camadas profundas, microbiota residente da pele ou mucosa, por meio da aplicação de um germicida classificado como antisséptico (ANVISA, 2007). Esses produtos associam detergentes com antissépticos e são indicados para a higienização

antisséptica das mãos dos profissionais e para pele ou mucosa do paciente em áreas onde serão realizados procedimentos invasivos ou cirúrgicos (ANVISA, 2007).

2.2.1. Sabonetes

A higienização das mãos é reconhecida mundialmente como uma medida primária e muito eficiente no controle de infecções e transmissão de doenças. Por esse motivo, tem sido considerada como um dos principais meios de prevenção e de controle de infecções nos serviços de saúde, incluindo aquelas decorrentes da transmissão cruzada de microrganismos multirresistentes (ANVISA, 2009). Ao diminuir a tensão superficial da água, que funciona como solvente, os sabonetes e sabões permitem um maior contato de sujeiras e bactérias com o líquido, o que facilita a limpeza dos corpos (OLIVEIRA et al., 2006).

Sabonetes comuns possuem a capacidade de diminuir e eliminar a carga bacteriana de maneira eficaz mesmo sem o uso de agentes antissépticos, como por exemplo, o triclosan (Figura 8) (AIELLO et al., 2007). O mecanismo de ação proposto do triclosan sobre os microrganismos é baseado na inibição competitiva do sítio transportador de enoil-acil da proteína redutase, uma componente na via de biossíntese de lipídeos (VERMEIREN et al., 2002), assim, a consequente desorganização da membrana causa a morte celular do microrganismo. Por suas características antissépticas narradas na literatura, o sabonete é um potencial aliado e veículo para a atividade antibacteriana de extratos de plantas.

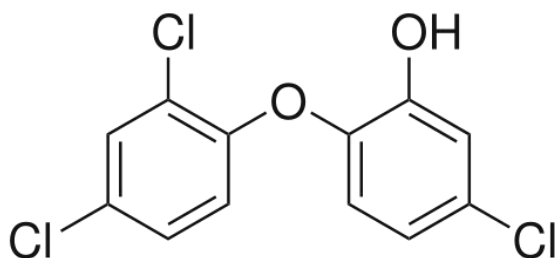


Figura 8. Fórmula estrutural plana da molécula de Triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxy)fenol).

2.2.2. Sabonetes Ativos

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é antigo e, por um longo tempo, produtos minerais, animais e vegetais foram a principal fonte de fármacos (ESQUENAZI et al., 2002). O uso de plantas pode representar uma alternativa de substituição aos antissépticos e desinfetantes sintéticos convencionais, visando evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana a estes compostos, já que metabólitos vegetais atuam por mecanismos variados (BARBOUR et al., 2004; MONTHANA; LINDEQUIST, 2005).

Atualmente, diversos estudos investigam moléculas antibacterianas naturais presentes em plantas e seus óleos essenciais com resultados muito promissores na busca de novas substâncias bioativas (MORAIS-BRAGA et al., 2013). As pesquisas relacionadas aos mecanismos de ação de antimicrobianos provenientes de plantas referem-se geralmente, aos óleos essenciais e seus constituintes tais como: eugenol, timol, carvacrol, dentre outros. Os possíveis mecanismos atribuídos a essas substâncias são: a degradação da parede celular, danos na membrana citoplasmática, danos às proteínas da membrana, liberação de conteúdos celulares, coagulação do citoplasma e perda da força próton-motriz. (SANTOS, 2013)

Alguns produtos naturais já tiveram o seu mecanismo de ação antimicrobiano investigado, tais como, os flavonoides, que atuam sobre proteínas extracelulares e na membrana bacteriana; os alcalóides, que se acumulam na célula bacteriana, interferindo na RNA polimerase, DNA girase, topoisomerase IV e nos ácidos nucleicos; as quinonas que formam complexos irreversíveis com as proteínas bacterianas; e os taninos que complexam proteínas essenciais ao microrganismo, inativando-as. (SANTOS, 2013)

Os sabões têm sido utilizados durante milhares de anos no cotidiano para higienização. São derivados de ácidos graxos ou triacilglicerídeos (óleos e gorduras) em seus derivados alquilados através de um processo conhecido como saponificação (KIRSNER, 1998). Atualmente, o sabonete antisséptico mais conhecido na área de saúde é o sabonete com triclosan, efetivo contra bactérias gram negativas bem como gram positivas. Entretanto, pesquisas apontam que não há evidências de que os sabonetes feitos com triclosan sejam mais efetivos para prevenir doenças de origem bacterianas do que os sabonetes neutros. Além disso, experimentos sugerem que, exposição de longa data ao triclosan poderiam causar

riscos à saúde como resistência bacteriana ou distúrbios hormonais (FDA, 2013). O mecanismo pontual de ação do Triclosan pode estar relacionado ao aparecimento de linhagens resistente a este antibiótico.

2.3. Mastite Bovina

Mastite é uma resposta inflamatória da glândula mamária (HILLERTON et al., 2005), considerada a doença de gado de leite mais comum ao redor do mundo (FESSLER et al., 2010). Entre os prejuízos trazidos incluem-se a redução da produção e/ou da qualidade do leite, o aumento dos custos com tratamentos e até mesmo o abatimento precoce das vacas em que a mastite se torna crônica (Müller, 2000). Aproximadamente 70% dos prejuízos advindos da mastite são devidos à redução do volume de leite produzido, embora prejuízos devido a danos irreversíveis no tecido mamário também sejam expressivos (ZHAO et al., 2008).

A mastite pode se originar de maneira ambiental ou por contágio. Bactérias coliformes ocupam os habitats onde o animal vive e por isso são consideradas patógenos ambientais (HOGAN, 1999). A transferência de bactérias gram-negativas das glândulas mamárias de animais infectados para aqueles não infectados é mínima se comparada à exposição constante ao ambiente. A mastite contagiosa é definida pela forma de transmissão de animal para animal, possui como reservatório o próprio animal (MARGATHO et al., 1998).

A mastite pode ser em clínica e subclínica. Na forma clínica, o animal apresenta sinais evidentes, tais como: edema, aumento de temperatura, endurecimento, dor na glândula mamária, grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite (FONSECA; SANTOS, 2000). Na forma subclínica, a mastite não apresenta alterações macroscópicas e sim alterações na composição do leite e não apresenta sinais visíveis de inflamação do úbere (CULLOR et al., 1994). O aumento na permeabilidade vascular da glândula mamária pode causar a passagem de substâncias do sangue para o leite, como sódio, cloro, imunoglobulinas, soroalbuminas, entre outras proteínas (MACHADO et al., 2000). Pode haver, além disso, alterações na composição do leite tais como aumento da Contagem de Células Somáticas, aumento dos teores de proteínas séricas, diminuição dos teores de caseína, lactose, gordura e cálcio do leite (FONSECA e SANTOS, 2007).

Coliformes gram-negativos frequentemente causam uma inflamação aguda e eventualmente mastite severa. *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella*

pneumoniae e *Serratia marcescens* são quatro bactérias coliformes comumente associadas à mastite (MARONEY, 2005).

Apesar da glândula mamária não ser considerada um habitat natural de bactérias coliformes, muitas cepas são capazes de ali sobreviver, multiplicar, ou mesmo permanecer em estado de dormência (HOGAN, 2003). Enquanto são destruídos pelo sistema imune da vaca, os coliformes liberam endotoxinas, que são responsáveis por muito dos sinais associados com a mastite causada por Gram-negativos, como febre alta, diminuição de apetite, rápida perda de peso, leite anormal, e diminuição na produção leiteira (MARONEY, 2005).

No caso de *E. coli*, a infecção ocorre principalmente próximo ao período do parto e durante o início da lactação devido a deficiências na função e número de neutrófilos, podendo aparecer severos sintomas clínicos (BURVENICH, et al., 2003; HOGAN, 2003). O uso de antibióticos no tratamento de infecções por bactérias coliformes é geralmente considerado desnecessário, pelo fato de a infecção ser curada espontaneamente ou por ser normalmente de curta duração (HOGAN, 2003). A resposta imune do animal é altamente bem sucedida na destruição destas bactérias (MARONEY, 2005). Entretanto, relatos revelam o aumento da frequência de infecções crônicas por *E. coli* em alguns rebanhos devido à habilidade do microrganismo de persistir no úbere bovino, mas este fenômeno tem sido considerado relativamente raro e de baixa importância clínica (HOGAN, 1999).

Bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* são consideradas patógenos contagiosos, responsáveis por casos clínicos e subclínicos (HENSEN et al., 2000; BURVENICH et al., 2003). O microrganismo *S. agalactiae* é um dos agentes causais significativos de mastite crônica em muitos rebanhos, mesmo podendo ser rapidamente eliminado (KEEFE, 1997; ESTUNINGSIH et al., 2002). Assim como acontece com *S. aureus*, a aderência às células epiteliais do hospedeiro é o primeiro passo crítico para o progresso do processo de infecção por *S. agalactiae* (KONTO-GHIORGI et al., 2009). Apesar de esse microrganismo poder sobreviver por longos períodos no interior da glândula mamária, é suscetível a muitos antibióticos, como penicilina, ampicilina, cefazolina, cefotaxima e vancomicina, o que torna possível a erradicação em um rebanho fechado (CASTOR et al., 2008). Normalmente causa um tipo de infecção leve e persistente que tem uma baixa capacidade de cura pelo sistema imunológico do animal (PIEPERS et al., 2009).

O microrganismo *S. aureus* é o principal agente causador de mastite contagiosa no gado leiteiro e produz uma gama de fatores de virulência que contribuem para a patogênese. Sua extensa cápsula protege a célula do sistema imunológico do animal (ZADOKSET al., 2002; CENCI-GOGA et al., 2003). *S. aureus* está comumente associado a infecções crônicas, possivelmente devido à capacidade da bactéria em viver intracelularmente (HEBERT et al., 2000). O patógeno também pode ser encontrado no leite, onde altos níveis de contaminação podem ser rapidamente alcançados se as condições forem favoráveis (SILVA et al., 2000). *S. aureus* é altamente resistente a condições ambientais adversas, o que o configura como um importante patógeno (MATOUSKOVA, 2008). É um agente patogênico oportunista e a sua superfície é recoberta com proteínas que são covalentemente ancoradas nos peptídeoglicanos da parede celular. Uma análise estrutural e funcional identificou quatro classes distintas de proteínas de superfície, das quais a MSCRAMMs é a maior classe. Estas proteínas de superfície têm 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).

A eliminação das bactérias abrange vários fatores a serem considerados como a resistência bacteriana e a formação de biofilmes durante a colonização da glândula mamária. *S. aureus* pode produzir biofilmes e uma vez estabelecidos são resistentes ao tratamento antimicrobiano e à resposta imunológica do hospedeiro sendo, portanto responsáveis por infecções recorrentes (ARCHER et al., 2011).

A maior parte da atividade bacteriana na natureza ocorre não como células individualizadas, mas sim como comunidades sésseis, com diferentes graus de complexidade em estruturas conhecidas como biofilmes (WATINICK, 2000). Em um biofilme, os microrganismos representam menos de 10% da massa seca, enquanto a matriz pode representar até 90% (FLEMING, 2010). Além de água e células microbianas, a matriz do biofilme é formada por um complexo de polímeros secretados (EPS). Os EPS são constituídos por partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros (PARIZZI et al., 2004). Ensaio *in vitro* têm indicado que células bacterianas em biofilmes (sésseis) podem se tornar substancialmente mais resistentes à ação de antibióticos do que aquelas cultivadas de forma planctônica (SMITH, 2005).

Existem vários mecanismos que descrevem a formação de biofilmes. Dentre eles, dois são consideradas fundamentais no estudo bacteriano. No primeiro

mecanismo, a formação do biofilme aconteceria em duas fases. A primeira fase seria um processo reversível, conhecido como adesão. A interação entre bactéria e superfície ocorrem por forças de Van der Waals e atração eletrostática. Na segunda fase, inicia-se a formação propriamente dita e irreversível do biofilme. Uma interação física entre a célula e a superfície ocorre por meio de um material extracelular de natureza polissacarídea ou proteica, produzida pela bactéria. Esse material é denominado matriz de glicocálix e é o suporte na formação dos biofilmes (FLEMING, et al. 2010). Outro mecanismo bem aceito sugere que a formação do biofilme ocorre em cinco etapas: 1) condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; 2) transportes de células e nutrientes para o sítio de aderência; 3) início do processo de adesão bacteriana por atração eletrostática; 4) crescimento celular e colonização irreversível; 5) biofilme em atividade metabólica (CHARACKLIS, 1983)

Na indústria de laticínios, a formação de biofilmes dentro da linha de produção eleva a carga microbiana e, muitas vezes, contamina com patógenos os alimentos devido ao eventual desprendimento de porções aderidas. Assim, a saúde do consumidor poderia ser colocada em risco, além de ocasionar prejuízos financeiros à indústria, em decorrência da diminuição da vida de prateleira dos produtos alimentícios. Por isso, a investigação de formação de biofilmes por linhagens de *Staphylococcus* antes e após a higienização dos equipamentos da indústria beneficiadora de leite, pode representar um fator de chave para garantir a não intoxicação do consumidor (DOS SANTOS, 2009).

Atualmente, o tratamento de infecções intramamárias bovinas é baseado no uso de antibióticos, e devido ao aumento da resistência bacteriana aos tratamentos tradicionais, tem-se desenvolvido maneiras alternativas para erradicação das bactérias causadoras da mastite. Entretanto, como alguns patógenos se tornaram resistentes à maioria dos antibióticos mais comuns, limitam-se as opções de tratamento (JAYARAMAN, 2008). Assim, faz-se necessário o estudo e caracterização de diferentes compostos com atividade antimicrobiana, como por exemplo, metabólitos secundários originários de plantas. Esses produtos podem ter aplicações em diferentes estratégias e frentes de prevenção. Uma dessas etapas é a lavagem de mãos e das mamas onde se utilizam sabonetes. Dessa forma a utilização de sabonetes ativos com produtos naturais poderia ser uma alternativa ao método de lavagem atual.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- ✓ Avaliar produtos fitossanitários alternativos para prevenção e controle de bactérias causadoras de mastite bovina.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a atividade antibacteriana de extratos orgânicos oriundos da extratoteca do laboratório de Química e Bioquímica de Produtos Naturais “BioNat”;
- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima dos extratos ativos;
- ✓ Testar a viabilidade celular em função da concentração do(s) extrato(s);
- ✓ Avaliar os efeitos do(s) extrato(s) sobre biofilme dos patógenos;
- ✓ Obter sabonetes sólidos contendo os extratos das plantas ativas;
- ✓ Avaliar o efeito *in vitro* dos sabonetes para a atividade antibacteriana;
- ✓ Analisar a eficácia do sabonete obtido como produto fitossanitário;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Extratos Utilizados

Os extratos foram utilizados a partir da extratoteca do laboratório “BioNat” Laboratório de Química e Bioquímica de Produtos Naturais, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Os extratos do laboratório foram obtidos de acordo com os dados contidos na Tabela 2.

Tabela 2. Plantas utilizadas, Técnica de extração, solvente e partes da planta utilizada para a obtenção dos extratos

Planta	Técnica de Extração	Solvente	Parte utilizada
<i>Salvia officinalis</i>	Maceração	Hidroalcoólico 80:20	Folhas
<i>Psychotria vellosiana</i>	Maceração	Etanol 96°	Folhas
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Maceração	Diclorometano	Folhas
<i>Alternanthera brasiliana</i>	Maceração	Hidroalcoólico 80:20	Folhas
<i>Senna macranthera</i>	Maceração	Acetato de etílica	Flores
<i>Miconia latecrenata</i>	Maceração	Liofilizado aquoso	Folhas

4.2. Bioensaio para atividade antibacteriana dos extratos

4.2.1. Microrganismos utilizados

Como microrganismos indicadores para atividade antibacteriana, foram utilizadas as cepas 3828, 4125 e 4158 de *S. aureus* isoladas de animais que apresentaram mastite bovina. Essas cepas de *S. aureus* foram gentilmente cedidas pela Embrapa/CNPGL, Juiz de Fora, no Estado de Minas Gerais, isoladas de animais com sintomas de mastite bovina.

As bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3-4 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido e cresceram em estufa *overnight* a 37 °C. Foram transferidos 1 mL do inóculo de cada bactéria e 1 mL do branco (meio estéril) para microtubos distintos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de

onda de 595 nm. O controle branco foi utilizado para calibrar o aparelho. As amostras que não apresentaram absorção entre 0.100 a 0.190 foram diluídas em série, até obter a leitura mencionada. Obtido a absorção desejada, realizou-se duas diluições seriadas 1:10, afim de se obter a concentração de 10^6 UFC mL⁻¹ para o plaqueamento das bactérias.

4.2.2. Preparo das soluções de extratos e do controle positivo

Os extratos foram pesados em balança analítica e, transferidos para um microtubo contendo DMSO (Vetec®) a uma concentração final de 50 mg mL⁻¹. A amostra foi sonicada por 20 minutos para garantir melhor diluição do extrato. Para o controle positivo, soluções do antibiótico Ciclopirox olamina (Fungirox®) foram preparadas a uma concentração de 5 mg mL⁻¹ e armazenadas a - 20 °C.

4.2.3. Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada segundo a técnica de difusão em ágar pelo método *hole plate* em meio Mueller-Hinton (Himedia®) (BAUER et al., 1966). Após crescimento por 24h a 37 °C, a suspensão bacteriana foi diluída para a concentração final de 10^6 UFC mL⁻¹ acrescida a 20mL de meio Ágar Mueller-Hinton. Após solidificação, furos de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos no ágar. Foram inoculados em cada poço 8-10 µL de extrato vegetal, na concentração de 50 mg mL⁻¹, DMSO (controle negativo) e ciclopirox olamina (5 mg mL⁻¹ diluído em DMSO, controle positivo).

As placas foram colocadas em estufa de crescimento a 37 °C, *overnight*. Após esse período, os halos de inibição foram medidos em milímetros. O teste foi realizado em triplicata. As médias e os desvios padrões dos halos de inibição foram calculados e uma análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey a 5% de significância foi feita pelo Excel.

4.2.4. Determinação da concentração inibitória mínima dos extratos

Os extratos que apresentarm atividade biológica na triagem anterior foram testados quanto a Concentração Inibitória Mínima (CIM) em placa de 96 poços. O equivalente a 200 mg mL⁻¹ de extrato foi diluída em DMSO para a realização dos testes. Os poços foram preenchidos com 180 µL de meio BHI (Himedia®) e uma

suspensão bacteriana ajustada para concentração final de 10^6 UFC mL⁻¹. Adicionaram-se então os extratos que apresentaram atividade antibacteriana nos testes anteriores.

As concentrações finais testada foram 5 mg mL⁻¹, 4 mg mL⁻¹, 3 mg mL⁻¹, 2 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹, 0,9 mg mL⁻¹, 0,8 mg mL⁻¹, 0,7 mg mL⁻¹, 0,6 mg mL⁻¹, 0,5 mg mL⁻¹, 0,4 mg mL⁻¹, 0,3 mg mL⁻¹, 0,2 mg mL⁻¹ e 0,1 mg mL⁻¹. A microplaca foi mantida a 37 °C por 24 h e a CIM foi estimada como a menor concentração na qual não foi visualmente observada turbidez do meio ou crescimento bacteriano. A CIM do antibiótico (Ciclopirox olamina) sobre os isolados foi feita utilizando o mesmo procedimento. Poços contendo apenas meio BHI foram utilizados como controle negativo. Poços com meio BHI e a bactéria de foram o controle positivo.

Após incubação por 24 horas, foram adicionados quatro microlitros do sal MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5 - difeniltetrazólio bromido) na concentração de 2 mg mL⁻¹. A determinação da CIM foi qualitativa e visual, uma vez que os poços com bactérias viáveis são de coloração azul e os poços com bactérias mortas permanecem com a coloração do meio de cultura após o tratamento com o composto. Considera-se o valor da Concentração Inibitória Mínima a concentração do poço sem coloração seguido por um poço com crescimento bacteriano.

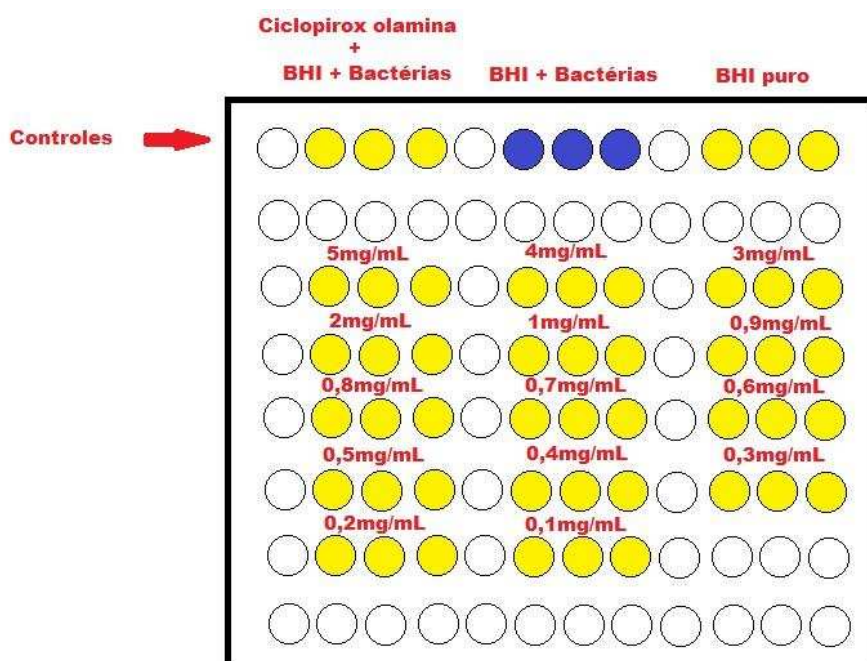


Figura 9. Esquema da Placa de ELISA para determinação da Concentração Inibitória Mínima

4.2.5. Avaliação de viabilidade celular em função da concentração dos extratos

A viabilidade celular foi observada seis horas após a inoculação de 1,0 mL de cultura bacteriana contendo 10^8 UFC mL⁻¹ em tubos de ensaio com 9,0 mL de tampão fosfato 5 mM, em pH 6,5, contendo a CIM do(s) extrato(s) que apresentaram atividade biológica. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C. Em seguida, alíquotas de 20 µL foram retiradas dos tubos, diluídas serialmente em 180 µL de BHI previamente adicionados em microplacas estéreis de 96 poços. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 6 h. Os testes foram realizados em triplicata. Após as 6 horas, adicionou-se 4 µL do sal MTT e realizou-se uma leitura espectrofotométrica em leitor ELISA. A partir da leitura espectrofotométrica realizada no leitor ELISA foi determinada a viabilidade celular das bactérias. Aplicou-se a seguinte equação segundo o método do Cálculo da Viabilidade Bacteriana (GUDIÑA et al., 2010):

$$\% \text{ Inibição do crescimento bacteriano} = [1 - (Ac/A0)] \times 100$$

em que:

Ac: é a média das absorvâncias por concentração de substância testada

A0: é a média das absorvâncias do controle de crescimento bacteriano.

O resultado obtido representa a porcentagem de células bacterianas que a substância testada foi capaz de inibir.

4.2.6. Efeito do(s) extrato(s) sobre o Biofilme

Alíquotas de 180 µL de meio BHI foram distribuídas em poços de uma microplaca e inoculadas com suspensão bacteriana para concentração final de 10^6 UFC mL⁻¹. Após incubação a 37 °C por 24 h, o sobrenadante foi retirado e os poços foram lavados três vezes com 300 µL de solução salina 0,85%. Os poços foram preenchidos novamente com 200 µL de BHI contendo diferentes concentrações dos extratos ativos (CIM, ½ CIM, ¼ CIM, 1/8 CIM e 1/16 CIM). Foi feita uma nova incubação a 37 °C por 24 h para determinação da concentração inibitória de biofilme (CIB), definida como a concentração em que não havia visualmente crescimento da bactéria. As placas foram reveladas com MTT e os testes foram realizados em triplicata.

4.2.6.1. Incubação das bactérias nas microplacas

Em microplaca de 96 poços preencheu-se com 100 µL de meio BHI e 100 µL da suspensão bacteriana (concentração final de 10^6 UFC mL⁻¹). As microplacas foram levadas à estufa numa temperatura 37°C por 24 horas, para que ocorresse o crescimento bacteriano e a formação do biofilme.

4.2.6.2. Aplicação dos extratos no biofilme formado

Tendo formado o biofilme, foi retirado cuidadosamente o sobrenadante dos poços. Foram inoculadas alíquotas de 200 µL contendo o meio BHI e diferentes concentrações dos extratos (2 CIM, CIM, ½ CIM) em cada poço. As microplacas foram levadas para estufa a 37 °C por 24 horas.

4.2.6.3. Revelação das microplacas

Após 24 horas foi retirado o sobrenadante de cada poço e o biofilme foi adicionado 200 µL de solução salina. Dessa nova solução foram retirados 20 µL e colocados em uma nova microplaca que já estavam com 180 µL de meio BHI em cada poço. Logo após foi feita uma diluição seriada. Esse procedimento foi realizado em duplicata para cada concentração (2 CIM, CIM, ½ CIM) de cada extrato. Para revelar a presença ou não de bactérias nesses poços (se o biofilme teria sido inibido ou não) foram adicionados 20 µL do sal MTT (5 g.L⁻¹). As microplacas foram incubadas por mais 20 minutos.

Foi feito um controle utilizando apenas meio BHI sem extrato e um controle utilizando antibiótico em 3 diferentes concentrações e meio BHI. A leitura realizada é qualitativa e visual, uma vez que os poços com bactérias vivas são de coloração azul e os poços com bactérias mortas permanecem com a coloração do meio de cultura.

4.3. Produção dos Sabonetes

Cada sabonete foi produzido segundo os métodos protegidos pelas patentes PI 1005633-5 e PI 1103394-0. Os sabonetes foram obtidos com os extratos das plantas presentes na extratoteca do BioNAT (Laboratório de Bioquímica e Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Viçosa). Para os sabonetes, os extratos de *S. officinalis*, *P. vellosiana* Benth, *B. dracunculifolia*, *A. brasiliana*, *S.*

macranthera e *M. latecrenata* foram pesados para a concentração final de extrato de 10 mg g⁻¹.

4.4. Determinação da concentração inibitória mínima dos sabonetes

Os sabonetes obtidos com os extratos que apresentaram atividade biológica foram testados para a Concentração Inibitória Mínima. O procedimento foi realizado por diluição em microplaca de 96 poços. Uma concentração de 100 mg mL⁻¹ de sabonete com suspensão 2% de extrato foi diluída em DMSO para a realização dos testes. Os poços foram preenchidos com 180 µL de meio BHI e uma suspensão bacteriana ajustada para concentração final de 10⁶ UFC mL⁻¹.

As concentrações finais testadas foram de: 2,5 mg mL⁻¹; 2 mg mL⁻¹; 1,5 mg mL⁻¹; 1 mg mL⁻¹; 0,5 mg mL⁻¹; 0,45 mg mL⁻¹; 0,4 mg mL⁻¹; 0,35 mg mL⁻¹; 0,3 mg mL⁻¹; 0,25 mg mL⁻¹; 0,2 mg mL⁻¹; 0,15 mg mL⁻¹; 0,1 mg mL⁻¹; 0,05 mg mL⁻¹. A microplaca foi mantida a 37°C por 24 h e a CIM foi estimada como a menor concentração na qual não foi visualmente observada turbidez do meio ou crescimento bacteriano. A CIM do antibiótico (Ciclopirox olamina) sobre os isolados foi feita utilizando o mesmo procedimento. Meio BHI foi utilizado como controle negativo.

Após incubação por 24 horas, foram adicionados 4 µL do sal MTT na concentração de 2 mg mL⁻¹, de forma a facilitar a visualização das células bacterianas viáveis, uma vez que o MTT em contato com a cultura bacteriana apresenta coloração roxa. As microplacas foram incubadas por mais 20 minutos. Os testes foram realizados em triplicata.

4.4.1. Cálculo da Densidade Ótica (D.O.) para confirmação de 10⁶ UFC mL⁻¹

Uma alíquota de um mililitro de solução bacteriana e de um mililitro do meio BHI foram colocados em microtubos estéreis. Utilizou-se um espectrofotômetro para a medida da D.O a 560nm. O equipamento foi zerado com água destilada e após, com o meio BHI estéril (1:10 v/v água destilada). Realizou-se a leitura da bactéria diluída (1:10 v/v) e sucessivas diluições até obter-se uma leitura de absorvância próxima de 0,1 ± 0,015. A absorvância de 0,1 indica uma Densidade Ótica com a existência de 10⁸ UFC mL⁻¹. Então, após o ajuste, realizou-se mais 2 diluições de 1:10 para se ter certeza de que a suspensão para aplicação nas placas de *petri* continham 10⁶ UFC mL⁻¹.

4.5. Avaliação da Eficácia dos sabonetes

4.5.1. Teste das luvas

Segundo a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde o projeto foi submetido à apreciação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humano (CEP) da Universidade Federal de Viçosa para pesquisa em campo de bactérias. O projeto foi autorizado sob o parecer de número 773.182 na 5ª Reunião em 1 de setembro de 2014.

O efeito dos sabonetes com os extratos que apresentaram maior atividade antibacteriana *in vitro*, foi avaliado para atividade de teste em campo tendo como controle negativo um sabonete neutro sem o extrato. Foram selecionados ordenhadores, com a utilização de luvas de látex, para manipularem animais diagnosticados pelo Setor de Gado Leiteiro com mastite clínica. Três pares de luvas por sabonete foram coletadas e esfregadas com utilização da técnica de *swab* (Andrade, 2008). As hastes flexíveis com ponta de algodão foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo soro fisiológico estéril.

As luvas foram submetidas a um processo de lavagem segundo o seguinte protocolo: imersão por 30 segundos em recipiente com a devida suspensão preparada com o sabonete em água e imersão em água por três vezes; imersão final com água destilada esterilizada e secagem natural das luvas por agitação. Após a limpeza padronizada, as luvas dos ordenhadores foram novamente esfregadas com *swabs*, acondicionados em tubos de ensaio contendo um mililitro de soro fisiológico estéril para comparação com o grupo que não sofreu os procedimentos. Alíquotas de 100 µL do soro fisiológico contendo o respectivo tratamento foram espalhadas com o auxílio de alça de Drigalsky em placas de petri com Muller-Hinton-Ágar. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e posteriormente foi observada a presença ou ausência de colônias bacterianas. Como controles, luvas foram imersas em água destilada ou luvas foram imersas em sabonetes neutros, sem extratos. A taxa de mortalidade foi determinada pela contagem de microrganismos viáveis na placa. Os testes foram realizados em triplicata.

4.6. Análises Estatísticas

Os dados foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey a 5% de significância em Excel[®] e gráficos construídos no software GraphPad Prism 5[®].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da atividade bactericida dos extratos

Os extratos de *S. officinalis*, *P. vellosiana*, *B. dracunculifolia*, *A. brasiliana*, *M. latecrenata* e *S. macranthera* foram avaliados em relação a sua atividade antimicrobiana através do método de *Hole Plate* utilizando-se o microrganismo *S. aureus* cepas 3828, 4125 e 4158 isoladas de animais com manifestação clínica de mastite bovina. Na Figura 10 é possível visualizar o efeito dos extratos sobre a linhagem *S. aureus* 3828 através da observação do aparecimento de halos de inibição, que foram medidos em milímetros.

As análises estatísticas (Anexo1) sugeriram a ausência de diferença significativa entre o controle positivo (Ciclopirox olamina) e o extrato de *S. macranthera* para a linhagem *S. aureus* 3828. Já o extrato de *S. officinalis* apresentou inibição significativamente menor que o extrato de *S. macranthera*, sendo, portanto, menos eficiente. Todavia este mesmo extrato se mostrou mais efetivo que os outros, sendo significativamente maior que *P. vellosiana*, que também foi maior que os extratos de *Miconia latecrenata*, *Alternanthera brasiliana* e *Baccharis dracunculifolia*, que não diferiram estatisticamente entre si.

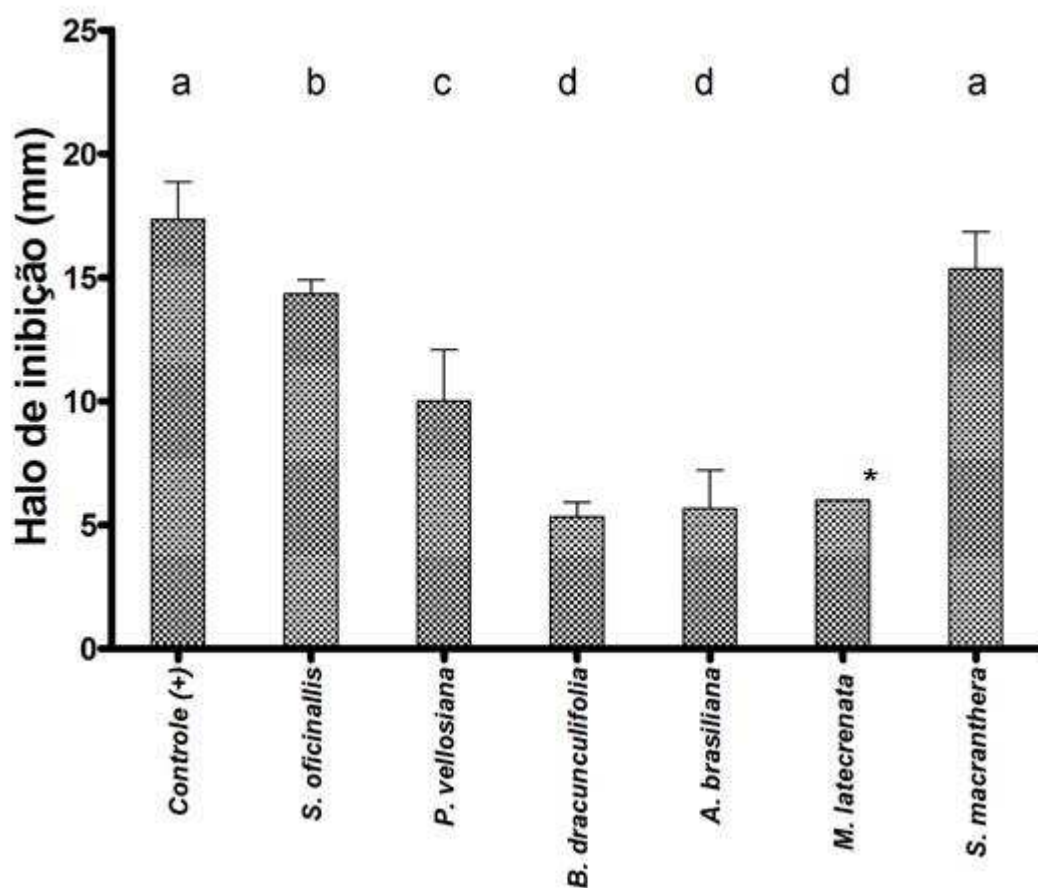


Figura 10. Efeito dos extratos testados sobre a linhagem bacteriana *Staphylococcus aureus* 3828.

Em placa contendo bactérias cultivadas, foram aplicados os extratos em poços definidos. Medidas de halo de inibição provocados por cada um desses extratos foram aferidas. É possível visualizar o destaque dos extratos de *Senna macranthera* e *Salvia officinalis* neste experimento. Amostras com o mesmo índice ^{abcd}, não diferem estatisticamente entre si. Amostras com índices diferentes ^{abcd} diferem estatisticamente em teste de Tukey a 5% de significância.

**Miconia latecrenata* não apresentou desvio padrão entre as três leituras de medida de halo.

Na Figura 11 é possível visualizar o efeito dos extratos sobre a linhagem *S. aureus* 4125. As análises estatísticas (Anexo 2) sugeriram que contra esta linhagem, o controle positivo se mostrou significativamente mais efetivo que todos os extratos testados. Já os extratos de *S. macranthera*, *S. officinalis* e *P. vellosiana*

apresentaram inibição significativamente iguais entre si, porém maiores que os outros extratos testados, que não diferiram entre si.

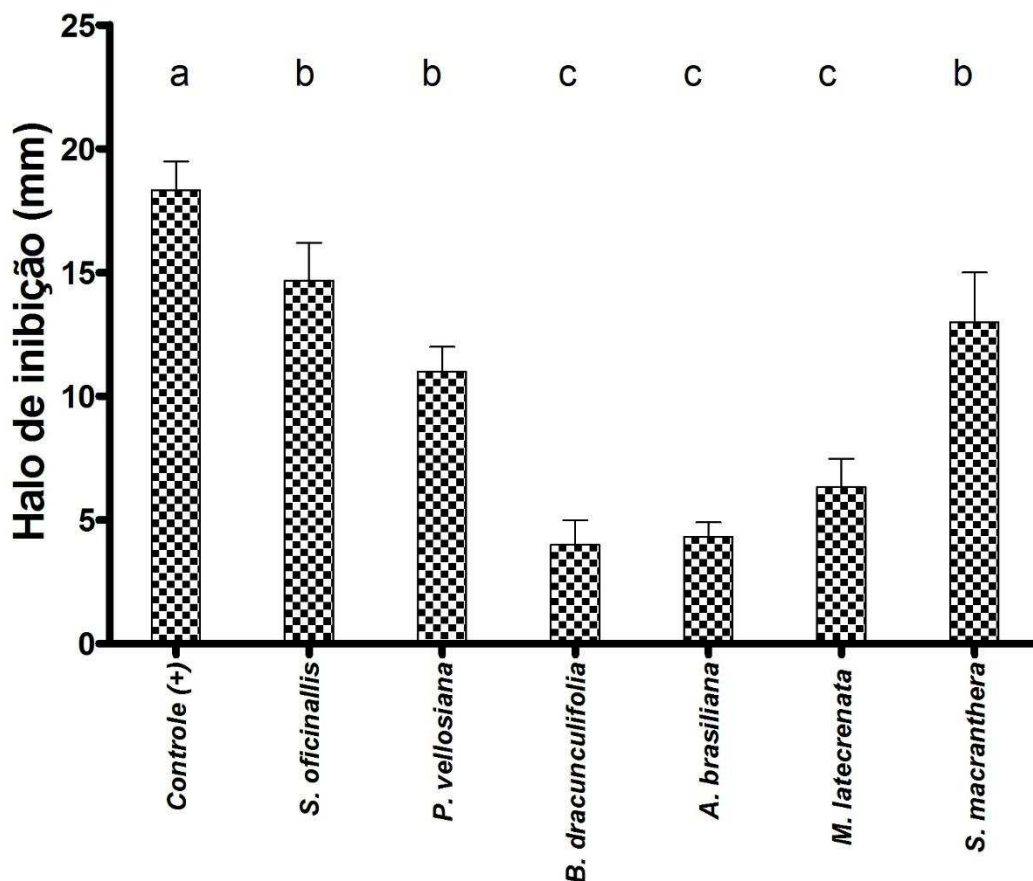


Figura 11. Efeito dos extratos testados sobre a linhagem bacteriana *Staphylococcus aureus* 4125.

Em placa contendo bactérias cultivadas, foram aplicados os extratos em poços definidos. Medidas de halo de inibição provocados por cada um desses extratos foram aferidas. Dentre os extratos testados, os melhores resultados foram apresentados por *Salvia officinalis*, *Psychotria vellosiana* e *Senna macranthera*. Amostras com o mesmo índice ^{abcd}, não diferem estatisticamente entre si. Amostras com índices diferentes ^{abcd} diferem estatisticamente em teste de Tukey a 5% de significância.

Uma terceira linhagem de *S. aureus* foi testada, a linhagem 4158. Na Figura 12, é possível verificar os halos de inibição promovidos por cada extrato. Os extratos de *S. officinalis* foi tão eficiente quanto o extrato de *S. macranthera*, sendo

seguidos, em termos de eficiência significativa, por *P. velosiana*. Este último foi superior aos outros extratos testados, de acordo com a análise estatística (Anexo 3).

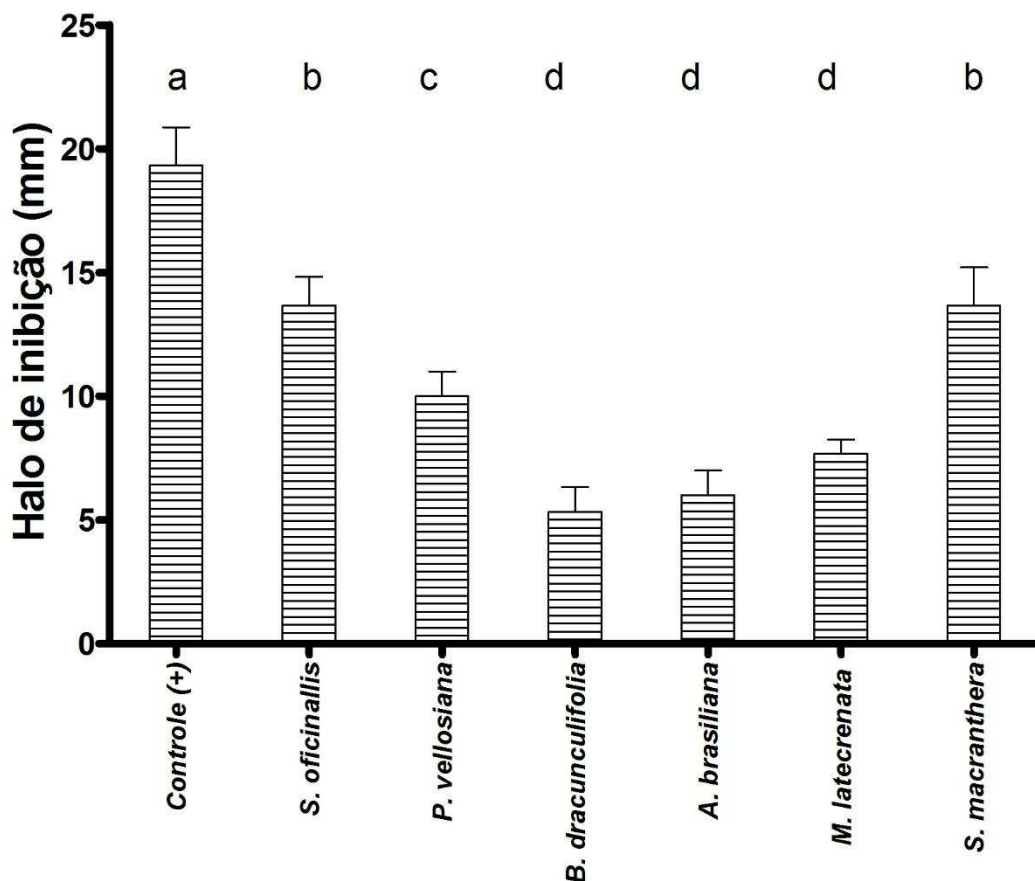


Figura 12. Efeito dos extratos testados sobre a linhagem bacteriana *Staphylococcus aureus* 4158.

Em placa contendo bactérias cultivadas, foram aplicados os extratos em poços definidos. Medidas de halo de inibição provocados por cada um desses extratos foram aferidas. Dentre os extratos testados, os melhores resultados foram apresentados por *Salvia officinalis* e *Psychotria velosiana*. Amostras com o mesmo índice ^{abcd}, não diferem estatisticamente entre si. Amostras com índices diferentes ^{abcd} diferem estatisticamente em teste de Tukey a 5% de significância.

Outros autores já investigaram os efeitos de alguns dos extratos vegetais analisados, os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com Silva, que em 2012 reportou halos de inibição para *S. officinalis* de até 20 mm e 15,66 mm para *S. macranthera*. O mesmo autor encontrou valores duas vezes maior que o encontrado

neste trabalho para a inibição de *S. aureus* 4125 utilizando extrato de *B. dracunculifolia*. Já Gontijo (2012) apresentou dois perfis conflitantes com os resultados: para *P. vellosiana*, não relatou inibição e para *M. latecrenata*, um halo de 23,5 mm também para a cepa 4125 de *S. aureus*. No presente trabalho foi encontrado inibição contra a linhagem 4125 nos dois extratos. Em outros trabalhos presentes na literatura, os critérios de inibição desejados em uma triagem são arbitrários e não é consenso entre os pesquisadores. Nascimento et al., (2000) considera como inibição desejada halos acima de 7 mm. A atividade antimicrobiana de *Salvia officinalis* já havia sido reportada por Weckesser et al. (2007) e Kermanshah et al. (2009), é possível encontrar até sugestão de uso odontológico devido à sua grande potencialidade para o controle bacteriano (Diaz, 2015). Frente a outras plantas do cerrado, *B. dracunculifolia* apresentou boa inibição antimicrobiana contra linhagem de *S.aureus* isolada de leite mastífero no trabalho de Nader e colaboradores em 2010. Já Uchôa, em 2014, enaltece os potenciais antimicrobiano, antiinflamatório e antioxidante de *A. brasiliana*.

Por se destacarem com inibições superiores dentre os extratos testados, os extratos de *S. officinalis*, *P. vellosiana* e *S. macranthera* foram selecionados para outros testes e determinações avançando na triagem.

5.2. Concentração Inibitória Mínima dos extratos

Após a seleção de quais extratos poderiam ter atividade biológica desejada, foi necessário determinar a CIM desses extratos. Esta determinação é importante em termos efetivos e econômicos. A CIM dos extratos de *S. macranthera*, *S. officinalis* e *P. vellosiana* foi determinada. CIM é definida como a menor concentração em que um composto/extrato apresenta inibição da atividade bacteriana. Assim, quanto menor for a concentração de um extrato necessária para a inibição, melhor será a sua atividade antibacteriana. Um exemplo deste experimento pode ser observado na Figura 13, que exhibe a inibição de crescimento bacteriano após incubação com diferentes concentrações dos extratos. A revelação com MTT, um composto solúvel em água, que em presença de células que realizam respiração é degradado a um composto púrpura e insolúvel, permite a visualização do crescimento e viabilidade ou não de bactérias (MOSMANN, 1983). Na figura supracitada, nos poços E10, E11 e E12 (0,6 mg mL⁻¹) é possível visualizar crescimento bacteriano. Já nos poços E6, E7

e E8 (0,7 mg mL⁻¹) não houve crescimento bacteriano, sugerindo que a concentração deste poço seja o suficiente pra inibir o crescimento bacteriano. A Tabela 3 informa os resultados obtidos neste experimento para os extratos em relação às diferentes linhagens de *S. aureus*.

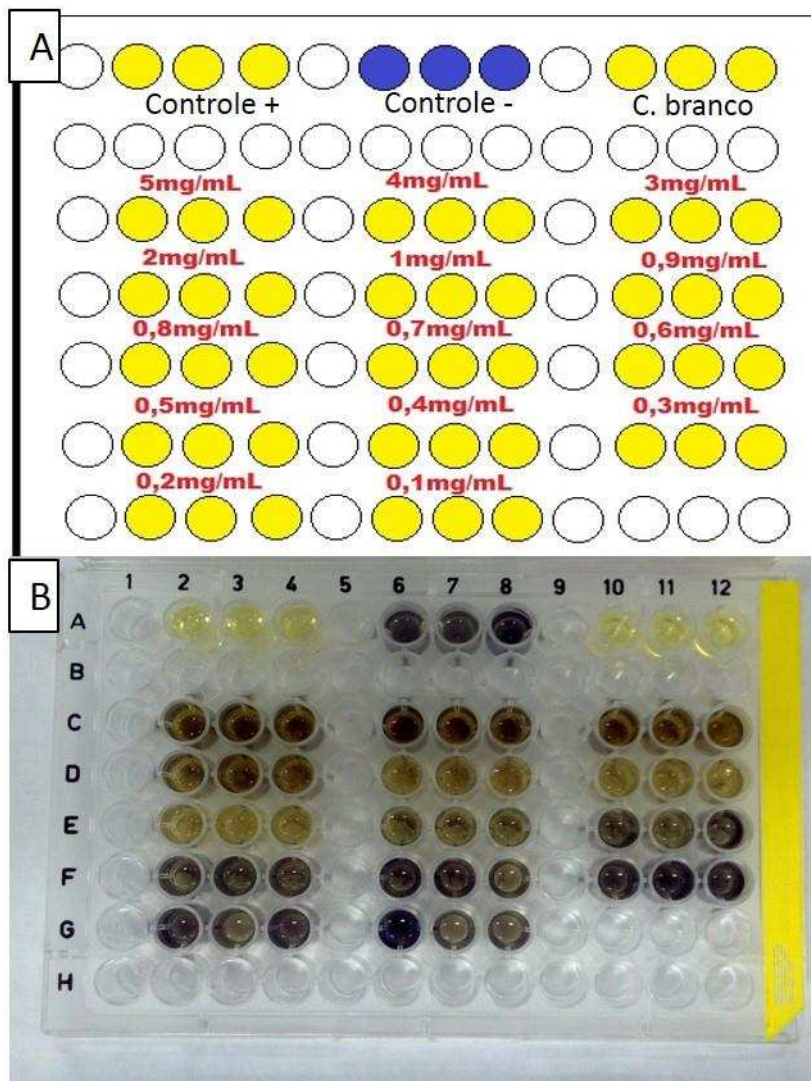


Figura 13. Exemplo de ensaio de determinação de Concentração Inibitória Mínima de extrato de *Salvia officinalis* sobre a cepa 4158 de *Staphylococcus aureus*.

Em A temos o mapa da placa utilizada com os controles e as concentrações utilizadas nos experimentos. Em B temos a microplaca onde foi realizado o ensaio. Os dados apresentados sugerem que a concentração de 0,7 mg mL⁻¹ é o suficiente para promover inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* 4158

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima dos extratos ativos de *Senna macranthera*, *Salvia officinalis* e *Psychotria vellosiana Benth* para as cepas 3828, 4125 e 4158 de *Staphylococcus aureus*.

Extratos	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	3828	4125	4158
<i>S. macranthera</i>	0,3 mg mL ⁻¹	0,3 mg mL ⁻¹	0,3 mg mL ⁻¹
<i>S. officinalis</i>	0,1 mg mL ⁻¹	0,4 mg mL ⁻¹	0,7 mg mL ⁻¹
<i>P. vellosiana</i>	4,0 mg mL ⁻¹	1,0 mg mL ⁻¹	2,0 mg mL ⁻¹
Controle positivo*	0,05 mg mL ⁻¹	0,05 mg mL ⁻¹	0,05 mg mL ⁻¹

*Ciclopirox olamina

Para avaliação da determinação da concentração inibitória mínima utilizou-se o critério estabelecido por Aligiannis et al. (2001), em que um extrato é considerado forte inibidor quando seu CIM é de até 0,5 mg mL⁻¹, inibidor moderado se seu CIM estiver acima de 0,5 mg mL⁻¹ e abaixo de 1,5 mg mL⁻¹ e inibidor fraco se seu CIM for acima de 1,5 mg mL⁻¹. Assim, utilizando este critério pode-se classificar o extrato de *S. macranthera* como um forte inibidor, com valores de CIM de 0,3 mg mL⁻¹ para as três cepas testadas. Já o extrato de *S. officinalis*, foi considerado um forte inibidor para as cepas 3828 e 4125 de *S. aureus* e moderado para 4158. O resultado é corroborado por Silva et al. (2012), que em suas pesquisas encontraram valores semelhantes para *S. macranthera* contra *S. aureus* 4125. Apesar dos valores inferidos da CIM de *P. vellosiana* serem altos, configurando um inibidor fraco de *S. aureus*, Ramos, em 2008, encontrou valores menores que 20 mg mL⁻¹ em ensaios contra *M. tuberculosis*. Paralelamente ao presente trabalho, Gontijo (2012) não encontra CIM satisfatório de *P. vellosiana* contra *S. aureus*.

Comparados ao controle, os extratos apresentaram CIM altos. Isto aconteceu pela diferença de sistemas em que os princípios ativos se encontram. Enquanto nas amostras testadas tratava-se de extrato, no controle existia maior concentração de composto ativo. Na pesquisa de INOUE et al. (2015), após

resolução de extrato de *S. macranthera*, os compostos emodina, fisiona e crisofanol apresentaram CIM de 20, 90, e 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. O que fortemente sugere que compostos químicos existentes nesses extratos, quando purificadas, poderiam apresentar atividade biológica de interesse e consequentes aplicações.

5.3. Viabilidade Celular

A viabilidade celular indica a porcentagem de células em atividade (viáveis) na população da amostra considerada. Assim, foi avaliado o efeito dos extratos ativos sobre a viabilidade de isolados de *S. aureus* (3828, 4125 e 4158) após seis horas de incubação das culturas com diferentes concentrações dos extratos (2 CIM, CIM, $\frac{1}{2}$ CIM, $\frac{1}{4}$ CIM). Na Tabela 4 são apresentados os valores da redução da viabilidade celular na CIM. Os extratos de *S. officinalis* e *S. macranthera* foram os que mais reduziram a viabilidade, com porcentagem de inibição de até 90% e 95% respectivamente. Esses dados sugerem que os extratos de *S. macranthera* e *S. officinalis* são capazes de afetar a viabilidade celular e, por conseguinte diminuir as células viáveis para infecção bacteriana. O teste não permite a inferência se a atividade do extrato é bacteriolítica ou não.

Tabela 4. Valores em porcentagem de redução da viabilidade celular na Concentração Inibitória Mínima

Extratos	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	3828	4125	4158
<i>S. macranthera</i>	95%	91%	87%
<i>S. officinalis</i>	88%	85%	90%
<i>P. vellosiana</i>	83%	67%	70%

Nas Figuras 14, 15 e 16 é possível visualizar a redução da viabilidade celular mesmo em concentrações subinibitórias. A célula bacteriana é afetada nestas condições, já que em todos os casos, concentrações correspondentes à metade do CIM foram suficientes para reduzir a viabilidade em pelo menos 30%. A queda na

viabilidade celular é relativa ao aumento da concentração inibitória dos compostos testados na cultura bacteriana. Estes dados sugerem que os extratos são efetivos na redução da viabilidade celular, estudos sobre a cultivabilidade destas células remanescentes é importante no entendimento e caracterização do processo.

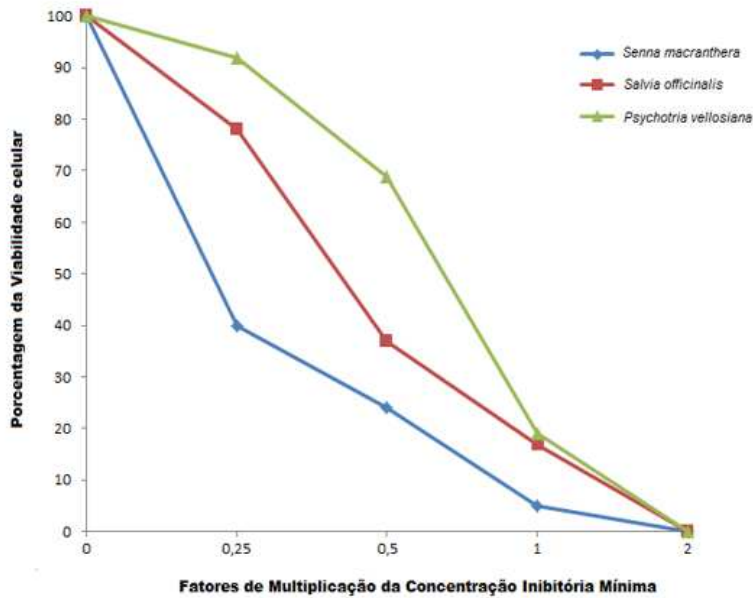


Figura 14. Redução da Viabilidade Celular em função de diluições da Concentração Inibitória Mínima para *Staphylococcus aureus* 3828

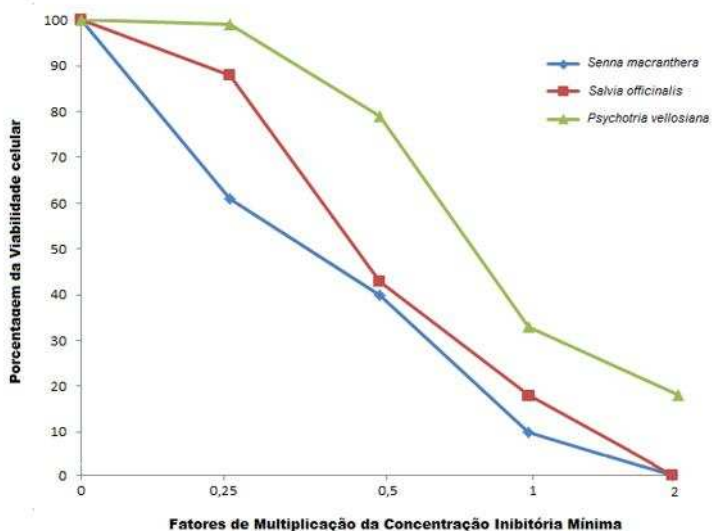


Figura 15. Redução da Viabilidade Celular em função de diluições da Concentração Inibitória Mínima para *Staphylococcus aureus* 4125

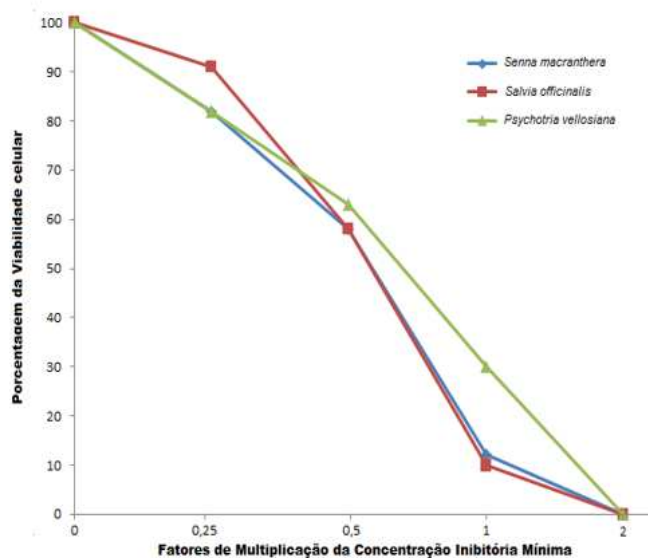


Figura 16. Redução da Viabilidade Celular em função de diluições da Concentração Inibitória Mínima para *Staphylococcus aureus* 4158.

Em estudos realizados contra células tumorais da laringe (Hep-2) e em células do hepatoma humano (HepG2) utilizando-se extrato hidroalcolico de *S. officinalis*, reportaram atividade de redução de viabilidade celular deste extrato contra estas células. Concentrações de 0,35 a 2 mg mL⁻¹ reduziram a viabilidade de células Hep-2 para 52 a 29% em relação ao controle (GARCIA et al., 2012). Assim, estudos sobre a toxicidades desse modelo de extrato devem ser realizados.

5.4. Efeito dos Extratos sobre o Biofilme

A presença de biofilme é um tópico que merece especial atenção em pesquisas envolvendo saneantes e resistência a drogas. Biofilmes são formados por comunidades de bactérias organizadas e apresentam estrutura de proteção. A barreira física exercida pelo biofilme é uma proteção contra o sistema imunológico do animal e pode impedir que fármacos consigam atingir seus pontos de ação. Assim, estudar se o efeito dos extratos é efetivo frente a este impedimento é necessário. Após a determinação da CIM, diferentes diluições desta (½ CIM, ¼ CIM, 1/8 CIM e 1/16 CIM) foram utilizadas para se inferir a concentração mínima para o impedimento da formação de biofilme. Quanto menor a concentração do extrato para se inibir o biofilme, mais forte o inibidor. As Concentrações Inibitórias de Biofilme foram determinadas e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Concentração Inibitória de Biofilme (BIC) dos extratos ativos para *Staphylococcus aureus*.

Extratos	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	3828	4125	4158
<i>S. macranthera</i>	0,075 mg mL ⁻¹	0,3 mg mL ⁻¹	0,15 mg mL ⁻¹
<i>S. officinalis</i>	0,1 mg mL ⁻¹	0,4 mg mL ⁻¹	0,7 mg mL ⁻¹
<i>P. vellosiana</i>	4,0 mg mL ⁻¹	1,0 mg mL ⁻¹	2,0 mg mL ⁻¹
Controle positivo*	0,05 mg mL ⁻¹	0,05 mg mL ⁻¹	0,05 mg mL ⁻¹

*Ciclopirox olamina

Os extratos de *S. officinalis* e de *P. vellosiana* apresentaram valores da BIC iguais às suas CIM. Isto sugere que a mesma concentração seria suficiente para impedir a formação de biofilme, possivelmente pelo mecanismo de redução de viabilidade já observado nos experimentos com células planctônicas. Por outro lado o extrato de *S. macranthera* apresentou BIC menor que sua CIM contra a bactéria *S. aureus* 3828 e 4158. Isto reforça a idéia que este extrato seja mais eficiente que os outros extratos testados.

A formação de biofilmes é um fator chave no estabelecimento e persistência de infecções causadas por *S. aureus*, *E. coli* e *S. agalactiae* em seres humanos e em animais (KONTO-GHIORGHI et al., 2009). Assim, a baixa concentração desses compostos para se impedir a instalação do biofilme sugere aplicações potenciais desses extratos no campo, no controle da infecção bacteriana e também aplicações em indústrias de beneficiamento de leite, para limpeza de tubulações, bem como no saneamento de ordenhadeiras, já que impedir a formação de biofilmes nas instalações é uma grande preocupação da indústria atualmente (MARTIN, 2015). Com esses resultados, *S. macranthera* e *S. officinalis* possuem grande potencial para a produção de domissanizantes.

Curiosamente, os valores das BIC obtidos nos testes de aderência também se assemelham a valores encontrados para substâncias antibióticas disponíveis na literatura. Testes semelhantes aos realizados no presente trabalho com antibióticos convencionais para se comparar a capacidade de inibição de desenvolvimento de biofilme por *Streptococcus pneumoniae* foram realizados por Garcia-Castillo et al. (2007), encontrando valores de BIC variando de 0,015 a 0,06 mg mL⁻¹ para telitromicina e 0,5 mg mL⁻¹ para linezolida e tetraciclina. Como os extratos testados não são substâncias puras e sim uma mistura de substâncias que atuam sobre a adesão bacteriana, este resultado é muito promissor. Assim outros estudos no isolamento de compostos e consequente teste para avaliar seus efeitos na inibição do biofilme, poderia permitir encontrar qual composto ativo teria ação sobre este evento.

Após inferir qual concentração é suficiente para inibir a formação do biofilme, foi preciso saber se, em condições de biofilme pré-existente, os extratos poderiam inibir o crescimento. Nas Figuras 17, 18 e 19 é possível ver este efeito utilizando-se os extratos *P. vellosiana*, *S. officinalis* e *S. macranthera*, respectivamente.

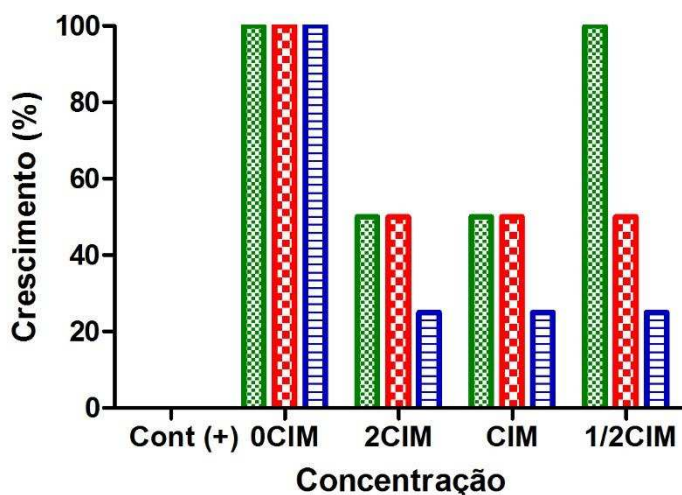


Figura 17. Efeito do extrato de *Psychotria vellosiana* sobre o crescimento do biofilme para as cepas 3828 (verde), 4125 (vermelho) e 4158 (azul) de *Staphylococcus aureus*.

Para a cepa 3828 de *S. aureus*, houve uma inibição do crescimento de 50% do biofilme para as concentrações CIM (4,0 mg mL⁻¹) e 2CIM para o extrato de *P. vellosiana* (Figura 17). Para a cepa 4125, além de haver 50% de inibição do

crescimento do biofilme para a CIM (1 mg mL⁻¹) e 2CIM, houve também 50% de inibição para a metade da CIM. Já para a cepa 4158, tanto o CIM (2 mg mL⁻¹), 2CIM e 0,5 CIM conseguiram inibir o crescimento do biofilme em 75%. Esse resultado suporta a idéia que cada linhagem apresenta diferentes formações de biofilme, o que pode apresentar resultados diferentes para o mesmo extrato. Curiosamente esse extrato foi o único a reduzir eficientemente, em todas as concentrações testadas, o biofilme da linhagem 4158. A mesma linhagem na CIM e em 0,5 CIM dos outros extratos não apresenta inibição de crescimento (Figura 18 e Figura 19). O que sugere a presença de pelo menos um composto presente neste extrato que poderia agir eficientemente contra esta linhagem. A resolução do extrato, caracterização deste composto e o estudo do seu efeito sobre biofilmes poderia trazer mais informações e possíveis aplicações nesta área.

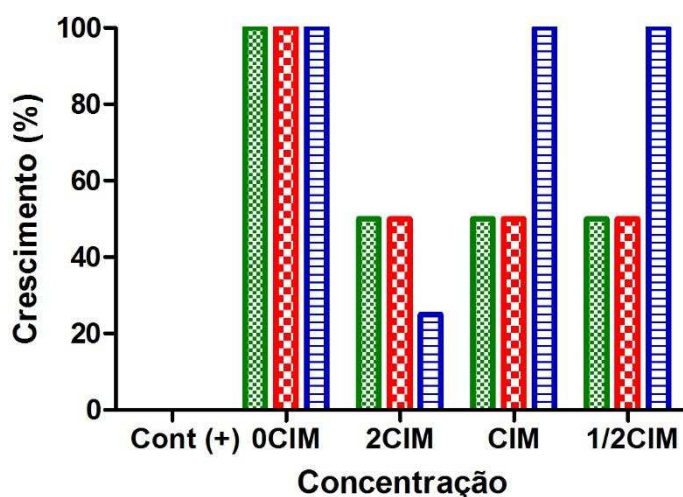


Figura 18. Efeito do extrato de *Salvia officinalis* sobre o crescimento do biofilme para as cepas 3828 (verde), 4125 (vermelho) e 4158 (azul) de *Staphylococcus aureus*.

Já o extrato de *S. officinalis*, na Figura 18, obteve 50% de inibição do crescimento biofilme de *S. aureus* 3828 tanto para 2 CIM quanto para CIM (0,1 mg mL⁻¹) e 0,5 CIM. Já para a cepa 4125, 2 CIM, CIM (0,4 mg mL⁻¹) e 0,5 CIM conseguiram uma inibição de 50% de formação do biofilme. Para a cepa 4158, somente 2CIM conseguiu inibir 50% do biofilme, assim, as concentrações na CIM (0,7 mg mL⁻¹) e 0,5 CIM não foram capazes de inviabilizar as células aderidas ao biofilme. Para a linhagem 4158, portanto, o extrato é um inibidor moderado ao

apresentar inibição apenas em 1,4 mg mL⁻¹, sendo um bom inibidor para o crescimento do biofilme das outras linhagens, em concentrações abaixo do seu BIC.

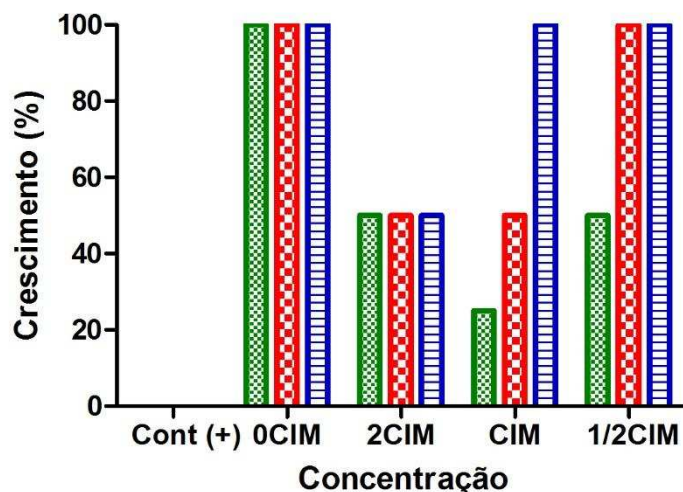


Figura 19. Efeito do extrato de *Senna macranthera* sobre o crescimento do biofilme para as cepas 3828 (verde), 4125 (vermelho) e 4158 (azul) de *Staphylococcus aureus*.

Os ensaios com o extrato de *S. macranthera* podem ser visualizados na Figura 19 e obteve 50% de inibição do biofilme de *S. aureus* 3828 para 2 CIM e 0,5 CIM e 75% de inibição para CIM (0,3 mg mL⁻¹). Nesta última condição vale lembrar que o BIC do extrato para linhagem é de 0,075 mg mL⁻¹. Isto sugere que a CIM deste extrato seria e melhor condição de trabalho contra esta linhagem. Para a cepa 4158, somente 2 CIM conseguiu inibir 50% do crescimento do biofilme, já as concentrações de CIM (0,3 mg mL⁻¹) e 0,5 CIM não foram capazes de inviabilizar as células aderidas ao biofilme. Já para a cepa 4125, utilizando-se 2 CIM e CIM (0,3 mg mL⁻¹), obteve-se uma inibição de 50% de formação do biofilme enquanto 0,5 CIM não foi capaz de inibir sua formação.

A formação de biofilmes facilita a permanência das bactérias durante a infecção e diferenças genéticas podem explicar as diferenças fenotípicas de produção de biofilme (MELO et al., 2012). Assim, algumas cepas poderiam apresentar maior produção de biofilme do que outras ou variedades em sua composição, o que justificaria a diminuição expressiva da viabilidade celular na CIM,

se a bactéria for maior produtora de biofilme, ela se torna mais inacessível para sofrer algum tipo de ataque biológico por meio do extrato utilizado.

Por outro lado, para algumas cepas e concentrações testadas, a inibição de formação da biomassa do biofilme não acompanhou a mesma proporção de redução das células planctônicas viáveis. Ou seja, isto sugere que ao se reduzir o número de células vivas, se influencia na produção do biofilme e não necessariamente diretamente neste.

5.5. Obtenção dos Sabonetes

Sabonetes são produtos higienizantes importantes, pois estão presentes em diversos procedimentos de profilaxia em estabelecimentos de saúde, indústria e no dia a dia. Os sabonetes podem ser bons veículos de produtos naturais. Os sabonetes foram obtidos com os extratos das plantas presentes na extratoteca do BioNAT (Laboratório de Bioquímica e Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Viçosa) em concentrações de 10 mg g⁻¹, já para as associações foi feito em concentrações de 20 mg g⁻¹. Na Figura 20 é possível ver o aspecto final dos sabonetes e do sabonete controle.



Figura 20. Sabonetes produzidos com extratos ativos das plantas *Salvia officinalis*, *Psychotria vellosiana* Benth, *Baccharis dracunculifolia*, *Alternanthera brasiliana*, *Senna macranthera*, *Miconia latecrenata* e sabonete controle

5.6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos sabonetes

De posse dos sabonetes e dos dados anteriormente levantados fez-se uma avaliação da concentração inibitória mínima desses. As amostras contendo extratos de *S. macranthera*, *S. officinalis* e *P. vellosiana* Benth foram avaliados para a CIM. Quanto menores os valores de concentração dos sabonetes, melhor a sua atividade

antibacteriana, uma vez que se necessita menor quantidade para se eliminar um valor fixo de bactérias. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos de CIM para os sabonetes testados.

Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos sabonetes com extratos ativos de *Senna macranthera*, *Salvia officinalis* e *Psychotria vellosiana Benth* para as cepas 3828, 4125 e 4158 de *Staphylococcus aureus*.

Extratos	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	3828	4125	4158
<i>S. macranthera</i>	0,1 mg mL ⁻¹	0,1 mg mL ⁻¹	0,1 mg mL ⁻¹
<i>S. officinalis</i>	0,05 mg mL ⁻¹	0,2 mg mL ⁻¹	0,45 mg mL ⁻¹
<i>P. vellosiana</i>	2,5 mg mL ⁻¹	2,0 mg mL ⁻¹	2,5 mg mL ⁻¹
Sabonete sem extrato	4,0 mg mL ⁻¹	> 5,0 mg mL ⁻¹	> 5,0 mg mL ⁻¹
Controle positivo*	0,05 mg mL ⁻¹	0,05 mg mL ⁻¹	0,05 mg mL ⁻¹

*Ciclopirox olamina

De acordo com os resultados observados para os extratos testados pode-se sugerir que o sabonete com extrato de *S. macranthera* e *S. officinalis* se destacaram como melhores inibidores bacterianos dentre os três sabonetes testados. A despeito dos sabonetes com extratos apresentarem resultados de CIM menores do que a concentração mínima dos extratos puros, nesses dois extratos, um efeito sinérgico entre o sabonete e os extratos pode ser sugerido. Sinergismo é uma interação positiva, não antagônica, na qual o efeito combinado dos componentes é significativamente maior do que seus efeitos independentes quando utilizados de maneira separada (LORIAN, 2006). Assim sendo, considerando-se o efeito positivo em conjunto, a utilização de sabonetes poderia ser uma boa forma para se veicular os extratos com atividades biológicas antimicrobianas. Esta sinergia, porém, não ocorre com o extrato de *P. vellosiana*, cuja CIM de células planctônicas foi menor que a CIM obtida utilizando-se sabonete como veículo nas cepas 4125 e 4158.

Assim, considerando-se os resultados promissores deste extrato com a linhagem 4158, mais estudos são necessários.

5.7. Teste das Luvas

Todos os experimentos discutidos até este ponto foram realizados com linhagens de *S. aureus*, uma bactéria formadora de biofilme e causadora da mastite bovina. Nesta última etapa do projeto, foi feito um experimento com materiais retirados de situação ambiente. As luvas coletadas no Setor de Gado Leiteiro da Universidade Federal de Viçosa foram submetidas a teste bactericida. A Figura 21 mostra, em campo, o teste do caneco realizado pelos ordenadores para detectar vacas com mastite. O método do caneco consiste na utilização de uma caneca de fundo telado preto para se despejar os três primeiros jatos de leite de cada teto no caneco e se observar anomalias como a formação de grumos ou secreções anormais (KRUG, 1990). Para garantir que o ato mecânico de se lavar a luva com água pura não seria capaz de eliminar as bactérias, algumas das luvas foram submetidas ao procedimento de imersão em água destilada (Figura 22 A) para a contagem de colônias crescidas em placa de *petri*. Através da técnica de *swab*, comparou-se a carga bacteriana das luvas antes e após a lavagem com sabonete (com extrato e sem extrato).

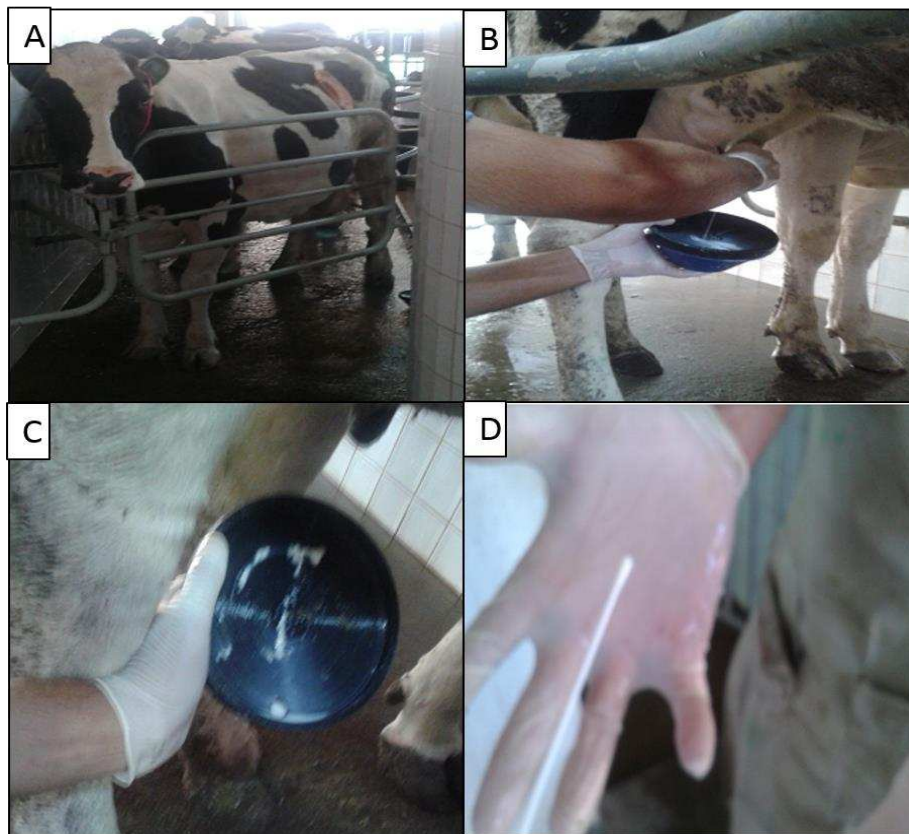


Figura 21. Teste em campo.

Em A, B e C temos o procedimento de ordenha com o teste do caneco. Em D, temos a esfregaço da luva utilizando swab.

O teste com swabs coletados por esfregaço na luva antes da manipulação dos animais com mastite e após mostrou que as luvas não estavam infectadas com nenhum tipo de bactéria antes do estudo (Figura 22 B). Após a manipulação do animal, o esfregaço das luvas passou a ter crescimento de colônias em placas de *petri* (Figura 22 C), o que indica a possibilidade de contaminação entre a manipulação de um animal com mastite e a manipulação de um animal sem mastite. Apesar de não saber quais as bactérias presentes nesse estudo em campo, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus intermedius* são os principais causadores da mastite contagiosa (RADOSTITS et al., 2010). Sua disseminação pode ocorrer durante a ordenha através das mãos dos ordenhadores; do equipamento da ordenha contaminado com leite de animais infectados e da utilização de panos e esponjas pelo ordenhador entre um animal e outro (COSTA et al., 2001). As luvas lavadas com água destilada

(Figura 20D) apresentaram crescimento de colônias, o que indica que o ato mecânico da lavagem ou a água em si não é capaz de eliminar os microrganismos presentes nas luvas.

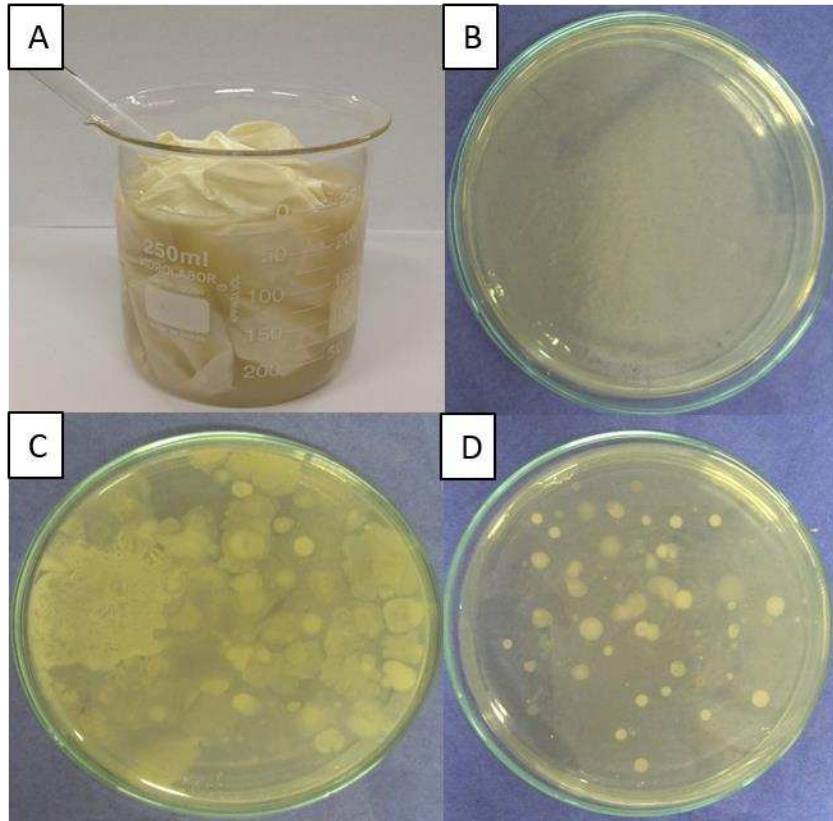


Figura 22. Controles da Atividade antibacteriana em campo de sabonetes com os extratos ativos de *Senna macranthera*, *Salvia officinalis* e *Psychotria vellosiana* nas luvas descartadas dos ordenhadores do setor de Gado leiteiro da UFV e controles.

Em A temos o processo de lavagem das luvas. Em B, Controle da luva antes da manipulação. Em C, Controle da luva após manipulação. Em D, Controle da luva lavada com água destilada.

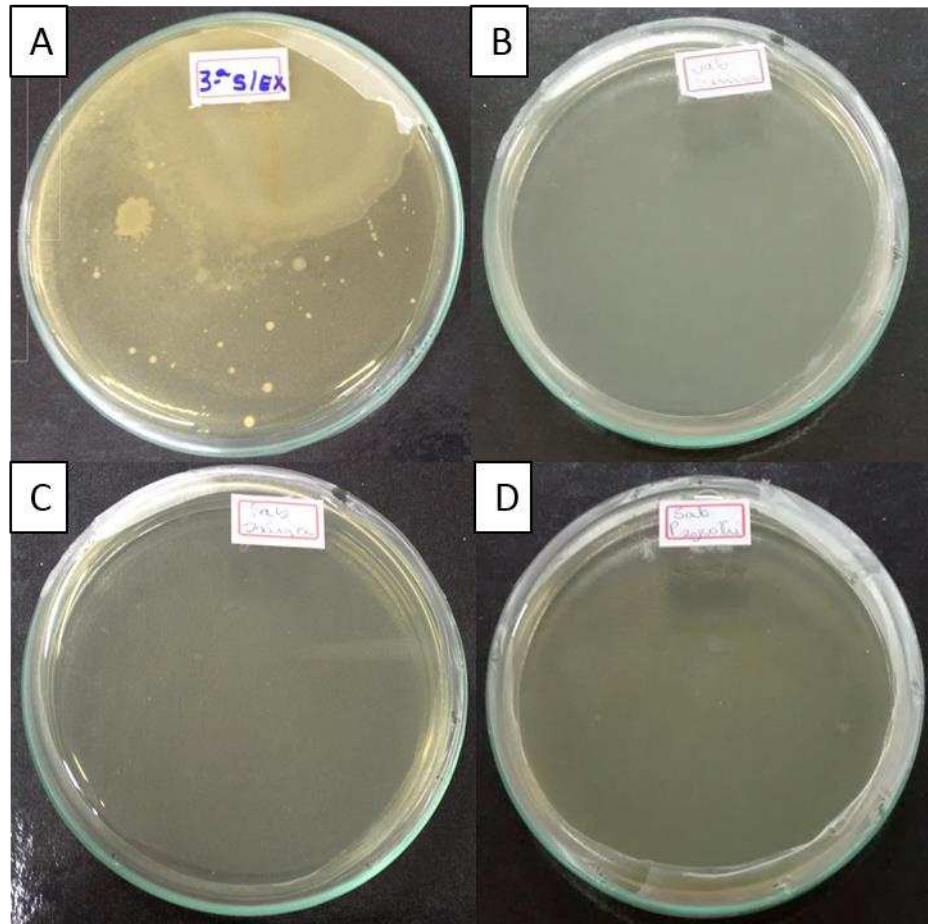


Figura 23. Atividade antibacteriana em campo de sabonetes com os extratos ativos de *Senna macranthera*, *Salvia officinalis* e *Psychotria vellosiana* nas luvas descartadas dos ordenadores do setor de Gado leiteiro da UFV e controles.

Em A temos o controle de sabonete ou seja, luva lavada com sabonete sem extrato. Em B temos Luva lavada com sabonete de pau fava (*S. macranthera*). Em C temos Luva lavada com sabonete de sálvia (*S. officinalis*) e em D temos Luva lavada com sabonete de café do mato (*P. vellosiana*). As luvas lavadas apenas com sabonete neutro (Figura 23 A), sem extratos também apresentaram crescimento bacteriano. Já as luvas lavadas com os extratos ativos no teste em campo não apresentaram crescimento microbiano. Em teste semelhante de lavagem de mãos de voluntários, estudos apontaram que não houve diferença estatística significativa entre a atividade de seis diferentes sabonetes com e sem triclosan para *E. coli* e *S. aureus* (SOARES, 2013). Diversos estudos mostram atividades antimicrobianas de extratos de plantas na formulação de sabonetes. Entre esses, uma pesquisa sugeriu

atividade antisséptica de sabonete líquido com extrato etanólico de *M. cauliflora* (SOUZA, 2007). Outro estudo reportou que a utilização de sabonete líquido com óleo de buriti obteve atividade antimicrobiana e foi sugerida sua utilização em indústrias de alimentos para higienização das mãos (SOARES, 2014). Sabonete líquido contendo extrato glicólico de *Dimorphandra mollis* em diferentes concentrações apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (MIGLIATO et al., 2009). Os resultados obtidos abrem grandes expectativas nas aplicações de extratos vegetais em sabonetes, entre outras possibilidades. Assim, sabonetes com extratos de *Senna macranthera*, *Salvia officinalis* e *Psychotria vellosiana* podem ser boas escolhas no combate à mastite bovina em campo.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por este trabalho permitem concluir que dentre os sabonetes com extratos de *S. officinallis*, *P. vellosiana Benth*, *B dracunculifolia*, *A. brasiliiana*, *M. latecrenata* e *S. macranthera*, os que apresentam melhor atividade antibacteriana contra as linhagens testadas de *S.aureus* foram os de *Senna macranthera*, *Salvia officinallis* e *Psychotria vellosiana Benth*.

Os melhores resultados de Concentração Inibitória Mínima foram obtidos com os extratos de *Senna macranthera* com os valores de 0,3 mg mL⁻¹ para as três cepas. Já em *Salvia officinallis* obteve valores de CIM de 0,1 mg mL⁻¹; 0,4 mg mL⁻¹ e 0,7 mg mL⁻¹ respectivamente para as cepas 3828, 4125 e 4158. Os resultados indicam que ambos são inibidores fortes contra as cepas de *S. aureus*. O extrato de *Senna macranthera* apresentou inibição de até 95% da viabilidade celular na CIM para a cepa 3828 de *Staphylococcus aureus*. Apresentou também inibições de 91% e 87% para as cepas 4125 e 4158 respectivamente. *Salvia officinalis* apresentou inibições de 88%, 85% e 90% respectivamente para as cepas 3828, 4125 e 4158. *Psychotria vellosiana* apresentou inibições de 83%, 67% e 70% respectivamente.

Os melhores valores de Inibição em relação ao Biofilme, em valores de Concentração Inibitória de Biofilme foram os com extratos de Sena (0,075 mg mL⁻¹; 0,3 mg mL⁻¹ e 0,15 mg mL⁻¹) e Sálvia (0,1 mg mL⁻¹; 0,4 mg mL⁻¹ e 0,7 mg mL⁻¹ respectivamente para as cepas 3828, 4125 e 4158. Os sabonetes com extrato de *Senna macranthera* tiveram CIM de 0,1 mg mL⁻¹ para todas as cepas 3828, 4125 e 4158 de *Staphylococcus aureus*. Os com extrato de *Salvia officinalis*, tiveram resultados de 0,05 mg mL⁻¹, 0,2 mg mL⁻¹ e 0,45 mg mL⁻¹ respectivamente para essas mesmas cepas. Os resultados indicam sinergia entre sabão e extratos.

Já *Psychotria vellosiana*, teve resultados de 2,5 mg mL⁻¹, 2,0 mg mL⁻¹ e 2,5 mg mL⁻¹. Os sabonetes testados contra as bactérias presentes nas luvas dos ordenadores que manipularam vacas com mastite se mostraram eficazes. Todos os sabonetes apresentaram eficácia para a inibição bacteriana nas luvas.

7. REFERÊNCIAS

- ABOY, A.L. et al. Atividade antiespasmódica de soluções extrativas de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco). Acta Farm. Bonaerense, 21: 185-91. 2002.
- AIELLO, A.E.; LARSON, E.L.; LEVY, S.B. Antibacterial soap use: efficacy and risks. clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 45: 137-47. 2007.
- ALBUQUERQUE, U.P. The use of medicinal plants by the cultural descendants of African people in Brazil. Acta Farm Bonaerense, 20: 139-44, 2001.
- AL-FATIMI, M. et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. J of Ethnopharmacol, 111: 657-666, 2007.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. J. Agric Food Chem., 40: 4168–70, 2001.
- ALVES, J.N. et al. Identificação de metabólitos secundários presentes na espécie vegetal *Origanum majorana* L. 49º Congresso Brasileiro de Química. Porto Alegre-RS, 2009.
- AMADOR, T.A. et al. Involvement of nmda receptors in the analgesic properties of psychotridines. Phytomedicine, 8: 202-206, 2001.
- ANDRADE, N.J. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Higienização das mãos em serviços de saúde [Internet]. Brasília: ANVISA, 2007.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do paciente em serviços de saúde: higienização das mãos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa105, 2009.
- ARCHER, N. K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence, 2: 445–59, 2011.
- BARBIERI, D. S. et al. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on *in vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol, 59: 887-896, 2014.
- BARBOSA-FILHO, J.M. et al. Sources of alpha-, beta, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. Rev. Bras. Farmacogn., 18: 135–54, 2008.

- BARBOUR, E.K. et al. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 93: 1-7, 2004.
- BARICEVIC, D. et al. Tropical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.*, 75: 125–32, 2001.
- BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45: 493-6, 1966
- BERG, J.M.T.; Lubert, J. *Bioquímica*. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545, 2008.
- BIVATTI, M.W. et al. Preliminary Studies of alternative feed additives for Broilers: *Alternanthera brasiliana* extract, propolis extract and linseed oil. *Rev. Bras. Ciênc. Avic., Campinas*, 5: 1635, 2003.
- BOTH, F.L. et al. Analgesic properties of umbellatine from *Psychotria umbellata*. *Pharm Biol.*, 40: 336–41, 2002.
- BROCHADO C.O. et al. Flavonol robinobiosides and rutosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 14: 449–51, 2003.
- BURVENICH, C. et al. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.*, 34: 521-64.
- CANCLIRACCI, M.; CITTERIO, B.; PIATTI, E. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. *Food Chemistry* 131: 493–99, 2012.
- CAPEK, P. et al. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2003: 113–19, 2008.
- CASTOR, M.L. et al. Antibiotic resistance patterns in invasive group B streptococcal isolates. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, 72: 7505, 2008.
- CENCI-GOGA, B. T. et al. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *J. Food Protec.*, 66: 1693–96, 2003.
- CHARACKLIS, W.G.; COOKSEY, K.E.. Biofilm and microbial fouling. *Adv Appl Microbiol.*, 29: 93-137, 1983
- COSTA, E. O., et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. *J of Vet Med, Berlin*, 47: 99-103, 2000.
- CULLOR, J.S., TYLER, J.W.; SMITH, B.P. Distúrbios da glândula mamária. In: Smith, B.P. *Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais*. São Paulo. 2: 1041–60, 1994.

- CUNHA, A.P. Plantas e produtos vegetais em cosméticos e dermatologia. Lisboa: Fundação Colouste Gulbenkin, 2004.
- CUTLER, J.S.; CUTLER, G.H. In: Stephen J.. Biologically active natural products: pharmaceuticals. [S.I.]: CRC Press 5, 2000.
- DA SILVA, L.R. et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. Acta Toxicol. Argent. 23: 36-43, 2015.
- DAULAT, S. et al. Comparative study of isolated phytosterols from different plant parts of selected *Cassia* species. Asian J. Res. Pharm. Sci., 3: 117-121, 2013.
- DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. Vis Academ, 5: 33-40, 2004.
- DE PAULA JUNIOR, T.J. et al. Regulamentação e uso de produtos à base de agentes biológicos para o controle de doenças de plantas e pragas no Brasil. Inf. Agropec., 34: 50–57, 2013.
- DIAZ, M. A. N.; Carvalho, I. de O.; Dias, G. Herbal dentifrices for children, emerging trends in oral health Sciences and Dentistry, Prof. Mandeep Virdi (Ed.), ISBN: 978-953-51-2024-7, 2015.
- DI STASI, L.C. et al. Fitoterapia, LXV, 529, 1994.
- DI STASI, L.C. Plantas medicinais: verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber. São Paulo: UNESP, 2007.
- DINIZ, M.F.F.M. et al. Memento fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica. 1. Ed., João Pessoa: Editora Universitária. 1: 205, 1997.
- DOS SANTOS, S.S. Investigação da presença e da formação de biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal. Medicina Veterinária Preventiva, 2009.
- DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Construindo a história dos produtos naturais. MultiCiência, 7, 2006.
- ELISABETSKY, E. et al.. Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: an approach to unveil bioactive natural products. The case of Psychotria alkaloids as potential analgesics. Ciênc e Cult, 49: 378–85, 1997
- ESQUENAZI, D. et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. Res. Microbiol., 153: 647–52, 2002.
- ESTUNINGSIH, S. et al. Studies on *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Indonesia. J. Vet. Med., 49: 185–87, 2002.

- FDA.2013. FDA issues proposed rule to determine safety and effectiveness of antibacterial soaps. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm378542.htm>> Acesso: 01 de set de 2014.
- FIGUEIREDO, A.C., BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G. Plantas aromáticas e medicinais. Fatores que afetam a produção. pp. 1-18. In: Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (Eds), Potencialidades e Aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Curso Teórico-Prático, 3.^a Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal, 2007.
- FRAGOSO, V. et al. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. *Toxicology in Vitro*, 22: 559–66, 2008.
- FESSLER, A. et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* st398 from cases of bovine mastitis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 65: 619–25, 2010.
- FERNANDEZ, E.C.; SANDI, Y.E.; KOKOSKA, L. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used in the Bustillo Province of the Potosi Department, Bolivia. *Fitoterapia*, 74: 407–16, 2003.
- FLEMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8: 623-33, 2010.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do leite e controle de mastite, São Paulo: Lemos Editorial, 175, 2000.
- FOSTER, T.J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12:49–62, 2014.
- GARCIA, C.G. et al. Assessment of *Salvia officinalis* (L.) hydroalcoholic extract for possible use in cosmetic formulation as inhibitor of pathogens in the skin. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 33: 509–14, 2012.
- GARCIA-CASTILLO M., et al. Differences in biofilm development and antibiotic susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis samples and blood cultures. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 301–304, 2007.
- GARCIA, C.S.C. et al. Avaliação *in vitro* do potencial biológico da *Salvia officinalis* L. em células tumorais. *Scientia Medica* 22: 131-137, 2012.
- GARLET, T.M.B.; IRGANG.B.E. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Plant. Med.*, 4: 9–18, 2001.

- GASPARI, S. Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus*. Dissertação de Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular - Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2005.
- GONTIJO, D. da C. Abordagem etológica na busca de drogas vegetais com potencial ação antioxidante, antibacteriana, antimutagênica e antigenotóxica. Dissertação de Mestrado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, 2012.
- GUDIÑA, E.J. et al. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. Lett Appl Microbiol, 50: 419-24, 2010.
- GUIMARÃES, N.S.S. et al. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. Food Chem. Toxicol., 50: 1091–97, 2012.
- GURIB-FAKIN. Medicinal plants: traditions of Yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects Medicine, 27: 1-93; 2006.
- HARBORNE, J.B. Classes and functions of secondary products, In: Walton NJ, Brown DE (Ed.). Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products. London: Imperial College, 1–25, 1999.
- HEBERT, A.K. et al. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. Microbiol. Lett., 193: 57–62, 2000.
- HENSEN, S.M. et al. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. J. Dairy Sci., 83: 418-29, 2000.
- HILLERTON, J.E.; BERRY, E. A. Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism? J. Appl. Microbiol., 98: 1250–55, 2005.
- HOGAN, J.S.; SMITH, K. L. Coliform mastitis. Vet. Res., 34: 507–519, 2003.
- HOGAN, J.S.; SMITH, K. L. Importance of the dry period during *Serratia mastitis* outbreaks. Large Anim. Pract., 18: 20-25, 1999.
- HU, J.F. et al. Bacterial biofilm inhibitors from *Diospyros dendo*. J. Nat. Prod., 69: 118–120, 2006.
- INOUE, F. DE A. Avaliação de atividades biológicas e estudo fitoquímico de extratos de flores de *Senna macranthera*. Dissertação de Mestrado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, 2014.

- INOUE, F. DE A. et al. Chemical constituents and an alternative medicinal veterinary herbal soap made from *Senna macranthera*. evidence-based complementary and alternative medicine, 2015:6, 2015.
- JAYARAMAN, R.; RAMAKRISHNAN, N. Cost of intensive care in India. Indian J. Crit. Care Med., 12: 55–61, 2008.
- JIANGUO, C. et al. Flavonoids profiles, antioxidant, acetylcholinesterase inhibition activities of extract from *Dryothyrum boryanum* (Willd.) Ching. Food Chem. Toxicol., 55: 121–28, 2013.
- KAMATOU, G.P.P. et al. South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. J. Ethnopharmacol., 119: 664–72, 2008.
- KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. Can. Vet. J., 38: 429-437, 1997.
- KERMANS SHAH H. et al. *In vitro* evaluation of antibacterial activity of hydroalcoholic extract of *Salvia officinalis* and *Pimpinella Anisum* against cariogenic bacteria. Journal of Dental Medicine Summer; 22: 149-154, 2009.
- KIM, G.S. et al. Biological and antibacterial activities of the natural herb *Houttuynia cordata* water extract against the intracellular bacterial pathogen salmonella within the raw macrophage. Biol. Pharm. Bull., 31: 2012–17, 2008.
- KIRSNER, R.S.; FROELICH, C. W. Soaps and detergents: understanding their composition and effect. Ostomy Wound Manage, Suppl, Mar; 44: 62-69, 1998.
- KRUG, E. E. B. Mamite bovina. Porto Alegre: CCGL. 1: 85, 1990.
- KOKJOHN, Katrina et al. Evaluation of in vitro activity of ciclopirox olamine, butenafine HCl and econazole nitrate against dermatophytes, yeasts and bacteria. International journal of dermatology, 42: 11-17, 2003.
- KONRATH, E.L. et al. Investigation of the in vitro and ex vivo acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used Lycopodium species from South America on alkaloid extracts. J. Ethnopharmacol., 139: 58–67, 2011.
- KONTO-GHIORGHI, Y. et al. Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. PLoS Pathog., 5: 412 – 22, 2009.
- LAGROTA, M.H.C. et al. Inhibitory activity of extracts of *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) against the herpes simplex virus, Phytotherap. Res., 8: 361, 1994.
- LEITÃO, D.P.S. et al. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factor of *Streptococcus mutans*. Biol. Pharm. Bull., 27: 1834-39, 2004.

- LIMA, M.R.F. et al. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16: 300–06, 2006.
- LORIAN, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 1 ed. Williams & Wilkins, London 2006.
- MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRIES, G. A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua Contagem de Células Somáticas. *Rev Bras de Zootec*, 29: 1883-1886, 2000.
- MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. Otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. *Rev. Biotecnologia Cienc. Desenvolv.*, 10: 24-28, 1999.
- MARGATHO, L.F.F.; HIPOLITO, M.; KANETO, C.N. Métodos de prevenção, controle e tratamento da mastite bovina. *Bol.Téc. Inst. Biol.*, 9: 5–35, 1998.
- MARONEY, M. Coliform Mastitis. *Milk Money Fact. Sheet*. 4: 3-40, 2005.
- MARTIN, J. G. P. Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de laticínios produtores de queijo minas frescal. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo. Doctoral Thesis in Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2015.
- MASTER, Z. et al. Effects of flavonoids on CYP1 expression in RL95-2 endometrial carcinoma cells. *Food Chem.*, 133: 912–22, 2012.
- MATHABE, M.C. et al. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoeas in Limpopo province, South Africa. *J. Ethnopharmacol.*, 105: 286–93, 2006.
- MATOUSKOVA, I.; JANOUT, V. Current knowledge of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.*, 1: 191-202, 2008.
- MAYER, B. et al. Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. *Fitoterapia*, 80: 421–26, 2009.
- MELÉNDEZ, P.A.; CAPRILES, V.A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomed.*, 13: 272–76, 2006.
- MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN BEEK, T. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food Chem.*, 85: 231–37, 2004.
- MELO, P. de C. et al. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. *J. Biosci.* 28: 94-99, 2012.

- MIGLIATO, K.F. et al. Verificação da atividade antibacteriana de sabonete líquido contendo extrato glicólico de *Dimorphandra mollis* Benth. Rev Ciênc Farm Básica Apl., 30: 197-202, 2009.
- MOHEBI, R. et al. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of acorn herbal extract against some Gram-negative and Gram-positive bacteria. Roum Arch Microbiol Immunol, 70: 149–52, 2011.
- MONTHANA, R.A.A.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. J. Ethnopharmacol., 96: 177–81, 2005.
- MORAIS-BRAGA, M.F.B. et al. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 12, 2013.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for growth and survival – application to proliferation and cytotoxicity assays. J of Immunol Met, 65: 55-63, 1983.
- MÜLLER, E.E. Profilaxia e controle da mastite. In: workshop sobre produção e qualidade do leite, 2: 10-13, 2000.
- MURTHY, K.N.C. et al. Differential inhibition of human colon cancer cells by structurally similar flavonoids of citrus. Food Chem., 132: 27–34, 2012.
- NADER, T. T. et al. Avaliação *in vitro* da eficácia de extratos de plantas medicinais do cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolado de diferentes fontes de propriedades leiteiras. Arq. Inst. Biol. 77: 429-433, 2010.
- NASCIMENTO, G. G. F et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Braz J of microbiol. 31: 247-256, 2000.
- NASCIMENTO, N.C. et al. Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of *Psychotria brachyceras*. Environ. Mol. Mutagen., 48: 728–34, 2007.
- NOGUEIRA, L.G. *Senna macranthera*: constituição química e atividades biológicas. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2009.
- OLIVEIRA, J.; MEDEIROS, J.A.; FERREIRA, E. Grau de saponificação de óleos vegetais na flotação seletiva de apatita de minério carbonatítico. Dissertação de Mestrado em Engenharia Mineral. Universidade Federal de Ouro Preto, 2006.
- OU DHIA, P. Research note major *Cassia* species of Chhattisgarh, India: natural occurrence, traditional medicinal knowledge and trade, 2003.

- PARIZZI, S.Q.F. et al. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 1: 47, 2004.
- PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agr. Food Chem.*, 50: 2502–06, 2002.
- PERRUCHON, S. Estudo das propriedades dos flavonóides para cosméticos através do relacionamento função-estrutura. *Cosmet. Toiletries*, 14: 74, 2002.
- PIEPERS, S. et al. Impact of intramammary infections in dairy heifers on future udder health, milk production, and culling. *Vet. Microbiol.*, 134: 113–20, 2009.
- PONZI, E.A.C. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Momordica charantia* L. *Ver Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac*; 10: 89-94, 2010.
- PUPO, M.T; GALLO, M.B.C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. *Quim. Nova*, 30: 1446–55, 2007.
- RAAL, A.; ORAV, A.; ARAK E. Composition of the essential oil of *Salvia officinalis* L. from various European countries. *Nat. Prod. Res.*, 21: 406-11, 2007.
- RADOSTITS, O. M. Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- RAMOS, D.F. et al. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 44, 2008.
- REZENDE, T.P. et al. Protective effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves extract against carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental animals. *Molecules*, 19: 9257-72, 2014.
- RODRIGUES, J. et al. Antimicrobial Activity of *Miconia* species (Melastomataceae). *J. Med. Food*, 11: 120–26, 2008.
- SAISING, J.; ONGSAKUL, M.; VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. Ethanol extract and rhodomyrtone: a potential strategy for the treatment of biofilm-forming staphylococci. *J Med Microbiol*, 60: 1793-1800, 2011.
- SANTOS, B.T.A. dos. Estudo da atividade dos extratos de plantas e fungos endofíticos isolados do cerrado brasileiro em linhagem celular de feocromocitoma. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília, 2014.
- SANTOS, D.A. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) indifferent experimental models. *J. Ethnopharmacol.*, 127: 543–50, 2010.

- SANTOS, E. C. G. dos. Atividade antibacteriana das plantas *Copaifera duckei* dwyer e *Pseudobombax marginatum* e sua interação com a superfície celular bacteriana. 2013. 66 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.
- SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. 1ªed. Barueri: Manole. 314 , 2007.
- SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol*; 7: 979-90, 2012.
- SCHRIPSEMA, J. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora da UFSC. 31: 918–58, 2003.
- SCIO, E. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of some plant extracts, phytochemicals as nutraceuticals - global approaches to their role in Nutrition and Health, 2012.
- SILVA, D.M. et al. Synergism between natural products and antibiotics against *Staphylococcus aureus* of bovine origin. *SILAE XXII*. Costa Rica, 2013.
- SILVA, D.M. Efeito de extratos vegetais e antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina. Dissertação de Mestrado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, 2012.
- SILVA, S.M.; Lemos, J.C. Plantas medicinais de uso da população do assentamento de Reforma agrária Ezequias dos Reis, Município Araguari – MG, 2005.
- SILVA, W.P. et al. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus*. In: mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. *Braz. J. Microbiol.*, 31: 115–25, 2000.
- SIMÕES, L.M.C. et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J. Ethnopharmacol.*, 94: 59–65, 2004.
- SIMÕES, Manuel; SIMÕES, Lúcia C.; VIEIRA, Maria J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43: 573-583, 2010.
- SMITH, A.W. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv Drug Deliver Rev.*, 57: 1539–50, 2005.
- SOARES, M.P.M. Avaliação da eficiência de sabonetes com triclosan sobre suspensões bacterianas de *E. coli* e *S. aureus* aplicadas sobre a superfície das mãos de voluntários. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2013.

- SOARES, N. R. Avaliação da atividade antimicrobiana e caracterização físico-química de sabonete líquido à base de óleo de baru, buriti e pequi. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Goiás. 2014.
- SOBERÓN, J. R. et al. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. *J of Appl Microbiol*, 102: 1450-1461, 2007.
- SOBRAL, M. et al. Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil. 1. ed. São Carlos: RiMa Editora, 2006.
- SOUSA, J.P.B. et al. Seasonal variation of the (E)-nerolidol and other volatile compounds within ten different cultivated populations of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *J. Essent. Oil Res.*, 21: 308–14, 2009.
- SOUZA, T.M. Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folha de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Leguminosae-mimosoidae*). Dissertação de Mestrado pela Universidade Estadual Paulista, 2007
- SOUZA, V.C.; BORTOLUZZI, R.L.C. Senna. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Ed. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23149>> [Acessado em: 12 de agosto, 2013], 2013.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.
- VALADÃO, I.B. Avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais e extratos hidrofílicos de três espécies vegetais medicinais: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. e *Lippia sidoides* Cham. Monografia, UFV, 2008.
- VATTEM, D.A. et al. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia*, 78: 302–10, 2007.
- VEIGA JUNIOR. V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? *Qui. Nova*, 289: 519–28, 2005.
- VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE. J. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Additives and Contaminants*, 19: 163-171, 2002.
- VIECELLI, C.A.; CRUZ-SILVA, C.T.A. Efeito da variação sazonal no potencial alelopático de sálvia. *Semin. Cienc. Agrar.*, 30: 39–46, 2009.
- XAVIER, J. B et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*, 76: 2-13, 2003.

- XIAO, J.B. et al. Molecular structure-affinity relationship of natural polyphenols for bovine c-globulin. *Mol Nutr Food Res.* 55: 86-92, 2011.
- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M.;. Plant drug analysis (Springer-Verlag), Berlin, 334, 1984
- WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.*, 182: 2675-9, 2000.
- WECKESSER, S. et al. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine.* 14: 508-516, 2007.
- WRIGHT, G.D.; SUTHERLAND, A.D. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. *Trends Mol Med.* Jun; 13: 260-7, 2007.
- YINRONG L.; YEAP F. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.*, 75: 197–202, 2001.
- ZADOKS, R.N. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 3894–3902, 2002.
- ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J. Anim. Sci.*, 86: 57–65, 2008.
- ZHOU, H. et al. A new dimeric alkaloid from the leaf of *Psychotria calocarpa*. *Helv. Chim. Acta*, 93: 165–02, 2010.

8. ANEXOS

Anexo 1. Análise de Variância e Teste de Tukey para inibição de *Staphylococcus aureus* 3828. Sob a coluna “Tukey”, letras iguais representam grupos sem diferenças estatísticas entre um e outro. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância.

Anova: fator único

S. aureus 3828

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância	Tukey*
Controle Positivo	3	52	17,33333333	2,333333333	a
<i>S. macranthera</i>	3	46	15,33333333	2,333333333	a
<i>M. latecrenata</i>	3	18	6	0	d
<i>A. brasiliiana</i>	3	17	5,666666667	2,333333333	d
<i>B. dracunculifolia</i>	3	16	5,333333333	0,333333333	d
<i>P. vellosiana</i>	3	32	10,66666667	4,333333333	c
<i>S. officinalis</i>	3	43	14,33333333	0,333333333	b

*Tukey significância ao nível de 5%

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	464,666667	6	77,44444444	45,17592593	0,0000000227	2,847726
Dentro dos grupos		24	1,714285714			
Total	488,666667	20				

Anexo 2. Análise de Variância e Teste de Tukey para inibição de *Staphylococcus aureus* 4125. Sob a coluna “Tukey”, letras iguais representam grupos sem diferenças estatísticas entre um e outro. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância.

Anova: fator único

S. aureus 4125

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância	*Tukey
<i>S. officinalis</i>	3	44	14,66666667	2,333333333	b
<i>S. macranthera</i>	3	33	11	1	b
<i>M. latecrenata</i>	3	12	4	1	c
<i>A. brasiliana</i>	3	13	4,333333333	0,333333333	c
<i>B. dracunculifolia</i>	3	19	6,333333333	1,333333333	c
<i>P. vellosiana</i>	3	39	13	4	b
Controle positivo	3	55	18,33333333	1,333333333	a

*Tukey significância ao nível de 5%

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	547,1428571	6	91,19047619	56,32352941	0,0000000053	2,847726
Dentro dos grupos	22,66666667	14	1,619047619			
Total	569,8095238	20				

Anexo 3. Análise de Variância e Teste de Tukey para inibição de *Staphylococcus aureus* 4158. Sob a coluna “Tukey”, letras iguais representam grupos sem diferenças estatísticas entre um e outro. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância.

Anova: fator único

S. aureus 4158

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância	*Tukey
<i>S. officinalis</i>	3	41	13,66666667	1,333333333	b
<i>P. vellosiana</i>	3	30	10	1	c
<i>B. dracunculifolia</i>	3	16	5,333333333	0,333333333	d
<i>A. brasiliana</i>	3	18	6	1	d
<i>M. latecrenata</i>	3	23	7,666666667	0,333333333	d
<i>S. macranthera</i>	3	41	13,66666667	2,333333333	b
Controle Positivo	3	58	19,33333333	2,333333333	a

*Tukey significância ao nível de 5%

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	457,9047619	6	76,31746032	61,64102564	0,00000000290	2,847726
Dentro dos grupos	17,33333333	14	1,238095238			
Total	475,2380952	20				

Artigo publicado

Chemical Constituents and an Alternative Medicinal Veterinary Herbal Soap Made from *Senna macranthera*

Maia, T.F.; Purgato G.A.; Siqueira, R.P.; Lima, S.; Diaz, G., **Diaz, M.A.N.**

Hindawi Publishing Corporation

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2015, Article ID 217598, 6 pages

<http://dx.doi.org/10.1155/2015/217598>

Trabalho em congresso

IV International Symposium on Drug Discovery (2015)

***Senna macranthera* an alternative to control bovine mastitis**

Maia, T.F.; Purgato G.A.; Siqueira, R.P.; Lima, S.; Diaz, G., Diaz, M.A.N.

XXII Società Italo Latino Americana di Etnomedicina Silae (2013)

***Baccharis dracunculifolia* an alternative to control bovine mastite**

Maia F. T. Siqueira, R.P., Diaz, G., Diaz, M.A.N.