

SÂMIA LIMA

**Constituintes químicos isolados de *Salvinia auriculata* Aubl.  
e atividade antibacteriana de extratos brutos sobre estirpes  
de *Staphylococcus aureus* causadoras de mastite bovina**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2016

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

T

L732c  
2016  
Lima, Sâmia, 1986-  
Constituintes químicos isolados de *Salvinia auriculata* Aubl. e  
atividade antibacteriana de extratos brutos sobre estirpes de  
*Staphylococcus aureus* causadoras de mastite bovina / Sâmia Lima. –  
Viçosa, MG, 2016.

xvi, 115f. : il. (algumas color.); 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Salvinia auriculata* - Atividade antibacteriana. 2. Extratos  
vegetais. 3. CDD 22. ed. 581.76

SÂMIA LIMA

**Constituintes químicos isolados de *Salvinia auriculata* Aubl.  
e atividade antibacteriana de extratos brutos sobre estirpes  
de *Staphylococcus aureus* causadoras de mastite bovina**

APROVADA: 01 de abril de 2016.

---

Sérgio Antônio Fernandes

---

Andréa Oliveira de Barros Ribon

---

Virginia Ramos Pizziolo  
(Coorientadora)

---

Gaspar Diaz Munõz

---

Marisa Alves Nogueira Diaz  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

A Deus! Só com Ele somo capazes de superar os obstáculos com dignidade e afinco.

À minha querida família! Pelo apoio incondicional e incentivo nesses anos de vida acadêmica.

À Universidade Federal de Viçosa através do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização deste trabalho.

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado Minas Gerais (FAPEMIG) Processo APQ-00454-11, pelo recurso financeiro.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Marisa Alves Nogueira Diaz pela orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gaspar Diaz Muñoz e Prof<sup>a</sup> Dra. Virgínia Ramos Pizziolo pela co-orientação.

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

Ao Pesquisador Guilherme Nunes de Souza da Embrapa Gado de Leite pelo auxílio no teste *ex-vivo*.

Ao Doutorando Otávio Valério do Departamento de Medicina Veterinária pelas análises de citotoxicidade.

À aluna de IC Gislaíne Aparecida Purgato pelo auxílio no teste *ex-vivo*.

Às verdadeiras amigas! Foram essenciais!

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que o presente trabalho se tornasse realidade.

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	ivx
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 Produtos Naturais .....	3
2.2 O leite e sua importância no mercado econômico .....	8
2.3 Mastite bovina .....	10
2.4 Micro-organismos envolvidos na mastite bovina .....	11
2.5 Formação de biofilmes bacterianos .....	13
2.6 Diagnóstico e tratamento da mastite bovina .....	15
2.7 Sanitização no período da ordenha .....	18
2.8 Gênero <i>Salvinia</i> .....	21
2.8.1 <i>Salvinia auriculata</i> .....	22
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	25
<b>3. REFERÊNCIAS</b> .....	26
<b>CAPÍTULO I - ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRA- TOS ORGÂNICOS DE FOLHAS E RAÍZES DE <i>Salvinia auri- culata</i> Aubl. CONTRA ESTIRPES DE <i>Staphylococcus aureus</i> DE ORIGEM BOVINA</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	36
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	37
2.1 Objetivo Geral .....	37
2.2 Objetivos Específicos .....	37
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
3.1 Material vegetal .....	38
3.2 Preparo dos extratos vegetais .....	38
3.3 Avaliação da atividade biológica .....	38
3.3.1 Micro-organismos e meios de cultivo .....	38
3.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos orgânicos de <i>S. auriculata</i> .....	39
3.3.3 Efeito dos extratos orgânicos ativos sobre o biofilme pré-formado .....	39
3.4 Ensaio de citotoxicidade dos extratos orgânicos ativos .....	40
3.4.1 Cultivo celular .....	40
3.4.2 Avaliação da citotoxicidade .....	41
3.5 Determinação da eficácia dos extratos orgânicos de <i>S. auriculata</i> atra- vés do modelo de excisão do teto ( <i>ex-vivo</i> ) .....	42
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
4.1 Obtenção dos extratos .....	44

4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos orgânicos de <i>S. auriculata</i> .....	46
4.3 Avaliação da toxicidade dos extratos orgânicos ativos de <i>S. auriculata</i> em células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T).....	52
4.4 Avaliação da ação dos extratos orgânicos ativos de <i>S. auriculata</i> na formação do biofilme pré-formado.....	53
4.5 Modelo de excisão do teto ( <i>ex-vivo</i> ).....	55
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	59
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	60
<b>CAPITULO II - ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE EXTRATOS OBTIDOS DE FOLHAS E RAÍZES DE <i>Salvinia auriculata</i> Aubl.</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	63
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	65
2.1 Objetivo geral.....	65
2.2 Objetivos específicos.....	65
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	66
3.1 Perfil cromatográfico dos extratos vegetais.....	66
3.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	66
3.1.2 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM).....	66
3.2 Fracionamento cromatográfico dos extratos vegetais.....	67
3.3 Isolamento de metabólitos presentes nos extratos orgânicos de <i>S. auriculata</i> .....	67
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	69
4.1 Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos orgânicos ativos de <i>S. auriculata</i> .....	69
4.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	69
4.1.2 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM).....	73
4.1.2.1 Extrato bruto de raízes éter de petróleo de <i>S. auriculata</i> obtido em Março de 2013.....	73
Composto 1 - Ácido octadecanóico.....	73
Composto 2 - Campesterol.....	74
Composto 3 - Estigmasterol.....	75
Composto 4 - $\beta$ -sitosterol.....	76
4.1.2.2 Extrato bruto de folhas éter de petróleo de <i>S. auriculata</i> obtido em Março de 2013.....	78
Composto 1 - Ácido octadecanóico.....	78
Composto 2 - Campesterol.....	79
Composto 3 - Estigmasterol.....	79
Composto 4 - $\beta$ -sitosterol.....	80
Composto 5 - Sitostanol.....	80

Composto 6 - Campestenona .....	81
Composto 7 - Lupanol .....	82
Composto 8 - Estigmastan-3,6-diona .....	83
4.1.2.3 Extrato bruto etanólico de raízes de <i>S. auriculata</i> obtido em Março de 2013 .....	85
Composto 1 - Ácido octadecanóico.....	85
Composto 2 - Campestanol .....	86
Composto 3 - Estigmasterol.....	87
Composto 4 - $\beta$ -sitosterol.....	87
Composto 5 - Lupanol .....	88
Composto 6 - Lupeol.....	88
4.2 Compostos orgânicos isolados e identificados.....	90
4.2.1 Composto 1 - Estigmasterol.....	92
4.2.2 Composto 2 - $\beta$ -sitosterol.....	93
4.2.3 Composto 3 - Ácido octadecanóico.....	95
4.2.4 Composto 4 - Álcool octadecanol.....	98
4.2.5 Composto 5 - Estigmast-22-eno-3,6-diona .....	101
4.2.6 Composto 6 - Mistura de estigmasterol e $\beta$ -sitosterol .....	105
4.3 Dados espectrais dos compostos isolados.....	107
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	109
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	110
<b>ANEXOS</b> .....	112

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Plantas utilizadas na fitoterapia veterinária de animais de produção (aves, suínos e ruminantes), prospectadas no período de Julho a Setembro de 2014 .....	06
<b>Tabela 2</b>	Produção de leite de origem bovina (em milhões de litros) .....	09
<b>CAPITULO I</b>		
<b>Tabela 1</b>	Rendimento em porcentagem (%) dos extratos de folhas e raízes de <i>Salvinia auriculata</i> em diferentes solventes.....	45
<b>Tabela 2</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos brutos de folhas e raízes de <i>Salvinia auriculata</i> preparados com éter de petróleo contra estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> (mg/mL) .....	46
<b>Tabela 3</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos brutos de folhas e raízes de <i>Salvinia auriculata</i> preparados com diclorometano contra estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> (mg/mL) .....	47
<b>Tabela 4</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos brutos de folhas e raízes de <i>Salvinia auriculata</i> preparados com acetato de etila contra estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> (mg/mL) .....	47
<b>Tabela 5</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos brutos de folhas e raízes de <i>Salvinia auriculata</i> preparados com etanol contra estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> (mg/mL) .....	48
<b>Tabela 6</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) da mistura dos extratos orgânicos de <i>Salvinia auriculata</i> com forte atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> (mg/mL).....	52
<b>Tabela 7</b>	Avaliação da mistura dos extratos brutos ativos de <i>Salvinia auriculata</i> na viabilidade celular de células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T).....	53
<b>Tabela 8</b>	Eficácia germicida dos extratos orgânicos ativos de <i>Salvinia auriculata</i> contra estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> de origem bovina.....	56
<b>CAPITULO II</b>		
<b>Tabela 1</b>	Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de hidrogênios obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto estigmasterol.....	93
<b>Tabela 2</b>	Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de hidrogênios obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto $\beta$ -sitosterol.....	94
<b>Tabela 3</b>	Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de hidrogênios obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto ácido octadecanóico .....	96
<b>Tabela 4</b>	Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de carbonos obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto ácido octadecanóico.....	97

<b>Tabela 5</b>	Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de hidrogênios obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto octadecanol.....	99
<b>Tabela 6</b>	Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de carbonos obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto octadecanol.....	100
<b>Tabela 7</b>	Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de hidrogênios obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto estigmast-22-eno-3,6-diona.....	102
<b>Tabela 8</b>	Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de carbonos obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto estigmast-22-eno-3,6-diona.....	103

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Planta aquática <i>Salvinia auriculata</i> crescida em lagoa .....	24
<b>CAPITULO I</b>	
<b>Figura 1</b> Fluxograma de extração orgânica de folhas e raízes de <i>Salvinia auriculata</i> .....	44
<b>Figura 2</b> Interação planta – solvente nas concentrações inibitórias mínimas bacterianas obtidas contra <i>Staphylococcus aureus</i> .....	50
<b>Figura 3</b> Interação mês – solvente nas concentrações inibitórias mínimas bacterianas obtidas contra <i>Staphylococcus aureus</i> .....	51
<b>Figura 4</b> Avaliação da capacidade de inibição na formação do biofilme pré-formado por estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> de origem bovina de extratos orgânicos ativos de <i>Salvinia auriculata</i> .....	54
<b>Figura 5</b> Quartos mamários excisados e pendurados (a) nos grampos da grade (b).....	56
<b>CAPITULO II</b>	
<b>Figura 1</b> Cromatograma referente ao extrato ativo etanólico de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> obtido em Março de 2013.....	69
<b>Figura 2</b> Cromatograma referente ao extrato ativo éter de petróleo de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> obtido em Março de 2013.....	70
<b>Figura 3</b> Espectro DAD/UV do pico 1 referente ao extrato orgânico ativo etanólico de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> obtido em Março de 2013.....	70
<b>Figura 4</b> Espectro DAD/UV do pico 2 referente ao extrato orgânico etanólico de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> obtido em Março de 2013.....	71
<b>Figura 5</b> Espectro DAD/UV do pico 3 referente ao extrato orgânico ativo éter de petróleo de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> obtido em Março de 2013.....	71
<b>Figura 6</b> Espectro DAD/UV do pico 4 referente ao extrato orgânico ativo éter de petróleo de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> obtido em Março de 2013.....	72
<b>Figura 7</b> Cromatograma do extrato bruto ativo éter de petróleo de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> obtido em Março de 2013.....	73
<b>Figura 8</b> Espectro de massa obtido do pico $T_R = 12,32$ min. referente à fragmentação do extrato bruto éter de petróleo de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> (94 % de similaridade com a biblioteca).....	73
<b>Figura 9</b> Fragmentação característica do ácido octadecanóico.....	74
<b>Figura 10</b> Espectro de massa obtido do pico $T_R = 18,82$ min. referente à fragmentação do extrato bruto éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> (74 % de similaridade com a biblioteca).....	74

<b>Figura 11</b>	Proposta de fragmentação do composto <b>2</b> , onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta.....	75
<b>Figura 12</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 19,13$ min. referente à fragmentação do extrato bruto éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> (87 % de similaridade com a biblioteca).....	75
<b>Figura 13</b>	Proposta de fragmentação do estigmasterol, onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura do composto.....	76
<b>Figura 14</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 19,66$ min. referente à fragmentação do extrato bruto éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> (79 % de similaridade com a biblioteca).....	77
<b>Figura 15</b>	Proposta de fragmentação referente ao $\beta$ -sitosterol, onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura do composto.	77
<b>Figura 16</b>	Cromatograma do extrato bruto ativo éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> obtido em Março de 2013.....	78
<b>Figura 17</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 12,32$ min. referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> (93 % de similaridade com a biblioteca).....	78
<b>Figura 18</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 18,82$ min. referente à fragmentação do extrato bruto éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> (74 % de similaridade com a biblioteca).....	79
<b>Figura 19</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 19,13$ min. referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> (87 % de similaridade com a biblioteca)....	79
<b>Figura 20</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 19,69$ min referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> (79 % de similaridade com a biblioteca).....	80
<b>Figura 21</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 19,85$ min referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> (79 % de similaridade com a biblioteca).....	80
<b>Figura 22</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 19,85$ min. referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> (79 % de similaridade com a biblioteca).....	81
<b>Figura 23</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 20,24$ min. referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> (79 % de similaridade com a biblioteca).....	81
<b>Figura 24</b>	Proposta de fragmentação do composto <b>6</b> , onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta.....	82
<b>Figura 25</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 23,28$ min. referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> (74 % de similaridade com a biblioteca).....	82
<b>Figura 26</b>	Proposta de fragmentação do composto <b>7</b> , onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta.....	83
<b>Figura 27</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 23,78$ min. referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> (82 % de similaridade com a biblioteca).....	83

<b>Figura 28</b>	Proposta de fragmentação do composto <b>8</b> , onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta.....	84
<b>Figura 29</b>	Cromatograma do extrato bruto ativo etanólico de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> coletada em Março de 2013.....	85
<b>Figura 30</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 12,30$ min. referente à fragmentação do extrato ativo etanólico de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> (93 % de similaridade com a biblioteca).....	85
<b>Figura 31</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 18,94$ min. referente à fragmentação do extrato ativo etanólico de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> (74 % de similaridade com a biblioteca).....	86
<b>Figura 32</b>	Proposta de fragmentação do composto <b>2</b> , onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta.....	86
<b>Figura 33</b>	Espectro de massa obtida do pico $T_R = 19,13$ min. referente à fragmentação do extrato ativo etanólico de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> (87 % de similaridade com a biblioteca).....	87
<b>Figura 34</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 19,70$ min. referente à fragmentação do extrato ativo do etanólico de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> (79 % de similaridade com a biblioteca).....	87
<b>Figura 35</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 22,26$ min. referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> (74 % de similaridade com a biblioteca).....	88
<b>Figura 36</b>	Espectro de massa obtido do pico $T_R = 22,95$ min. referente à fragmentação do extrato ativo etanólico de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> (74 % de similaridade com a biblioteca).....	88
<b>Figura 37</b>	Proposta de fragmentação do composto <b>6</b> , onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta.....	89
<b>Figura 38</b>	Substância isolada e identificada a partir do extrato bruto obtido por éter de petróleo em Dezembro de 2012 de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> .....	90
<b>Figura 39</b>	Substâncias isoladas e identificadas a partir do extrato bruto obtido por diclorometano em Janeiro e Fevereiro de 2013 de raízes de <i>Salvinia auriculata</i> .....	90
<b>Figura 40</b>	Substância isolada e identificada a partir do extrato bruto obtido por etanol em Dezembro de 2012 de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> .....	91
<b>Figura 41</b>	Substâncias isoladas e identificadas a partir do extrato bruto obtido por etanol em Março de 2013 de folhas de <i>Salvinia auriculata</i> .....	91
<b>Figura 42</b>	Espectro obtido através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1H$ ) (300 MHz, $CDCl_3$ $\delta$ ) referente ao estigmasterol.....	92

<b>Figura 43</b> Espectro de massas referente à fragmentação do estigmasterol.....	93
<b>Figura 44</b> Espectro obtido pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ $\delta$ ) referente ao $\beta$ -sitosterol.....	94
<b>Figura 45</b> Espectro de massas referente à fragmentação do $\beta$ -sitosterol.....	95
<b>Figura 46</b> Espectro obtido pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ $\delta$ ) referente ao ácido octadecanóico.....	95
<b>Figura 47</b> Espectro obtido pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do carbono ( $^{13}\text{C}$ ) (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ $\delta$ ) referente ao ácido octadecanóico.....	96
<b>Figura 48</b> Espectro de massas referente à fragmentação do ácido octadecanóico.....	97
<b>Figura 49</b> Rearranjo de McLafferty para o ácido octadecanóico.....	97
<b>Figura 50</b> Espectro obtido pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ $\delta$ ) referente ao octadecanol.....	98
<b>Figura 51</b> Espectro obtido pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de carbono $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ $\delta$ ) referente ao octadecanol...	99
<b>Figura 52</b> Espectro de massas referente à fragmentação do octadecanol.....	100
<b>Figura 53</b> Proposta de fragmentação para o octadecanol.....	100
<b>Figura 54</b> Espectro obtido através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ $\delta$ ) referente ao estigmast-22-eno-3,6-diona.....	101
<b>Figura 55</b> Espectro obtido através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de carbono $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ $\delta$ ) referente ao estigmast-22-eno-3,6-diona.....	102
<b>Figura 56</b> Espectro de massas referente à fragmentação do estigmast-22-eno-3,6-diona.....	103
<b>Figura 57</b> Proposta de fragmentação para o estigmast-22-eno-3,6-diona onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta.....	104
<b>Figura 58</b> Espectro obtido através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ $\delta$ ) referente aos compostos $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.....	106

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CCS</b>	Contagem de Células Somáticas
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio deuterado
<b>CG</b>	Cromatografia Gasosa
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CMT</b>	<i>California Mastitis Test</i>
<b>CV</b>	Cristal Violeta
<b><i>d</i></b>	Dublete
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b><i>dd</i></b>	Duplo dublete
<b>EM</b>	Espectro de massas
<b>EPS</b>	<i>Extracellular Polymeryc Substance</i>
<b>eV</b>	Elétron volts
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IIM</b>	Infecções Intramamárias
<b>IV</b>	Infravermelho
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento em Hertz
<b>MH</b>	Muller Hinton
<b>mm</b>	Milímetros
<b><i>m/z</i></b>	Razão relação massa/carga

<b>M<sup>+</sup></b>	Íon molecular
<b><i>m</i></b>	Multiplete
<b><i>ppm</i></b>	Partes por milhão
<b>Pf</b>	Ponto de fusão
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância magnética nuclear de carbono
<b><i>t</i></b>	Triplete
<b>δ</b>	Deslocamento químico em partes por milhão
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>UFV</b>	Universidade Federal de Viçosa
<b>UV</b>	Ultravioleta

## RESUMO

LIMA, Sâmia, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2016. **Constituintes químicos isolados de *Salvinia auriculata* Aubl. e atividade antibacteriana de extratos brutos sobre estirpes de *Staphylococcus aureus* causadoras de mastite bovina.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira e Virginia Ramos Pizziolo.

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos. A grande diversidade encontrada no Brasil justifica o crescimento significativo na utilização de compostos de origem vegetal como potenciais antimicrobianos no combate a diversas infecções. *Salvinia auriculata* é uma macrófita aquática encontrada em climas tropicais. Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa avaliou a promissora atividade antibacteriana da planta contra as bactérias causadoras da mastite bovina. O objetivo deste trabalho foi o isolamento e identificação de constituintes químicos obtidos de folhas e raízes de *S. auriculata* Aubl. e a avaliação da atividade antibacteriana dos extratos orgânicos contra estirpes *S. aureus* de origem bovina. O capítulo I, foi descrita a obtenção dos trinta e dois extratos brutos, utilizando quatro solventes (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e etanol 95%) a partir de duas partes da planta (folhas e raízes) nos quatro meses de coleta (Dezembro, Janeiro, Fevereiro e Março). Também foram avaliados os testes microbiológicos realizados com os extratos orgânicos ativos. A concentração inibitória mínima foi determinada e revelou que os extratos com potente atividade antibacteriana contra *S. aureus* foram extratos brutos de folhas e raízes (coleta de Março) produzidos por éter de petróleo e raízes (coleta de Março) produzido por etanol. Estes três extratos foram misturados em proporções iguais e essa mistura de extratos ativos foi avaliada de acordo com sua atividade citotóxica e seu poder de inibição de biofilme antibacteriano, além de ser avaliado em comparação aos sanitizantes comerciais utilizados na vaca antes e depois da ordenha. Os extratos ativos não apresentaram atividade tóxica em células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T). Entretanto, apresentaram atividade antibiofilme contra *S. aureus* e de acordo com o teste do modelo de excisão dos tetos, a mistura de extratos foi eficaz no combate às bactérias, se comparados com os sanitizantes comerciais. Conclui-se que os extratos orgânicos de folhas e raízes de *S.*

*auriculata* são potentes agentes de combate às estirpes *S. aureus*, e deverá ser investigada como um potente germicida na prevenção e no controle da mastite bovina. No capítulo II, foi descrita a avaliação do perfil cromatográfico (CLAE E CG-EM) dos extratos ativos brutos e o isolamento/ identificação de metabólitos secundários presentes nos extratos brutos analisados. Foram identificados compostos dentre eles, o estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, ácido octadecanóico, álcool octadecanol e estigmast-22-eno-3,6-diona. A atividade antibacteriana do estigmast-22-eno-3,6-diona foi avaliada e demonstrou forte atividade contra estirpes de *S. aureus*.

## ABSTRACT

LIMA, Sâmia, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2016. **Chemical constituents isolated from *Salvinia auriculata* Aubl. and antibacterial activity of crude extracts against *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis.** Advisor: Marisa Alves Nogueira Díaz. Co-advisors: Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira and Virginia Ramos Pizzolo.

Plants are source of biologically important natural products, many of which derive many drugs. A great diversity founded in Brazil justifies a significant growth in the use of plant products as potential antimicrobials against several infections. *Salvinia auriculata* is an aquatic macrophyte with promising antibacterial activity against bacterias that causes bovine mastitis. The aim of this work was the isolation and identification of chemical constituents obtained from leaves and roots of *S. auriculata* Aubl. and evaluation of the crude extracts in the prevention and control of bovine mastitis. On Chapter I, it was evaluated the minimum inhibitory concentration and revealed that the extracts with strong antibacterial activity against *S. aureus* were leaves and roots extracts (March collection) produced by petroleum ether and roots (March Collection) produced by ethanol. Those three extracts were mixed in equal proportion and the cytotoxic activity and antibacterial biofilm inhibition was evaluated. Thus, the mixed were analysed using the Excised Teat Model. The extracts showed no toxic activity in bovine mammary epithelial cells, exhibited antibiofilm activity against *S. aureus* and the agreement with the excised teat model, a mixture of extracts was efficacious against bacterias as compared with comercial germicides. It is concluded that the plant *S. auriculata* is a powerful germicide against *S. aureus* and may eventually be used in the prevention and control of bovine mastitis. On Chapter II, it was described the chromatographic profile (HPLC and GC-MS) of crude extracts with strong antibacterial activity and isolation/ identification of secondary metabolites. The results showed the identification the compounds as stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, octadecanoic acid and stigmast-22-en-3,6-dione. The antibacterial activity of stigmast -22 -ene -3,6 -dione was evaluated and demonstrated strong activity against strains of *S. aureus*.

## 1. INTRODUÇÃO

O complexo agroindustrial leiteiro constitui-se em um dos mais importantes setores do agronegócio brasileiro. Esta relevância é explicada, principalmente, pela importância do leite e derivados lácteos na composição da dieta alimentar humana (SABBAG e COSTA, 2015). Conhecer a realidade da produção leiteira no nosso país é primordial, bem como a instituição de um programa de controle da qualidade do leite conciso e embasado como, por exemplo, em índices epidemiológicos (LANGONI, 2013).

O fator que mais contribui de forma negativa na cadeia produtiva do leite é a mastite bovina. Esta inflamação na glândula mamária é atualmente um dos principais problemas que comprometem o gado e que traz prejuízos para a pecuária leiteira como a diminuição da produção de leite e a perda dos rebanhos afetados. A elevada ocorrência dos casos de mastite bovina e as perdas econômicas decorrentes, principalmente, da diminuição da produção láctea fazem com que esta enfermidade seja considerada a mais dispendiosa nas propriedades leiteiras (SILVA et al., 2009).

O tratamento de infecções intramamárias bovinas é baseado no uso de antibióticos, porém alguns patógenos tornaram-se resistentes à maioria desses antibacterianos, o que limitou as opções de tratamento. Isso reforça a necessidade de encontrar novos antimicrobianos para o tratamento da mastite bovina. Medicamentos de origem vegetal têm sido cada vez mais reconhecidos pela comunidade científica como uma alternativa ao combate das bactérias patogênicas e, em especial, plantas aquáticas têm se mostrado como fontes promissoras de agentes antimicrobianos (ÖZBAY e ALIM, 2009).

*Salvinia auriculata* é uma macrófita aquática livre e flutuante da família Salviniaceae muito comum em água doce, nativa da América do Sul e que se propaga vegetativamente por brotações (PEIXOTO et al., 2005). Em estudos antibacterianos preliminares realizados com o extrato hexânico das raízes observaram-se halos de inibição de 22 mm com concentração inibitória mínima (CIM) de 0,30 mg/mL e diminuição da viabilidade celular bacteriana de no mínimo 90% contra *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite (DIAZ et al., 2010).

No presente trabalho, realizou-se o estudo fitoquímico dos extratos brutos com diferentes solventes de folhas e raízes de *S. auriculata* coletadas na lagoa do campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Avaliaram-se os extratos mais ativos frente às bactérias *S. aureus* causadoras da mastite bovina.

No Capítulo I, foram apresentados os resultados obtidos de uma investigação dos constituintes químicos presentes nos extratos das raízes e das folhas de *S. auriculata* coletadas em quatro diferentes meses do ano (Dezembro, Janeiro, Fevereiro e Março) e produzidos por quatro tipos de solventes (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e etanol 95 %). Foi avaliada a presença de classes de compostos do metabolismo secundário por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), além das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria do infravermelho (IV).

No Capítulo II, foram apresentados os resultados obtidos através da avaliação antibacteriana dos 32 extratos brutos de raízes e folhas de *S. auriculata* contra estirpes *Staphylococcus aureus* de origem bovina. A formação de biofilme pré-formado também foi avaliada utilizando os extratos mais ativos de acordo com a concentração inibitória mínima obtida. E para finalizar, os extratos mais ativos também foram avaliados através no teste de excisão do teto, onde se comparou a eficácia do extrato em reduzir o número de bactérias com os germicidas comerciais utilizados no pré e pós- *dipping*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Produtos naturais

A química de produtos naturais sempre teve papel relevante para o desenvolvimento de fármacos, cosméticos, fragrâncias, e outros bioprodutos, dado a diversidade estrutural e grupos funcionais presentes em milhares de substâncias que compõem tanto a biodiversidade terrestre quanto a marítima. Este imenso laboratório químico altamente sofisticado também desempenha um papel importante na conservação e no uso sustentável da diversidade biológica, especialmente por que são essas substâncias essenciais aos processos biológicos de regulação celular, comunicação química e defesa (BOLZANI, 2016).

Produtos naturais são derivados de metabolismo secundário dos seres vivos. Os vegetais apresentam metabolismos primários e secundários. O metabolismo primário envolve moléculas como carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucléicos e estão relacionados com a sobrevivência do vegetal e exercem função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes. Os metabólitos secundários são biossintetizados a partir dos metabólitos primários e apresentam natureza química diversa, as quais não estão relacionadas com a execução de funções celulares vitais, apresentando diversas outras funções e aplicações; muito destes compostos não apresentam uma distribuição universal entre os vegetais, e alguns são específicos a determinadas espécies. As principais classes de produtos naturais com potencial atividade biológica são alcaloides, terpenos, flavonoides, cumarinas, quinonas e esteroides (CORREA, 2015).

O Brasil é o país detentor da maior diversidade genética do mundo, com cerca de 55 mil espécies catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), e conta com ampla tradição do uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações. Além disso, o país apresenta grande potencial para o desenvolvimento de estudos e de descobertas de plantas medicinais e de fármacos á base delas, pois cerca de 20% das 250 mil espécies medicinais catalogadas pela *United Nations Educational Scientific and Cultural Organization* (UNESCO) são nativos no território brasileiro, o que facilita o aproveitamento do seu potencial curativo para o tratamento de doenças no país. O ecossistema amazônico possui a maior biodiversidade do

planeta, com inúmeras espécies vegetais com propriedades medicinais relatadas e outras em que seus efeitos terapêuticos ainda são desconhecidos (SANTOS et al., 2014).

A investigação de produtos naturais como fontes para a terapêutica humana atingiu o seu auge na indústria farmacêutica ocidental durante a década de 70, o que resultou numa busca por moléculas não sintéticas (KOEHN e CARTER, 2005). Um exemplo é o Captopril, um medicamento mundialmente consagrado, foi planejado por um sofisticado estudo de química medicinal a partir da bradiquinina, um inibidor da enzima conversora da angiotensina isolado do veneno da cobra *Bothrops jararaca* (BOLZANI, 2016).

Os principais mecanismos de descoberta e determinação de compostos com atividade biológica são baseados na triagem de biblioteca de extratos e produtos naturais e isolamento biomonitorado, além do uso de ferramentas no estudo de genética e bioinformática (KOEHN E CARTER, 2005; MONNERET, 2010).

São vários os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos de fontes naturais, especialmente de plantas, incluindo, entre outros, a morfina, o curare, os digitálicos e muitos medicamentos usados no tratamento do câncer (vimblastina, vincristina e taxol), as estatinas usadas nas dislipidemias, os imunossupressores e vários antibióticos (SERPELONI et al., 2008). Atualmente, há um grande interesse das indústrias farmacêuticas pelo uso da biodiversidade como fonte de novos fármacos.

De todas as novas moléculas aprovadas como fármacos antimicrobianos humanos, cerca de 70% é produto natural ou derivado de produtos naturais. Contudo, a investigação em fármacos tendo por base produtos naturais tem vindo a diminuir desde o início do século. Um dos argumentos mais utilizados para a diminuição da investigação em produtos naturais é que os recursos monetários para a identificação e posterior isolamento dos compostos antimicrobianos são muito elevados (BROWN, et al., 2014).

Os produtos naturais derivados da fauna brasileira, especialmente venenos e secreções, são fontes ricas de novas moléculas químicas, as quais podem ser utilizadas como protótipos farmacêuticos no desenvolvimento de novas medicações (TEMPONE, 2007). Klein (2015), em seu estudo, mostrou que a leticina purificada do veneno de *Bothrops jararacussu* foi capaz de inibir

75% e 80% os biofilmes pré-formados de *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente.

A busca por novos princípios ativos que atuem nos principais micro-organismos causadores de enfermidades tanto no homem quanto em animais é crescente, devido a inúmeros fatores, entre eles a resistência destes frente à maioria dos antimicrobianos existentes, o que incentiva ainda mais a procura por produtos originários de fontes naturais, como as plantas medicinais (DUARTE, 2006).

Há diversos fatores que podem influenciar na produção dessas substâncias químicas que participam dos mecanismos de defesa e como consequência, na ação terapêutica da planta, tais como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, altitude, disponibilidade de nutrientes, exposição a patógenos, interações e adaptações co-evolutivas do ecossistema envolvido, dentre outros (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

O uso de plantas medicinais também teve um aumento acentuado devido ao seu consumo estar associado a programas oficiais de saúde. Além da recomendação do uso, tais programas buscam incentivos à exploração e/ou produção sustentada de plantas medicinais. Trabalhos revelam a adoção de programas de incentivo ao cultivo de plantas medicinais como alternativas de diversificação de produção e de renda complementar nas pequenas propriedades rurais. Neste contexto, a produção de plantas medicinais se insere como uma alternativa econômica interessante para os produtores familiares (SOUZA et al., 2012).

Na Medicina Veterinária, também há a utilização de plantas medicinais como exemplificado na tabela 2. Em comunidades rurais o emprego de plantas medicinais para tratamento de animais, sempre se fez presente (NADER et al., 2014). De acordo com Silva e colaboradores (2013), das 52 famílias de um assentamento rural do Estado do Rio de Janeiro, 63,5% trataram seus animais com plantas medicinais. Em um questionário aplicado aos discentes de medicina veterinária do Estado do Rio Grande do Norte, 73,9% conheciam a fitoterapia, dos quais 36,2% usaram-na e obtiveram resultados eficazes (ALMEIDA et al., 2006).

**Tabela 1** Plantas utilizadas na fitoterapia veterinária de animais de produção (aves, suínos e ruminantes), prospectadas no período de Julho a Setembro de 2014.

Nome Científico	Nome popular	Parte usada	Indicação
<i>Allium sativum L.</i>	Alho	Bulbo	Febre, mastite, repelentes
<i>Aloe vera L.</i>	Babosa	Seiva das folhas	Febre, sarnicida, anti-pulga
<i>Anacardium occidentale</i>	Cajueiro	Casca e folhas	Inflamação, cicatrização
<i>Aspidsperma pirifolium</i>	Pereiro	Casca	Ectoparasitas
<i>Azadirachta indica</i>	Nim	Folhas e sementes	Repelente
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Mastruz	Folhas e caule	Cicatrizante, endoparasitas infecções
<i>Citrus limon</i>	Limão	Sumo do fruto	Inflamação respiratória
<i>Curcubita pepo</i>	Jerimum	Semente	Vermífugo
<i>Cymbopogon nardus</i>	Citronela	Óleo essencial	Repelente
<i>Mentha piperita</i>	Menta/Hortelã	Folhas e sumidades floridas	Gripe e febre
<i>Momordica charantia</i>	Melão de São caetano	Sementes	Vermífugo
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Aroeira	Folhas	Cicatrizante, gastrite
<i>Ipomoea purga</i>	Batata de purga	Tubérculo	Vermífugo sarnicida e cicatrizante
<i>Convolvulus operculata</i>			
<i>Peumus boldus</i>	Boldo	Folhas	Antiemético diarréico
<i>Pisidium guayava</i>	Goiabeira	Brotos e folhas	Diarréia
<i>Zingiber officinalis</i>	Gengibre	Raiz	Antisséptico, antiespasmódico
<i>Zizyphus joazeiro</i>	Juazeiro	Folhas e entre casca	Sarnicida e cicatrizante

Fonte: MENDONÇA et al., 2014.

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. Os principais grupos de compostos provenientes do

metabolismo secundário e com propriedades antimicrobianas extraídas de plantas são terpenoides e óleos essenciais, alcaloides, flavonoides, taninos e cumarinas (PEREIRA et al., 2009a).

Os óleos essenciais obtidos de plantas têm sido considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas. Oyarzabal (2011), em seu estudo, mostrou que o óleo essencial de orégano apresentou atividade antibacteriana e antifúngica em testes *in vitro* contra isolados de mastite e não produziu efeito toxicológico persistente.

O estudo de várias espécies vegetais de uso corrente na medicina popular chinesa e do Oriente Médio levou ao isolamento de vários alcaloides ativos. Exemplo disso foi *Huperzia serrata* (sinonímia: *Lycopodium serratum*), que fornece um chá prescrito há séculos na China para o tratamento da febre e inflamação. O estudo fitoquímico dessa planta levou ao isolamento de huperzina A, um candidato interessante para o tratamento de distúrbios do sistema nervoso central e epilepsia, cujo efeito diminui a morte neuronal causada por altas concentrações de glutamato (VIEGAS JR et al., 2004).

Em estudos com a casca do cajueiro (*Anacardium occidentale* L), foi demonstrado que este vegetal possui atividade antibacteriana sobre bactérias que causam a mastite. Sendo assim, pode-se inferir uma possível utilização deste infuso no controle da doença também (DANTAS, 2009).

Schuch (2008), em seu trabalho avaliou a atividade antisséptica e desinfetante de extratos vegetais das espécies *Baccharis trimera*, *Bidens pilosa*, *Eucalyptus* sp., *Polygonum hidropiper* e *Tagetes minuta* frente a isolados de bactérias causadores da mastite bovina e concluiu que os extratos vegetais apresentaram atividade antibacteriana, com destaque para a espécie *Eucalyptus* sp., que inativou todos os micro-organismos avaliados.

Mitidiero (2012) avaliou os aspectos de produção de uma bovinocultura leiteira na qual os animais eram tratados apenas com homeopatia, bioterápicos e fitoterapia e concluiu que em relação à mastite, é viável realizar o controle sanitário em um rebanho leiteiro de alta produção pelo uso destas terapêuticas em substituição aos medicamentos alelopáticos, com redução dos custos de produção, sem comprometer o desempenho produtivo e sem os riscos da contaminação do leite por resíduos.

Nesse contexto, os produtos naturais como os de origem vegetal, tem se destacado tanto por apresentarem atividade antibacteriana, como também pela

sua capacidade de potencializar a atividade antibiótica. A utilização de extratos, oriundos de fontes naturais, com a finalidade de serem agentes antimicrobianos pode ser uma via importante, já que se tem em vista que os mesmos são dotados de uma reduzida possibilidade de ocasionar resistência

microbiana, porque os mesmos são misturas complexas, o que torna a adaptação dos micro-organismos difícil (TINTINO et al., 2015).

Plantas que levam uma vida sésbil em ambientes ricos em nutrientes, como regiões costeiras e lagos se tornam envolvidos por biofilmes microbianos quando não há como combater este biofilme (HU et al., 2006). Estudos mostram que a associação de plantas e micro-organismos favorece o desempenho do vegetal na presença de contaminantes (ZILBER e ROSENBERG, 2008). Isto se deve, pois algumas bactérias são capazes de promover o crescimento da planta e suprimir patógenos, induzindo a resistência sistêmica contra doenças e insetos herbívoros (BERENDSEN et al., 2012). Além disso, é conhecida a elevada resistência bacteriana a condições ambientais adversas. No entanto, poucos estudos com macrófitas aquáticas descrevem os mecanismos de defesa e controle das plantas contra esses micro-organismos. Por essas razões, plantas aquáticas têm atraído o interesse de pesquisadores e se mostrado como fontes promissoras de agentes antimicrobianos (ÖZBAY e ALIM, 2009).

Pereira e colaboradores (2015) avaliaram a atividade biológica de extratos orgânico e aquoso de seis espécies da planta aquática *Azolla* sp. contra bactérias patogênicas e não-patogênicas e leveduras. Os resultados mostraram que os extratos orgânicos de *A. caroliniana*, *A. rubra* e *A. filiculoides* inibiram o crescimento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 enquanto que *A. caroliniana* e *A. microphylla* inibiram o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923, com CIM maiores que 3,25 mg/mL. O extrato aquoso de *A. filiculoides*, *A. caroliniana*, *A. rubra*, *A. microphylla* e *A. microphylla* inibiram o crescimento de *Candida albicans* ATCC 10231 com CIM de 12,5 mg/mL.

## **2.2 O leite e sua importância no mercado econômico**

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de leite, atingindo aproximadamente 35 bilhões de litros anuais, e consumo per capita estimado em 172,6 L/ha/ano (ALVES et al., 2015). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), o país apresentou aumento gradativo na produção leiteira. De 2003 a 2013 a produção cresceu quase 54%. Os ganhos de produtividade advêm, basicamente, da adoção de tecnologias que melhoram a eficiência do uso dos fatores de produção. O melhoramento da

genética nos rebanhos leiteiros, a alimentação e a saúde animal tiveram importante participação nesta evolução (BANDEIRA et al., 2014).

No ano de 2013, a região Sudeste contribuiu com 35% da produção nacional e a região Sul com 34%. Minas Gerais manteve o primeiro lugar no “ranking” da produção leiteira (tabela 2), representando 27% do total produzido, seguido pelo Rio Grande do Sul com 13%, Paraná com 12,6% e Goiás com 11%, segundo dados do IBGE (2014).

**Tabela 2** Produção de leite de origem bovina (em milhões de litros)

Ano 2013		
“ranking”	Grande Região	Produção
1	Sudeste	12.019.946
2	Sul	11.774.330
3	Centro-Oeste	5.016.291
4	Nordeste	3.598.249
5	Norte	1.846.419

Fonte: IBGE, 2014.

O leite bovino é um fluido composto por uma série de nutrientes sintetizados na glândula mamária, a partir de precursores derivados da alimentação e do metabolismo animal. Os componentes incluem água, carboidratos (lactose), gordura, proteínas (caseína e albumina), minerais e vitaminas. O leite é secretado como uma mistura desses componentes e suas propriedades são mais complexas que a soma dos seus componentes individuais (GONZÁLEZ, 2001).

Paralelamente à sua importância como fonte nutricional indispensável à saúde humana, o leite e seus derivados também são excelentes meios para o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis, e outros patogênicos e deteriorantes, havendo a necessidade de cuidados desde a sua produção, ordenha, beneficiamento e estocagem (LANGONI et al., 2011). Ruegg (2003) destacou que riscos à saúde humana e relacionados ao consumo de leite e derivados, podem decorrer do consumo de produtos lácteos crus, de erros na pasteurização, da contaminação destes por patógenos termo resistentes emergentes e/ou da seleção de agentes de zoonoses resistentes a antimicrobianos, além da sua adulteração.

Sendo assim, existe um aumento na demanda global para a produção de leite de qualidade, devido à exigência do consumidor por maior segurança alimentar (MONARDES, 2004). A qualidade do leite pode ser definida em termos de sua integridade, características físicas, deterioração microbiológica e presença de patógenos (DÜRR, 2004). A qualidade do leite *in natura* é influenciada por muitas variáveis, entre as quais se destacam fatores zootécnicos associados ao manejo, alimentação e potencial genético dos rebanhos, além dos processos envolvidos na obtenção e armazenagem do leite.

Um fator que exerce influência extremamente prejudicial sobre a composição e as características físico-químicas do leite é a mastite bovina. A doença resulta em um aumento na contagem de células somáticas (CCS) no leite. Esse aumento influencia negativamente a composição do leite, a atividade enzimática, o tempo de coagulação, a produtividade e a qualidade dos derivados lácteos. A mastite também provoca alterações nos três principais componentes do leite: gordura, proteína e carboidrato (MÜLLER, 2002).

A perda de produção causada pela mastite bovina pode ser drástica, especialmente quando se infectam uma porcentagem significativa do rebanho. A doença pode reduzir em até 50% a produção de leite, diminuindo a vida produtiva da vaca (OLIVEIRA et al., 2011).

### **2.3 Mastite bovina**

A mastite bovina é uma inflamação do parênquima da glândula mamária que acomete grande parte do gado leiteiro mundial, sendo um fator de limitação para a produção de produtos lácteos, influenciando nas propriedades físico-químicas e alterando a qualidade do leite (ZAFALON et al., 2008). O aumento nos custos da produção leiteira também está associado à eliminação de animais, tratamentos e descarte do leite. Com isso, a perda econômica mundial já foi estimada em US \$ 35 bilhões anuais (WANDERLEY, 2015).

Em um trabalho realizado por Holanda Júnior e colaboradores (2005), foram quantificadas as perdas ocasionadas pela mastite bovina em rebanhos da região de Araxá, Minas Gerais. Os pesquisadores constataram que os custos com os prejuízos causados pela inflamação foram de aproximadamente

U\$126,00/vaca/ano, na qual 75% desse total foi decorrente da redução da produção de leite provocada pela mastite. O estado de Goiás, por exemplo, em 2010 deixou de produzir 101 milhões de litros de leite em decorrência da mastite (LQL, 2011).

O impacto da mastite, além de atingir a unidade produtora leiteira, ela também promove mudanças na composição do leite (redução em cálcio, fósforo, proteína e gordura, e aumento em sódio e cloro) reduzindo sua qualidade. Além disso, o antibiótico usado para tratar mastite é uma preocupação importante para a indústria e para a saúde pública. A presença de resíduos de antibióticos no leite interfere na produção de muitos produtos lácteos (queijo e outros produtos fermentáveis) e sabores indesejáveis reduzem o valor dos derivados lácteos e a presença de antibióticos mesmo sendo em baixos níveis pode causar problemas de saúde aos consumidores. A mastite é uma das principais causas do uso de antibióticos em vacas leiteiras (TOZZETTI et al., 2008).

A quantidade de micro-organismo presente no leite cru constitui importante indicador de sua qualidade e pressupõe a saúde da vaca e a higiene de ordenha. Os micro-organismos contaminantes do leite, após a ordenha, provenientes de equipamentos e utensílios, do meio ambiente e do pessoal responsável pela ordenha e manipulação do leite, são relevantes, podendo causar alterações indesejáveis, comprometendo sua qualidade e de seus derivados (CAVALCANTI, 2006). Isso explica a importância da conscientização do ordenhador dos procedimentos adequados de ordenha, incluindo as formas corretas de higienização e desinfecção do ambiente, do animal, do profissional e de todos os utensílios utilizados na ordenha, bem como a conservação do leite em baixas temperaturas (COSER et al., 2012).

#### **2.4 Micro-organismos envolvidos na mastite bovina**

A mastite bovina é causada principalmente por bactérias, mas outros micro-organismos (como fungos) ou até mesmo choques e lesões podem causar esta inflamação (TOZZETTI et al., 2008). Os micro-organismos causadores de mastite bovina são divididos em dois grupos, em função de suas características, como contagiosos e ambientais.

Os agentes contagiosos são transmitidos de animal a animal, ou mesmo de um quarto mamário para outro, no mesmo animal. Isto acontece, principalmente, durante a ordenha, por má higiene dos ordenhadores e da sala de ordenha, reutilização de toalhas de limpeza dos tetos e ordenha de vacas afetadas antes da ordenha das vacas saudáveis. Os agentes de maior importância são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma bovis* (COUTINHO, 2014).

Os agentes ambientais, como o próprio nome indica, estão presentes no meio ambiente, podendo ser isolados de fezes, camas, solo, água contaminada, entre outros. Exemplos de patógenos são: *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, fungos, leveduras e algas, entre outros (LANGONI et al., 2013). Aproximadamente 50% das mastites provocadas por agentes ocorre durante o período seco (SMITH, 2009).

Quanto às bactérias isoladas de animais com mastite contagiosa na forma clínica e subclínica, a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* é uma das principais, sendo responsável por produzir uma gama de fatores de virulência que contribui para a patogênese. Cerca de 10% dos estafilococos causadores de mastite, produzem toxinas termoestáveis capazes de intoxicar o homem através do consumo de leite e que, quando ingeridas, provocam náusea, vômito e diarreia (SABEDOT et al., 2014). De acordo com os dados do Serviço de Vigilância Sanitária (SVS) do Ministério da Saúde, *S. aureus* foi o segundo patógeno mais frequente em surtos com agente etiológico conhecido, representando 20% dos casos ocorridos nos últimos anos (BRASIL, 2013).

A glândula mamária de uma vaca adulta é constituída por quatro quartos mamários, cada um contendo um teto, sendo a estrutura resultante denominada úbere. Cada teto faz a drenagem do quarto correspondente. Uma fração do leite sintetizado é drenada dos alvéolos, através de ductos, para ser armazenada nas cisternas do úbere. Outra fração fica armazenada nos alvéolos até a sua ejeção representando esta, a maior parte do leite excretado no período da ordenha (SMITH, 2009).

O canal e pele dos tetos constituem uma primeira linha de defesa da infecção microbiana, como uma barreira física e mecânica. No canal do teto, a queratina é produzida constantemente para a formação de um tampão que visa

o impedimento da entrada de micro-organismo na glândula mamária. A integridade da pele do teto também contribui para a redução do risco de IIM (infecções intramamárias), já que traumas e lesões podem abrigar micro-organismos causadores de mastite (RAINARD e RIOLLET, 2006). Caso a primeira linha de defesa não seja efetiva, atua a segunda linha de defesa, constituída por diferentes tipos de leucócitos e células epiteliais (células somáticas) (TEIXEIRA et al., 2008).

O processo de inflamação é iniciado quando micro-organismos patogênicos invadem o canal do teto e multiplicam-se no interior dos tecidos mamários. Após a invasão da glândula mamária, ocorre intensa migração de leucócitos do sangue para o leite, com o objetivo de eliminar o agente infeccioso, bem como reduzir a permeabilidade vascular e outros sinais da inflamação. A resposta inflamatória desencadeada pelo processo infeccioso tem por objetivo a eliminação do micro-organismo causador, a neutralização de toxinas e a regeneração dos tecidos danificados (SANTOS e FONSECA, 2006). A resolução da infecção pode resultar em fibrose, formação de abscessos ou atrofia glandular (RIBEIRO JÚNIOR e BELOTI, 2012).

Além da produção de enterotoxinas, uma característica importante do *S. aureus* é a sua capacidade de formar biofilmes, tanto em superfícies biológicas quanto inertes. Em muitos casos clínicos, a resposta imune do hospedeiro contra infecções persistentes é ineficaz, podendo levar a um quadro de doença crônica. Além disso, bactérias do gênero estafilococos presentes em biofilmes demonstram elevada resistência a antimicrobianos, o que pode comprometer ainda mais o tratamento e seu controle (MARTIN, 2015).

## **2.5 Formação de biofilmes bacterianos**

As bactérias existem em dois estados de vida básicos: como células planctônicas, também conhecidas como células de vida livre ou como células sésseis, também conhecidas como biofilmes. As células planctônicas são importantes para a rápida proliferação e propagação dos micro-organismos para novos territórios, enquanto que as células sésseis caracterizam a cronicidade (TRENTIN et al., 2013). Esses micro-organismos tem a capacidade de aderirem em superfícies abióticas como vidro, poliestireno, fibra de aço e

em superfícies bióticas como células e tecidos, podendo inclusive ser formado na superfície da água (CULLER, 2010).

A matriz exopolimérica produzida pelo crescimento bacteriano na forma de colônias aderentes consiste, principalmente, de água (até 95%), polissacarídeos, proteínas e DNA. Ela acumula substâncias do meio ambiente tais como sais minerais, proteínas do sangue e envolve as células bacterianas (PELGRIFT e FRIEDMAN, 2013).

Existem várias teorias propondo etapas para o processo de formação de biofilmes. Dentre todas elas, é de senso comum que na formação do biofilme, a etapa inicial corresponde ao processo de adesão inicial do micro-organismo à superfície a ser colonizada. Nesse processo reversível, as células aderem à superfície condicionada. A etapa inicial é seguida da secreção das moléculas de adesão intercelulares, secreção de substâncias poliméricas extracelulares (*extracellular polymeric substances* – EPS), consolidação da estrutura e em seguida a liberação de células ou agregados celulares da estrutura do biofilme (FARIA, 2012).

Um dos principais mecanismos de manutenção das atividades de um biofilme está intimamente relacionado com mecanismos de *quórum-sensing*, que consistem basicamente na produção e liberação de moléculas sinalizadoras e autoindutoras, cuja concentração aumenta em função da densidade populacional bacteriana. As bactérias são capazes de detectar um determinado limiar de estimulação dessas moléculas autoindutoras, promovendo alterações na expressão genética e, por conseguinte, um determinado comportamento. Dessa maneira, as bactérias de uma comunidade podem sincronizar suas atividades, funcionando como organismos multicelulares (MARTIN, 2015).

A idade do biofilme é uma variável importante que pode influenciar a susceptibilidade dos micro-organismos associados. Monzon e colaboradores (2002) relataram que o aumento da idade do biofilme formado por *Staphylococcus epidermidis* estava associado com a redução da eficácia de vários agentes antimicrobianos, incluindo cefalotina, clindamicina, eritromicina, vancomicina e teicoplanina. É possível também que o aumento da quantidade de matriz produzida com a idade do biofilme resulte em baixo gradiente de

nutrientes e oxigênio, afetando o metabolismo e as taxas de crescimento celular bacteriano (DONLAN, 2002).

Partindo do princípio que o ideal mais lógico seria prevenir a formação dos biofilmes antes de tratar as infecções causadas por bactérias e que o tratamento isolado com antibióticos resulta apenas na eliminação das células planctônicas, torna-se evidente a importância do desenvolvimento de estratégias de prevenção e combate à formação de biofilmes microbianos (STEWART e FRANKLIN, 2008; SIMÕES et al., 2011).

Neste contexto, um interesse renovado em substâncias naturais chamou a atenção para plantas ricas em metabólitos secundários, conhecidos por suas propriedades antimicrobianas. De Araújo (2015) em seu estudo avaliou a atividade antibiofilme de *Terminalia fagifolia* e tanto o extrato etanólico da casca quanto as frações do extrato (aquosa, hidroalcoólica e hexânica) mostraram uma inibição significativa da formação de biofilme, com inibição de mais de 80% para algumas estirpes do gênero *Staphylococcus* ssp. testadas.

## **2.6 Diagnóstico e tratamento da mastite bovina**

Com relação ao diagnóstico, as infecções da glândula mamária podem apresentar-se, quanto a sua forma de manifestação, em clínica e a subclínica.

A mastite clínica é caracterizada por resposta inflamatória mais severa que a subclínica, com alterações das características do leite, com o aparecimento de grumos de pus e sangue, verificados no teste da caneca de fundo preto, ao se examinar os primeiros jatos de leite. Em determinados casos, pode causar inclusive alterações sistêmicas na vaca, que em um quadro agudo da mastite infecciosa, causada por *S. aureus* caracteriza hipertermia, úbere quente e edemaciado. Em casos mais graves pode ocorrer até mesmo a gangrena e secagem da glândula (CALLEFE e LANGONI, 2015).

A mastite subclínica caracteriza-se pela diminuição da produção leiteira, sem que, contudo, se observem alterações evidentes do processo inflamatório. Esta forma de manifestação da mastite é a responsável pelos maiores prejuízos na produção leiteira; estima-se que, para cada vaca com mastite clínica, existam em média sete, ou mais, com mastite subclínica (MARTINS et al., 2010). Entre as principais alterações, destaca-se o aumento da contagem

de células somáticas, o aumento dos teores de cloreto de sódio, proteínas séricas e diminuição do percentual de caseína, gordura, sólido total e lactose do leite (TOZZETTI et al., 2008).

O diagnóstico mais utilizado para identificar a mastite subclínica é o *California Mastitis Test* (CMT) que, de acordo com a intensidade da reação, classifica-se em negativa (0), reação leve (+), moderada (++) e intensa (+++). O teste CMT é um indicador indireto da CCS no leite sendo estas compostas basicamente pelas células de descamação do epitélio secretor e leucócitos de origem do sangue, que se apresentam com elevadas concentrações nos casos de mastite (FONSECA e SANTOS, 2000; RIBEIRO et al., 2003).

As perdas econômicas ocorrem devido à redução temporária ou permanente na produção de leite, descarte de leite devido ao uso de antimicrobianos, redução no preço causado pelo aumento das contagens de células somáticas, redução da vida produtiva do animal, além dos custos com tratamento e mão de obra (VIGUIER et al., 2009). O tratamento da inflamação é por meio da administração de antibióticos, e isto é um dos fatores de impacto econômico na produção leiteira, representado pelos custos de medicamentos, mão-de-obra e descarte do leite. Na prática, é realizado por via sistêmica ou por via intramamária. A via intramamária é a mais utilizada por apresentar menores efeitos colaterais, maior facilidade de aplicação e menor custo (OYARZABAL et al., 2011).

A principal fonte de resíduos de antimicrobianos no leite são os tratamentos para a mastite, que em grande maioria, são oriundas do manejo inadequado desses fármacos, além da ampla utilização desses antimicrobianos para o tratamento de outros processos infecciosos no rebanho bovino leiteiro. Para isso, é preciso o controle desse tipo de medicamento em bovinos leiteiros, prevenindo-se os resíduos de antimicrobianos no leite. Foram desenvolvidos testes quantitativos e qualitativos, que com o passar dos anos se tornaram mais específicos e tecnológicos, que detectam resíduos de sulfonamidas, gentamicina, tilosina, entre outros, bastante utilizados pela indústria de laticínios. Tão importante a detecção de resíduos, que foi criado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal

(PAMVET) para monitoramento e controle de resíduos (CALLEFE e LANGONI, 2015).

O uso abusivo de antibióticos têm selecionado cepas resistentes. Em um estudo, pesquisadores mostraram que as cepas de bactérias Gram-positivas de *S. aureus* e *S. agalactiae* isoladas de bovinos em Portugal apresentaram altos níveis de resistência aos antibióticos penicilina e ampicilina (NUNES et al., 2007). Machado e colaboradores (2008), ao analisarem cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados de vários rebanhos de diferentes regiões brasileiras, notaram um alto grau de resistência a vários antibióticos: penicilina (93,5%), sulfonamida (88,9%), novobiocina (88,6%) e ampicilina (85,3%).

As vacinas também são utilizadas no combate a inflamação. Alguns exemplos são: Pfizer Animal Health, Upjohn J-5 Bacterin®; Bayer Mastiguard™; Merial, J-Vac®; IMMVAC Endovac-Dairy®; Novartis Animal Health J-5 Shield™. As medidas preventivas tradicionais como adequado manejo da ordenha e manutenção da higiene das ordenhadeiras, utensílios e da área de permanências dos animais continuam a desempenhar um papel fundamental no controle da doença; a vacina pode ser utilizada como um complemento no combate à infecção, mas não como um substituto de todas as outras medidas preventivas (MATA et al., 2013).

O rápido desenvolvimento de resistência na terapia antibacteriana tem motivado a pesquisa de novos fármacos capazes de combater de forma eficaz e segura os patógenos (MACHADO et al., 2010).

As plantas são ricas em substâncias bioativas e já estão sendo utilizadas, por exemplo, nas propriedades agrícolas como forma alternativa no controle de pragas e parasitos, muitas delas são biodegradáveis apresentando baixa ou nenhuma toxicidade (CORRÊA e SALGADO, 2011). Em um estudo realizado em 2010, foi mostrado que extratos obtidos das espécies *Senna macranthera*, *Artemisia absinthium*, *Cymbopogum gonnarduse* e *Baccharis dracunculifolia* apresentaram eficácia contra *S. aureus*, principal agente da mastite bovina (DIAZ et al., 2010). Bulgacov e colaboradores (2015) testaram a eficiência do óleo de copaíba contra *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite subclínica em 79 quartos mamários de vacas em lactação, além de comparar a sensibilidade do mesmo patógeno ao cloranfenicol e à enrofloxacin. Os

resultados mostraram-se positivos, pois 94,93% (75/79) das amostras foram sensíveis à pelo menos um dos cremes à base de óleo de copaíba. Em relação ao cloranfenicol e à enrofloxacin, 89,87% (71/79) das amostras apresentaram sensibilidade à ambos os antibióticos. Higino e colaboradores (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana de taninos isolados da jurema vermelha *Mimosa arenosa* (Willd Poir) sobre *S. aureus* de origem bovina e mostraram que os taninos inibiram o crescimento bacteriano formando halos que variaram de 10 a 20 mm de diâmetro e apresentaram concentração inibitória mínima de 15,6 µg/mL.

## **2.7 Sanitização no período da ordenha**

O leite de qualidade deve possuir três atributos: qualidade higiênica, valor nutritivo e manutenção das propriedades organolépticas. A saúde e o manejo do rebanho são fundamentais para a qualidade do leite produzido, nos quais os procedimentos higiênicos adotados na produção e no armazenamento do leite nas propriedades rurais são pontos cruciais. A presença de coliformes em tanques, por exemplo, é sugestiva de deficiências de manejo na ordenha (SIQUEIRA et al., 2014).

Uma rotina de ordenha bem controlada seguida de uma correta higienização de utensílios e dos equipamentos nela utilizados, certamente contribuirá para uma redução significativa de doenças como a mastite e, conseqüentemente, para o aumento da produção e da qualidade do leite produzido (MITTELMANN, et al., 2006). A qualidade de um produto possui relação direta com as condições em que são produzidos. Para isso, é muito importante identificar quais fatores afetam a qualidade nas atividades produtivas e operacionais e a partir de sua identificação, desenvolver diretrizes para a melhoria da qualidade planejada. Além disso, o sucesso no desenvolvimento e manutenção de um sistema de qualidade depende da importância atribuída a esse quesito pelos gestores da propriedade, bem como da relevância de alguns fatores-chaves como as características culturais de serviço, principalmente, de seus manipuladores, os quais deverão estar motivados e envolvidos no processo (NOAL, 2006).

No controle de biofilmes microbianos encontrados na indústria de laticínios, por exemplo, o uso adequado de agentes de limpeza é imprescindível. A correta seleção das soluções de limpeza, como detergentes e sanificantes, depende de fatores como eficácia, segurança e facilidade de remoção após a aplicação (SIMÕES e VIEIRA, 2010).

A adoção de procedimentos como pré e pós-*dipping* (ordenha), terapia da vaca seca, descarte de vacas com mastite crônica, treinamento de trabalhadores para ordenha higiênica, manutenção dos equipamentos de ordenha e realização sistemática de testes como CMT e cultivo microbiano dos quartos mamários positivos, podem contribuir, significativamente, no controle e profilaxia da mastite, e na melhoria da qualidade do leite nos criatórios amostrados (FONSECA e SANTOS, 2000). Os produtos químico-sintéticos mais utilizados no Brasil para desinfecção de tetos e teteiras são os compostos halogenados (cloro e iodo), clorexidina, aldeídos e compostos de amônia quaternária (LADEIRA, 2001).

Alguns trabalhos já demonstraram a importância, por exemplo, do uso do pré e pós-*dipping* na redução da incidência de novas infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus* spp. e outros patógenos relacionados a casos de mastites, bem como a diminuição da contagem de células somáticas (PEIXOTO et al., 2015).

Em um estudo realizado em Wisconsin, nos Estados Unidos (RODRIGUES et al., 2005) incluindo 180 rebanhos leiteiros que integravam um programa de melhoria da qualidade do leite, foi observado que a incidência mensal de mastite clínica foi menor em rebanhos que adotavam práticas de manejo de ordenha como o uso de pré-*dipping* (incidência média = 6,0%), uso de rotina de ordenha completa (incidência = 5,5%) incluindo exame visual dos primeiros jatos de leite, antissepsia das tetas e utilização de uma toalha individual por animal para secagem das tetas, além do treinamento frequente dos ordenhadores (incidência = 5,8%), quando comparados a rebanhos que não adotavam tais práticas de manejo (incidência = 19,0, 10,3 e 9,6%, respectivamente).

Peixoto e colaboradores (2015) em seu trabalho avaliaram a ação de dois produtos pós-*dipping* a base de iodo (0,7%) e clorexidina (2,0%) sobre a adesão de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus*

coagulase negativa (SCN) isolados de casos de mastite subclínica, e também sobre biofilmes pré-formados a partir destes isolados. Os produtos testados apresentaram uma alta redução na taxa de adesão de todos os isolados. Silva e colaboradores (2015) demonstraram neste estudo a sensibilidade de 101 cepas de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina *in vitro* frente a quatro desinfetantes pós-*dipping*: iodo 2; 1 e 0,5%; hipoclorito de sódio 2,5; 1,25 e 0,62%; clorexidina 2,0; 1,0 e 0,5% e quaternário de amônia 0,68; 0,34 e 0,17%. Verificaram que todas as concentrações utilizadas dos desinfetantes mostraram-se eficazes para completa eliminação do agente nos tempos de 30 e 60 minutos. Observaram também as seguintes porcentagens de resistência aos desinfetantes: 15,8% ao iodo na concentração 0,5%; 10,8% ao hipoclorito de sódio (0,62%) e 7,9% ao quaternário de amônio (0,17%). A clorexidina demonstrou *in vitro* 100% de eliminação das estirpes de estafilococos em todos os tempos e concentrações testadas.

O hipoclorito de sódio (NaClO) é um composto químico usado para branqueamento ou desinfecção e, como tal, tem sido utilizado para a desinfecção de superfícies na indústria de alimentos, por exemplo, pois é um poderoso agente oxidante que interfere com a síntese de DNA e reage com as proteínas intracelulares, parede celular e componente da matriz extracelular. Entretanto, tem uma difusão limitada nos biofilmes (ANDRE, 2015). O iodo, assim como o cloro, é amplamente utilizado como componente ativo no controle da mastite, com concentrações variando de 0,10 a 1,0% (VICARIO et al, 2009). Contudo, altas concentrações de iodo aumentaram o risco de contaminação do leite, principalmente, no pré-*dipping* (LOPES et al., 2013).

Toté e colaboradores (2010) avaliaram o efeito inibitório de diferentes biocidas sobre a viabilidade celular e os biofilmes de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e, dentre os biocidas analisados, o hipoclorito de sódio mostrou-se efetivo, tanto na redução da viabilidade das células aderidas quanto na remoção da matriz do biofilme.

O uso dos desinfetantes nas práticas de higiene da exploração leiteira é um costume antigo e ainda atual, que desempenha uma função muito importante na rentabilidade da fazenda, contribuindo para a produção de alimentos lácteos de alto padrão e para a obtenção de um rebanho sadio. No entanto, variações no perfil de sensibilidade e resistência dos micro-

organismos envolvidos nos processos infecciosos da glândula mamária de animais de produção leiteira podem comprometer os programas de controle da mastite (COUTINHO et al., 2012).

Para ter boa eficiência do controle de mastite e um bom manejo de ordenha, é importante usar um produto de confiança (LOPES et al., 2013). A busca de novas fontes germicidas na flora e fauna pode ser uma alternativa aos produtos comerciais, diminuindo gastos com a compra de desinfetantes e reduzindo a contaminação do leite por resíduos de iodo, por exemplo.

## **2.8 Gênero *Salvinia***

As macrófitas aquáticas são vegetais de elevada importância para o ecossistema aquático, contribuindo para a síntese de matéria orgânica a partir de compostos inorgânicos nesses ambientes, participando da ciclagem e estocagem de nutrientes e no controle da poluição e da eutrofização artificial. Essas plantas promovem a diversificação de habitats, criando locais de abrigo e alimentação para fauna sendo, portanto, de grande relevância para manutenção da diversidade biológica (GOMES e AOKI, 2015). O desenvolvimento e abundância das macrófitas são decorrentes da eutrofização natural, em função da introdução de nutrientes oriundos dos ecossistemas terrestres adjacentes por escoamento superficial ou pela introdução direta de despejos domésticos e industriais nos corpos d'água (BIZZO, 2012).

De acordo com Mickel & Smith (2004), *Salvinia* é um gênero pantropical, ou seja, sua distribuição cobre as regiões tropicais de todos os continentes. Todas elas ocorrem em lagoas ou rios com correnteza fraca. É um gênero facilmente reconhecido pelas folhas verticiladas, sendo duas flutuantes, inteiras e verdes e uma submersa, muito dividida (semelhante a uma raiz) e aclorofilada (PRADO, 2006).

As macrófitas aquáticas flutuantes, principalmente em países de clima tropical, apresentam taxas elevadas de crescimento, pois possuem a capacidade de absorver e estocar grande quantidade de nutrientes. Também são consideradas altamente produtivas, principalmente em ambientes, devido a grande plasticidade fenotípica e rápida reprodução vegetativa (BRIX, 1997).

Em vários locais alterados por atividades antrópicas, as espécies do gênero *Salvinia* proliferam-se de forma indesejada, devido ao excesso de

nutrientes (compostos químicos ricos em fósforo ou nitrogênio) numa massa de água, provocando um aumento excessivo de biomassa. Este aumento pode levar a uma diminuição do oxigênio dissolvido, provocando a morte e consequente decomposição de muitos organismos, diminuindo a qualidade da água e eventualmente a alteração profunda do ecossistema, causando prejuízos econômico e sanitário ao uso múltiplo do ecossistema aquático no que se refere à geração de energia elétrica, navegação, suprimento de água, usos recreativos, entre outros (MOOZHIL e PALLAUF, 1986).

Ao processo de absorção de metais pelas macrófitas aquáticas com objetivo de eliminá-los do meio aquático é dado o nome de fitorremediação. O uso de macrófitas aquáticas como as do gênero *Salvinia* tem sido difundido, principalmente, devido a necessidade de alternativas mais viáveis do ponto de vista ecológico e econômico, de despoluição de ecossistemas aquáticos (BIZZO, 2012). O gênero compreende várias espécies tais como: *Salvinia auriculata*, *Salvinia biloba*, *Salvinia cucullata*, *Salvinia cyathiformis*, *Salvinia hastata*, *Salvinia herzogii*, *Salvinia minima*, *Salvinia molesta*, *Salvinia natans*, *Salvinia nymphellula*, *Salvinia oblongifolia*, *Salvinia radula*, *Salvinia rotundifolia* e *Salvinia sprucei*.

### **2.8.1 *Salvinia auriculata***

*Salvinia auriculata* (figura 1), conhecida popularmente como orelha-de-onça ou salvinia, é uma macrófita aquática livre e flutuante, que coloniza extensas superfícies de água doce em um tempo reduzido. É uma espécie comum em ambientes aquáticos tropicais e tem ampla distribuição geográfica, sendo ausente em regiões frias (LOLIS e THOMAS, 2011). É uma planta anual ou perene, que possui folhas ovaladas, de 2,5 por 2 centímetros, cheias de pelos que repelem a água. As raízes verdadeiras estão ausentes; na verdade são folhas modificadas que saem de uma estrutura em formato de âncora, abaixo das folhas, que se comportam como esponja segurando água e sedimentos (WOLFF et al., 2009).

Nativa da América do Sul, *Salvinia auriculata* é encontrada no México, Grandes Antilhas, Trinidad e Tobago, Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina, Chile e Brasil (PRADO, 2006). No Brasil, por or-

dem cronológica, a *S. auriculata* já foi encontrada nos estados do Amazonas, Pará, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Ceará, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rio Grande do Norte e Paraíba (SOUZA et al., 2001).

O desenvolvimento de tecnologias alternativas para remoção de poluentes como os metais pesados e corantes presentes em águas contaminadas tem se apresentado de significativo interesse ambiental devido à crescente poluição do meio ambiente. A contaminação de ambientes aquáticos por estes poluentes pode causar efeitos nocivos à saúde humana devido à sua toxicidade e persistência no meio, acumulando-se ao longo da cadeia alimentar (OLIVEIRA et al., 2015). A planta *S. auriculata* é conhecida por seu perfil fitorremediador de ambientes contaminados, apresentando resistência a estresse abiótico, como já reportado para os metais zinco, cádmio, cromo e níquel. Neste sentido, tem sido destacada sua elevada resistência a estresses ambientais (PEIXOTO et al., 2005, WOLFF et al., 2009, BIZZO, 2012).

A alta produção de biomassa de *S. auriculata* tem despertado interesse para o uso em benefício do homem. A utilização de plantas aquáticas como agente purificador de águas contaminadas, justifica-se pela sua intensa absorção de nutrientes e pelo seu crescimento rápido, como também por oferecer facilidades de sua retirada das lagoas. Assim, *S. auriculata* é reconhecida por seu papel como bioindicadora de poluição (NUÑEZ et al., 2011). *S. auriculata* também pode ser utilizada como abrigo para larvas de peixes (LACERDA et al., 2010), para tratamento de efluentes da piscicultura (SOARES et al., 2008) e sua biomassa pode ser utilizada como biofertilizante ou alimentos para gados (TOLEDO e PENHA, 2011). Entretanto sob condições favoráveis *S. auriculata* possui habilidade de colonizar muito rapidamente ambientes aquáticos através de propagação vegetativa e desta forma pode se proliferar de forma inadequada causando prejuízo aos múltiplos usos dos mesmos (PEIXOTO et al., 2005). Rossi e colaboradores (2011) mostraram o potencial antimicrobiano de extratos brutos de *S. auriculata* e *Hydrocleys nymphoides* contra bactérias Gram-positivas isoladas de vacas com mastite bovina.



**Figura 1** Planta aquática *Salvinia auriculata* crescida em lagoa.

### 3 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo fitoquímico de extratos obtidos de folhas e raízes da planta aquática *Salvinia auriculata* e a avaliação da atividade antimicrobiana desses extratos sobre bactérias *Staphylococcus aureus* causadoras de mastite bovina.

#### 4 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, K.S.; FREITAS, F.L.C.; PEREIRA, T.F.C. Etnoveterinária; a fitoterapia na visão do futuro profissional veterinário. **Revista Verde**, v.1, n.1, p.67-74, 2006.

ALVES T.S.; M.M.G.; SIQUEIRA, A.K.; FERRAZ, M.M.G.; LEITE, D.S. Identificação e perfil de sensibilidade de *Enterobacter* spp. isolados de leite bovino cru. **Veterinária e Zootecnia**; 22(1): 114-122. 2015.

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

BANDEIRA, D.D. MUNARETTO, J.S.; RIZZETTI, T.M.; FERRONATO, G.; PRESTES, O.D.; MARTINS, M.L.; ZANELLA, R.; ADAIME, M.B. Determinação de resíduos de agrotóxicos em leite bovino empregando método quechers modificado e GC-MS/MS. **Química Nova**, Vol. 37, No. 5, 900-907, 2014.

BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J.; BAKKER, P.A.H.M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**. 17:478-486, 2012.

BIZZO, A. **Respostas fisiológicas de *Salvinia auriculata* Aubl. à adição de cobre**. Monografia – Campos dos Goytacazes, 2012

BOLZANI, V.S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**. 2016

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS**. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos- Abril 2013.

BRIX, H. Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands? **Water Science Technology**. 35(5): 11-17; 1997.

BROWN, D. G.; LISTER, T.; MAY-DRACKA, L.; New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. **Bio. & Med. Chem. Lett.** 24, 413-418, 2014.

BULGACOV, A.; SILVA, L.C., JUNIOR, F.A.B.; SUHETTI, W.G.; TEIXEIRA, T.G. Susceptibilidade de *Staphylococcus* ssp. ao óleo de copaíba, cloranfenicol ou enrofloxacin em cepas isoladas de casos de mastite subclínica em vacas de leite. **Revista Integração**, 14 (2): 90-95, 2015.

CALLEFE, J.L.R.; LANGONI, H. Qualidade do leite: uma meta a ser atingida. **Veterinária e Zootecnia**. 2015.

CAVALCANTI E. R.C.; **Fatores que interferem na qualidade do leite**. Disponível em [http://urutai.ifgoiano.edu.br/documentos/publicacoes/artigo\\_leite.2006.pdf](http://urutai.ifgoiano.edu.br/documentos/publicacoes/artigo_leite.2006.pdf) Acessado em: 28 de mai. 2014.

CORRÊA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, p.500-506, 2011.

CORREA, J.A.M. **Estudo químico de extratos de plantas da família Solenaceae com atividade a fungos fitopatogênicos**. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 164p. Piracicaba, 2015.

COUTINHO, L.C.A.; MEDEIROS, E.S.; SILVEIRA, N.S.S.; SILVA, L.B.G.; MOTA, R.A. Eficácia *in vitro* de desinfetantes utilizados na antisepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. **Pesq. Vet. Brasileira** 32(1):61-65, 2012.

COUTINHO, M.A.B.P. **Avaliação da relação entre contagens de células somáticas e os agentes mais prevalentes de mastite em explorações leiteiras da região de entre douro e vouga**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. 2014.

COSER, S. M; LOPES, M.A.; COSTA, G.M., Mastite Bovina: controle e prevenção, **Boletim Técnico** - n.º 93 - p. 1-30 ano 2012.

CULLER, H.F. **Formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 120 f. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DANTAS, S.A.F.; SENA, L.V.T.; MELO, D.J.A.; DUARTE, F.T.; CARVALHO, A.S. Avaliação de plantas medicinais no combate a mastite bovina. **Holos**, Ano 25, Vol. 4, 2009.

DE ARAÚJO, A.R., QUELEMES, P.V.; PERFEITO, M.L.G.; LIMA, L.I.; SÁ, M.C.; NUNES, P.H.M.; JOANETTI, G.A.; EATON, P.; SOARES, M.J.S.; LEITE, J.R.S.A. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v.14; 2015.

DIAZ, M. A. N.; ROSSI, C.C.; MENDONÇA, V.R.; SILVA, D.M.; RIBON, A.O.B.; AGUILAR, A.P.; MUÑOZ, G.D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 20(5): 724-728, 2010.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, 15, p.167-193, 2002.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais** nº 7, 2006.

DÜRR, J.W. Panorama da qualidade do leite na região Sul (RS). In: BRITO, I.R.F. et al. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Embrapa 168f. 2004.

FARIA, R.N. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha de *phanera flexuosa* (morici.) l. p. queiroz (caesalpinioideae) e da inibição de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Bahia. 2012.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M.V. Qualidade do Leite e Controle da Mastite. **São Paulo: Lemos Editorial, 175p. 2000.**

FONSECA, M.C.M. **Epamig pesquisa**. Produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS. Espaço para o produtor, Viçosa, 2012.

GOBBO-NETO L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 374-381, 2007.

GONZÁLEZ, F.H.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Gráfica da Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

GOMES, A.C.; AOKI, C. Efeito da sazonalidade hídrica sobre a fitossociologia de macrófitas aquáticas em uma lagoa no Pantanal, Brasil. **Revista Biologia Neotrop.** 12(1): 1-7; 2015.

HIGINO, S.S.S.; PEREIRA, A.V.; AZEVEDO, T.K.B.; SANTANA, G.M.; PAULA, A.F.R.; TREVISAN, F.A.; AZEVEDO, S.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de taninos isolados da jurema vermelha *Mimosa arenosa* (Willd Poir) sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **Agropecuária Técnica**, v. 36 (1): 115-120, 2015.

HOLANDA JÚNIOR, E.V.; MADALENA, F.E.; HOLANDA, E.D.; MIRANDA, W.M.; SOUZA, M.R. Impacto econômico da mastite em seis fazendas da região de Araxá – Minas Gerais, Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal.** v. 13, no 2, p. 63-69. 2005.

HU, J.F.; GARO, E.; GOERING, M.G.; PASMORE, M.; YOO, H.D.; ESSER, T.; SESTRICH, J.; CREMIN, P.A.; HOUGH, G.W.; PERRONE, P.; LEE, Y.S.L. Bacterial biofilm inhibitors from *Diospyros dendo*. **Journal of Natural Products.** Prod.69: 118–120. 2006.

IBGE – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** - Censo Agropecuário 2013. (2014).

KLEIN R.C.; FABRES-KLEIN, M.H.; OLIVEIRA, L.L.; FEIO, R.N. MALOUIN, F.; RIBON, A.O.B. A C-Type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts Staphylococcal biofilms. **PLoS ONE.** 2015.

KOEHN, F.E; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature reviews: Drug Discovery**. v. 4, p.206-220. 2005.

LACERDA, C.H.F.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M.; FERNANDES, C.E.B. Influence of aquatic plants on the predation of *Piaractus mesopotamicus* larvae by *Pantala flavescens*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. Maringá. 32 (2): 147-151. 2010.

LADEIRA, S.L. Mastite bovina: Doenças dos ruminantes e equinos. Pelotas, **Ed. Universitária / UFPEL**. p.248-261. 2001.

LANGONI, H.; PENACHIO, D.S.; CITADELLA, J.C.C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P.Y.; LUCHEIS, S.B.; MENOZZI, B.D.; SILVA, A.V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 31(12):1059-1065, 2011.

LANGONI, H.; GUIMARÃES, F.F.; WANDERLEY, G.G.; SALINA, A.; DE LAVOR, U.L. *Geotrichum candidum* e sua importância nas mastites. **Veterinária e Zootecnia**. v. 20, 2013.

LOLIS, S.F.; THOMAZ, S.M. Monitoramento da composição específica da comunidade de macrófitas aquáticas no reservatório Luís Eduardo Magalhães. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 29, n. 2, p. 247-258, 2011.

LOPES, L.O.; LACERDA, M.S.; RONDA, J.B. Eficiência de desinfetantes em manejo de ordenha em vacas leiteiras na prevenção de mastites. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. 2013.

L.Q.L. **Laboratório de Qualidade do Leite**. Centro de pesquisa em Alimentos. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Escola da Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal de Goiás. Bases de dados do LQL, 2011.

MACHADO, T.R.O.; CORREA, M.G. E. MARIN, J.M. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de Staphylococci coagulase-negativa isoladas de leite de bovinos com mastite no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.1, p. 278-282, 2008.

MACHADO, F.L.S.; KAISER, C.R.; COSTA,S.S.; GESTINARI, L.M.; SOARES, A.R. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurência*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 20(3): 441-452, 2010.

MARTIN, J.G.P. **Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados e laticínios produtores e queijo Minas frescal**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo – Piracicaba, 102p, 2015.

MARTINS, R.P.; SILVA, J.A.G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; FIHLO, E.S.A. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciências Animais Brasileiras**. v.11, n.1, 181-187, 2010.

MATA, F. Mastitis vaccination in dairy cattle: a meta-analysis of field case-control trials. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. p.17-22, 2013.

MENDONÇA, V.M.; SANTOS, J.; NASCIMENTO, I.R.; OLIVEIRA, M.A.S.; ROCHA, S.S.; CABRAL, E.S. **Perspectivas da Fitoterapia Veterinária: Plantas Potenciais na Terapia dos Animais de Produção**. Resumo Expandido- 1º Seminário de Agroecologia da América do Sul. Cadernos de Agroecologia – ISSN 2236-7934, v.9, n.4, 2014.

MICKEL, J.T.; SMITH, A.R. The pteridodophytes of Mexico. **Memoirs of the New York Botanical Garden** 88: 1-1054; 2004.

MITIDIERO, A.M.A. **Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. 132p. 2012.

MITTELMAN, A.; COSCIONI, A.C.; PILLON, C.N.; BITENCOURT, B. **Noções sobre Produção de Leite**. Pelotas. Embrapa Clima Temperado, 2006.

MONARDES, H. Reflexões sobre a qualidade do leite. In: Dürr, J.W. et al. (Ed.). **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: UPF, 331p. 2004.

MONNERET, C. Impactactuel dès produits naturels sur la dé couverte de nouveaux médicament santicancéreux. **Annales Pharmaceutiques Françaises**. v. 68, p. 218-232, 2010.

MONZON, M.C.; OTEIZA, J.; LEIVA, M.; AMORENA, B. Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. **Diagn.Microbiology Infect. Diseases** 44:319–324, 2002.

MOOZHYYIL, M.; PALLAUF, J. Chemical composition of the water fern, *Salvinia molesta*, and its potential as feed source for ruminants. **Economic botany** (40) 3. 375 – 383, 1986.

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

NADER, T.T.; COPPEDE, J.S.; AMARAL, L.A.; PEREIRA, A.M.S. Atividade antibiofilme de diterpeno isolado de *Croton antisiphiliticus* frente à *Staphylococcus aureus*. **ARS Veterinária**, Jaboticabal-SP, v.30, n.1, p. 32-37, 2014.

NOAL, R.M.C. **Ações de melhoramento contínua para incrementar a qualidade e produtividade na cadeia do Leite**. Dissertação (Mestrado) em Engenharia de Produção. Santa Maria, 2006.

NUNES, S.F.; CAVACO, L.M.; VILELA, C.L.; BEXIGA, R. Perfil de susceptibilidade a antibióticos de agentes etiológicos de mastite subclínica bovina em Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 102, p. 275-280, 2007.

NÚÑEZ S.E.R.; NEGRETE, J.L.M.; RIOS, J.E.A.; HADAD, H.R. Hg, Cu, Pb, Cd, and Zn accumulation in macrophytes growing in tropical wetlands. **Water, Air, and Soil Pollution**. 216:361-373. 2011.

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

OLIVEIRA, S.C.C.; GUALTIERI, S.C.J.; DOMINGUEZ, F.A.M.; MOLINILLO, J.M.G., MONTOYA, R.V. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* e sua aplicação na alelopatia. *Acta botânica Brasílica* 26 (3): 607-618. 2012.

OLIVEIRA, A.P.; MODENES, A.N.; BRAGIÃO, M.G.; BEZERRA, I.G.O.; SAUSEN, M.G.; BERGAMASCO, R. **Estudo da bio-sorção do cromo III utilizando a macrófita aquática *Salvinia auriculata***. XXXVII ENEMP. Universidade Federal de São Carlos, 2015.

OYARZABAL, M.E.B. **Aplicação do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) no tratamento da mastite bovina e presença de fungos no leite bovino *in natura***. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2011.

ÖZBAY, H.; ALIM, A. Antimicrobial activity of some water plants from the northeastern anatolian region of Turkey. **Molecules**. 14: 321-328. 2009.

PEIXOTO, P.H.P.; PIMENTA, D.S.; ANTUNES, F. Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *Salvinia auriculata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 40: 727-734, 2005.

PEIXOTO, M.M.R.; GRESSLER, L.T.; SUTILI, F.J.; COSTA, M.M.; VARGAS, A.C. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 35(2):105-109, 2015.

PELGRIFT, R.Y.; FRIEDMAN, A.J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 2013.

PEREIRA, A.V.; LOBO, K.M.S.; BEZERRA, D.A.C.; RODRIGUES, O.G.; ATHAYDE, A.C.R.; MOTA, R.A.; LIMA, E.Q.; MEDEIROS, E.S. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de Jurema Preta e Neem sobre amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em búfalas. **Arquivos Inst. Biologia**. 76, 341-346, 2009a.

PEREIRA, A.L.; BESSA, L.J.; LEÃO, P.N., VASCONCELOS, V.; COSTA, P.M. Bioactivity of *Azolla* aqueous and organic extracts against bacteria and fungi. **Symbiosis** 65: 17-21, 2015.

PERINI, S. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina.** (Dissertação de Mestrado) UFLA, 2013.

PRADO, J. Pteridophyta: Salviniaceae. **Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga**, São Paulo, SP. 33(1): 107-110, 2006.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 37, n. 3, p. 369–400, 2006.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M. STUMPF, W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região Sul do Rio Grande do Sul. **Revista brasileira em Agrociência**, v. 9, n. 3, p.287-290, 2003.

RIBEIRO JUNIOR, J.C.; BELOTI, V. Mastite bovina e seu reflexo na qualidade do leite.Revisão de literatura. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência (REEC)**- v.2, 2012.

RODRIGUES, A.C.O.; CARAVIELLO, D.Z.; RUEGG, P.L. Management of Wisconsin dairy herds enrolled in milk quality teams. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 7, p. 2660–2671, 2005.

ROSSI, C.C.; AGUILAR, A.P.; DIAZ, M.A.N.; RIBON, A.O.B. Aquatic plants as potential sources of antimicrobial compounds active against bovine mastitis pathogens. **African Journal of Biotechnology** Vol. 10(41), pp. 8023-8030, 2011.

RUEGG, P.L. Practical food safety interventions for dairy production. **Journal Dairy Science**. 86(Suppl.): E1-E9. 2003.

SABELOT, M. A.; POZZA, M.S.S.; SILVA, L.S.; ZAMBOM, M.A.; POZZA, P.C.; ECKSTEIN, I.I. Isolamento de bactérias causadoras de mastite subclínica e correlação entre qualidade físico-química do leite e contagem de células somáticas. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v.1, n.2, p. 99-106, 2014.

SABBAG, O.J.; COSTA, S.M.A.L. Análise de custos de produção de leite: aplicação do método de Monte Carlo. **Revista Extensão Rural**, DEAER – CCR – UFSM, Santa Maria, v.22, n.1, 2015.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite.** São Paulo: Manole; 314 p. 2006.

SANTOS, L.A.; MENEZES, J.S.; RUFINO, L.R.A., OLIVEIRA, N.M.S.; FIORINI, J.E. Determinação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da planta *Plectranthus ornatus* Codd (Boldo Chinês). **Revista de Medicina de Minas Gerais**, p.464-469, 2014.

- SCHUCH, L.F.D. **Plantas medicinais em atenção primária veterinária: atividade antimicrobiana frente às bactérias relacionadas com mastite bovina**. Tese (Doutorado). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 205p, 2008.
- SERPELONI, J.M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; COLUS, I.M.S. Avaliação *in vivo* da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste do micronúcleo. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 47-56, 2008.
- SILVA, V.A.; FREITAS, A.F.R.; PEREIRA, M.S.V.; PEREIRA, A.V. Avaliação da atividade antimicrobiana "*in vitro*" da *Lippia sidoides* sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.05, 52-56, 2009.
- SILVA, L.C.A.; PESSOA, D.A.N.; SILVA, L.S.A.; AQUINO, S.S.; MACEDO, M.M.S.; MATTOS, R.A.T.; JUNIOR, F.G. Avaliação *in vitro* da sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite caprina frente a desinfetantes comerciais. **Arquivos Inst. Biologia**. São Paulo, v.82, p. 1-4, 2015
- SIMÕES, M. Antimicrobial Strategies Effective Against Infectious Bacterial Biofilms. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, n.14: p. 2129-2145, 2010.
- SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**. London, v.43. p. 573-583, 2011.
- SIQUEIRA, A.K.; ALVES, T.S.; FERRAZ, M.M.G.; FRANCO, M.M.J.; MOTTA, R.G.; LISTONI, F.J.J.P.; DILVA, A.V.; RIBEIRO, M.G., LEITE, D.S. Resistência antimicrobiana em coliformes totais isolados de tanques de refrigeração de leite bovino. **Atas de saúde ambiental- ASA**. 2014.
- SMITH, B.P. **Large Animal Internal Medicine** (4th Ed., pp. 1112-1138) St. Louis, MO, Mosby Elsevier, 2009.
- SOARES, D.C.; OLIVEIRA, E.F.; SILVA, G.P.; DUARTE, L.P.; POTT, V.J.; VIEIRA FILHO, S.A. *Salvinia auriculata*: Aquatic bioindicator studied by instrumental neutron activation analysis (INAA). **Applied Radiation and Isotopes**. 66: 561-564. 2008.
- SOUZA, M.A.; OLIVEIRA, I.C.; SANTANA, E.S.; FELIX, L.P. Pteridófitas no Estado da Paraíba, Brasil: Salviniaceae. **Revista Nordestina de Biologia**, 15 (2), p. 11-16, 2001.
- SOUZA, M.R.M.; PEREIRA, R.G.F.; FONSECA, M.C.M. Comercialização de plantas medicinais no contexto da cadeia produtiva em Minas Gerais. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, p.242-245, 2012.
- STEWART, P.S.; FRANKLIN, M.J., Physiological heterogeneity in biofilms. **Natural Veterinary Microbiology**, 6, 199-210, 2008.

TEIXEIRA, P., RIBEIRO, C. SIMÕES, J. **Prevenção de Mamites em Explorações de Bovinos Leiteiros. Da teoria à prática.** Acesso: a 12 de Dezembro de 2015 em [www.veterinaria.com.pt/media/Mastites.pdf](http://www.veterinaria.com.pt/media/Mastites.pdf); 2008.

TEMPONE, A.G.; MELHEM, M.S.C.; PRADO, F.O.; MOTOIE, G.; HIRAMOTO, R.M.; ANTONIAZZI, R.M.; JARED, C. Amphibian secretions for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. **Letters in Drug Design e Discovery**, v.4, n.1, p. 67-73, 2007.

TINTINO S.R.; NETO, A.A.C.; MENEZES, I.R.A.; OLIVEIRA, C.D.M.; COUTINHO, H.D.M. Atividade antimicrobiana e efeito combinado sobre drogas antifúngicas e antibacterianas do fruto de *Morinda citrifolia* L. **Acta biology Colomb.** 20(3):193-200; 2015.

TOLEDO, J.J., PENHA, J. Performance of *Azolla caroliniana* Willd. and *Salvinia auriculata* Aubl. on fish farming effluent. **Brazilian Journal of Biology.** 71 (1): 37-45. 2011.

TOTÉ, K.; HOREMANS, T., BERGHE V.; MAES, L.; COS, P. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, p. 3135–3142, 2010.

TOZZETTI, D.S.; BATAIER, M.B.N.; ALMEIDA, L.R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** – no VI, n10; 2008.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

VICARIO, P.P.; GREGORIAN, I.A.; PASCOE, J.B.S. A rapid method for testing the efficacy of teat dip formulations as bactericidal agents for the control of bovine mastitis. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health.** V.1, P. 01-04, 2009.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, 655-660. 2004.

VIGUIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N.; WELBECK, K.K. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, Philadelphia, v. 27, n. 8, p.486-493, 2009.

WANDERLEY, A. L. **Atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., cultivado em sistema orgânico sob diferentes condições, frente a bactérias causadoras de mastite bovina.** Brasília-DF. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015.

WOLFF, G.; ASSIS, L.R.; PEREIRA, G.C.; CARVALHO, J.G.; CASTRO, E.M. Effects of zinc toxicity on leaves of *Salvinia auriculata* cultivated in nutrient solution. **Planta Daninha**. 26: 315-325, 2009.

ZAFALON, L.F.; FILHO, A.N.; CARVALHO, M.R.B.; LIMA, T.M.A. Influência da mastite subclínica bovina sobre as frações protéicas do leite. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 75, n. 2, p. 135-140, 2008.

ZILBER, I; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. **Microbiology Reviews** 32. 723–735, 2008.

## CAPÍTULO I

### ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DE FOLHAS E RAÍZES DE *Salvinia auriculata* Aubl. CONTRA ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* DE ORIGEM BOVINA.

#### 1 INTRODUÇÃO

A mastite é a enfermidade mais prevalente dos bovinos leiteiros. As perdas econômicas mundiais estão estimadas em bilhões de dólares por ano. Entre os componentes deste custo estão: tratamento do animal, descarte do leite alterado, redução na produção de animais, mortes, perda definitiva de produção e descarte precoce de animais, custo do trabalho do agricultor e do veterinário, além das consequências econômicas para a indústria do leite pelo ingresso do produto de qualidade alterada (SCHUCH, 2008).

Os cuidados com a presença de resíduos de produtos químicos no leite é uma grande preocupação na indústria leiteira com especial atenção para a presença de resíduos de antibióticos. Fagundes (2003) concluiu que o tratamento da vaca seca (período em que a vaca não produz leite), mesmo respeitado o período de carência propostos pelos fabricantes, 19% das amostras de leite colhidas no início da lactação seguinte apresentavam resíduos de antibióticos.

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, protótipos de novos antibióticos (MATHABE et al., 2006; MELÉNDEZ et al., 2006). O reino vegetal possui uma fonte de compostos químicos novos que podem ser importantes devido ao seu uso na medicina. Muitos desses compostos são do metabolismo secundário e incluem-se diversas substâncias farmacologicamente ativas, regularmente empregues como fármacos (FIGUEIREDO et al., 2007).

Lima e colaboradores em 2013 realizaram coletas de *S. auriculata* durante todo o ano, e a partir do estudo biomonitorado dos extratos brutos hexânicos de folhas e raízes observaram que os extratos de Dezembro a Março apresentaram maiores halos de inibição contra isolados de mastite bovina. Sendo assim, as coletas de *S. auriculata* foram realizadas apenas no período do verão.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Obtenção dos extratos orgânicos de folhas e raízes de *Salvinia auriculata* Aubl. e estudo da atividade antibacteriana dos extratos contra estirpes de *Staphylococcus aureus* de origem bovina.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Coletar a planta *S. auriculata* no período do verão (Dezembro, Janeiro, Fevereiro e Março) e separar as folhas das raízes;
- Preparar os extratos brutos de folhas e raízes com quatro tipos de solventes orgânicos (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e etanol 95%);
- Avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) dos trinta e dois extratos vegetais frente às cepas de *S. aureus*;
- Avaliar a toxicidade dos extratos brutos mais ativos (juntos) em células epiteliais mamárias bovinas;
- Avaliar a ação dos extratos mais ativos na formação do biofilme bacteriano pré - formado;
- Avaliar a eficácia dos extratos mais ativos através do ensaio de excisão do teto.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material vegetal**

A planta aquática *S. auriculata* foi coletada no período de Dezembro de 2012 a Março de 2013, nas lagoas localizadas no Recanto das Cigarras (20°45'27"S; 42°51'46"W), campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Geral, e transportada para o Laboratório de Química e Bioquímica de Produtos Naturais (BioNat) para processamento. As plantas foram lavadas exaustivamente em água corrente e solução de hipoclorito de sódio 1% para retirada de resíduos. Raízes e folhas foram separadas e o material foi seco a 40°C em estufa com circulação de ar por três dias. A planta se encontra identificada sob o número 32.122 no herbário da UFV

#### **3.2 Preparo dos extratos vegetais**

As raízes e folhas secas (em torno de 200 gramas) foram maceradas e remaceradas em aproximadamente um litro dos seguintes solventes: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e etanol 95%. Os extratos produzidos por cada solvente foram filtrados e submetidos ao banho ultrassônico por trinta minutos e logo após à evaporação em rota evaporador. Os extratos obtidos foram filtrados usando filtro millipore 0,22 µm, secos à temperatura ambiente (evaporação do solvente) e armazenado a 4 °C.

#### **3.3 Avaliação da atividade biológica**

##### **3.3.1 Micro-organismos e meios de cultivo**

Os isolados *Staphylococcus aureus* 3828, 4125 e 4182, gentilmente cedidos pela Embrapa/CNPGL - Juiz de Fora - MG, foram utilizados neste trabalho. As culturas bacterianas foram estriadas em placas contendo ágar infusão-cérebro-coração (BHI; Himedia®) e mantidas por 16 horas a 37°C. Para preparo dos estoques cada isolado foi inoculado em 5 mL de caldo BHI, e mantido em estufa a 37 °C por 16-18 horas. Esse volume foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 850 µL de BHI com adição posterior de 150 µL de glicerol estéril. Os microtubos foram

mantidos a - 80 °C. Para determinação da concentração inibitória mínima e da atividade antimicrobiana dos extratos foi utilizado meio de cultura Muller Hinton (MH; Himedia®).

### **3.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos orgânicos de *Salvinia auriculata***

Os testes de concentração inibitória mínima foram realizados pela metodologia padronizada de microdiluição em caldo, em microplacas de 96 cavidades, segundo a metodologia descrita por Benfatti e colaboradores (2010), com modificações. Primeiramente, foi realizada uma diluição seriada dos extratos de planta, onde a 100 µL de meio de cultura BHI foram adicionados 100 µL de extrato; desta solução, 100 µL foram retirados e homogeneizados com 100 µL de meio de cultura na cavidade seguinte, e assim sucessivamente, obtendo-se assim uma série de concentrações de extratos de planta (inicialmente a 5,00 mg/mL) diluída em razão 2 (2,50 mg/mL na segunda cavidade; 1,25 mg/mL na terceira cavidade, e assim sucessivamente). A esta gama de concentrações de extratos de plantas, foram adicionados 100 µL de suspensão bacteriana ajustada para concentração final de  $10^6$  UFC/mL. Como controle negativo, foi utilizado o solvente dimetilsulfóxido (DMSO; Vetec®), sem extrato de planta e como controle positivo foram adicionados 10 µL de Ciclopirox olamina (EMS S/A). Os testes foram realizados em triplicata.

A microplaca foi mantida em estufa de crescimento a 37°C por 24 h. Após incubação, foram adicionados 20µL do sal MTT (3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazolium brometo) (2,00 mg/mL). As microplacas foram incubadas por mais 30 minutos. A determinação da CIM foi qualitativa e visual, uma vez que os poços com bactérias viáveis permaneceram com a coloração azul e os poços com bactérias mortas permaneceram com a coloração do meio de cultura. Considera-se o valor do CIM a concentração do poço sem coloração seguido por um poço com crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em triplicata.

### **3.3.3 Efeito dos extratos orgânicos ativos sobre o biofilme pré-formado**

A avaliação dos extratos mais ativos sobre a formação dos biofilmes pré-formados foi determinada segundo a metodologia descrita por Klein e colabo-

radores (2015) com algumas modificações e utilizando as cepas *S. aureus* 3828, 4125 e 4182. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 100 µL de meio de cultura BHI suplementado com 0,25% de glicose (BHlg) e 100 µL de uma suspensão bacteriana ajustada para a escala de 0,5 McFarland. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas. Logo após, foi feita a leitura de absorvância a 600 nm em leitor de ELISA para confirmar a presença de crescimento bacteriano no meio de cultura. O sobrenadante foi retirado dos poços cuidadosamente e adicionados 200 µL de BHI juntamente com os estratos ativos misturados (1:1:1) nas seguintes concentrações: 4xCIM, 2xCIM, CIM, 1/2xCIM e 1/4xCIM. A placa foi incubada por 6 horas, o sobrenadante foi novamente retirado e os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de tampão PBS 1X em pH 7,4. Logo após, todos os poços foram corados com 200 µL de cristal violeta (CV) 0,1% por 30 minutos. O excesso de CV foi removido lavando-se os poços por três vezes com 200 µL de água destilada. Finalmente, 150 µL de etanol 95% foram adicionados nos poços e após 45 minutos, foram feitas as leituras de absorvância no comprimento de onda de 560 nm com agitação por 10 segundos. O controle negativo consistiu de BHI e bactéria/ BHI e extrato. Os testes foram realizados em triplicata.

### **3.4 Ensaio de citotoxicidade dos extratos orgânicos ativos**

#### **3.4.1 Cultivo celular**

Neste trabalho foram utilizadas células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T), cultivadas a 37°C em atmosfera umedecida e 5% de CO<sub>2</sub>. Para o crescimento e manutenção das células foi utilizado o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo penicilina (1,60 mg/mL), estreptomicina (0,40 mg/mL) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF).

Os extratos foram diluídos em PBS (tampão fosfato salino) e DMSO, resultando em uma concentração estoque de 1,0 mg/mL. A solução estoque foi esterilizada por passagem em filtro para seringa com membrana poliéstersulfônica (PES) e tamanho de poro de 0,22 µm. Foram preparadas 5 concentrações para avaliação da toxicidade celular (18,75, 37,5, 75, 150 e 300 µg/mL) e foram realizadas 6 repetições por concentração. O DMSO utilizado na diluição do extrato apresentou concentração máxima de 0,45% e foi igualmente

avaliado pelo ensaio de citotoxicidade para assegurar seu uso enquanto solvente.

### 3.4.2 Avaliação da citotoxicidade

A atividade citotóxica dos extratos selecionados foi avaliada microscopicamente por alteração da morfologia celular e confirmada e mensurada através do método colorimétrico MTT (tetrazolium3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo).

Neste ensaio, células MAC-T ( $3,5 \times 10^4$  células/poço) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e incubadas a 37°C durante 12 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para adesão das células, restabelecimento do crescimento e início de formação das camadas celulares. Após esse intervalo, foram tratadas com soluções de diferentes concentrações do extrato e incubadas novamente em estufa por 72 horas. As microplacas foram monitoradas por microscopia óptica diariamente. Após as 72 horas, o meio foi removido, as células foram lavadas duas vezes com tampão salino fosfato (PBS) pH 7,2 e em cada poço foi adicionado 50 µL de solução de MTT (1,00 mg/mL). As placas foram incubadas a 37° C e atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> por 4 h. Posteriormente, a solução de MTT for removida e o sal formado foi solubilizado pela adição de DMSO (100 µL/poço) e agitação por 15 minutos a 76 rpm e 37°C em agitador com temperatura controlada. As microplacas foram incubadas por 1 hora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, com posterior leitura da absorbância por meio da leitora de microplaca a 492 nm.

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

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{média densidade óptica (células tratadas)}}{\text{média densidade óptica (controles)}} \times 100$$

As concentrações citotóxicas para 50% (CC<sub>50</sub>) e 10% (CC<sub>10</sub>) são as concentrações relacionadas com a redução de 50% e 10% da densidade óptica em comparação ao controle, respectivamente. As CC<sub>50</sub> e CC<sub>10</sub> foram calculadas por análise de regressão linear da curva dose resposta. A determinação da CC<sub>10</sub> para o DMSO visa estabelecer uma concentração limite com mínimo de 90% de viabilidade celular para assegurar o uso desse solvente sem interferência na toxicidade do extrato avaliado.

### 3.5 Determinação da eficácia dos extratos orgânicos de *S. auriculata* através do modelo de excisão do teto (*ex-vivo*)

O teste foi realizado seguindo a metodologia proposta por Boddie e colaboradores (2002) com algumas modificações. Foram utilizadas amostras de quatro quartos mamários que foram recolhidos de vacas abatidas. O excesso de pele e tecido foi removido, tetos foram lavados com detergente e água quente, enxaguados com água, secos e depois mergulhados em álcool etílico 70%. Os que apresentaram rachaduras foram descartados. Os tetos foram colocados em sacos plásticos com uma solução de água e glicerina a 20% e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização. As cepas utilizadas foram as Gram-positivas *S. aureus* 3828, 4125 3 4182 (isoladas de vacas com mastite).

Tetos congelados foram descongelados em água morna, embebidos em álcool etílico a 70%, secos com uma toalha de papel e suspensos por grampos metálicos de uma grade. Primeiramente, todos os tetos de cada quarto foram contaminados com 5 mL de uma suspensão bacteriana  $10^6$  UFC/ mL. Após cinco minutos, os grupos de tetos foram imersos nas suas respectivas soluções = grupo 1: controle (glicerina) ; grupo 2: extrato teste; grupo 3: desinfetante pré-dipping de eficácia conhecida (Agrisept® MC TABS, Intervet) ; grupo 4: desinfetante pós-dipping de eficácia conhecida (Lat Plus Qualimilk, Start Química). Passados dez minutos, cada teto foi lavado com 5 mL de solução salina fisiológica, sendo que 0,10 mL foi retirado para o plaqueamento em meio de cultura BHI sólido para contagem de patógenos. As soluções de lavagem de tetos com os produtos testados foram diluídos para  $10^4$  UFC/ mL antes do plaqueamento para obter placas com colônias contáveis. Já a solução de lavagem do teto como controle negativo foi diluído para  $10^1$  UFC/ mL para facilitar a contagem de unidades formadoras de colônias encontradas.

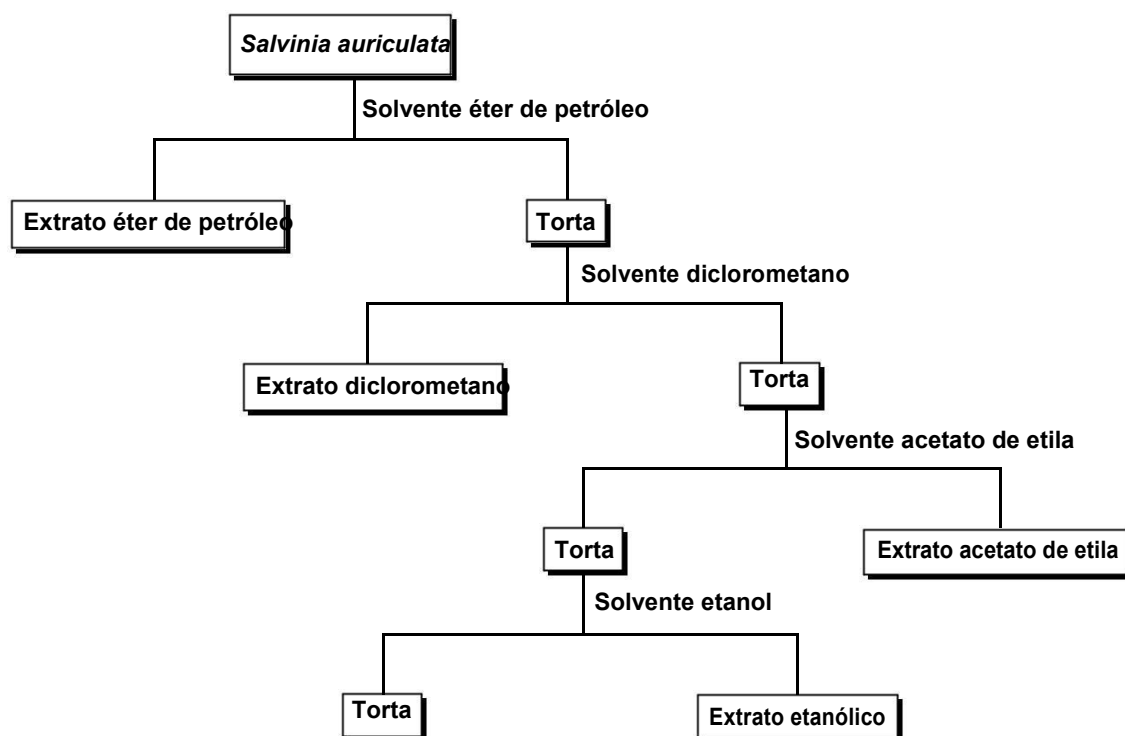
As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, e as colônias foram contadas. A média geométrica de colônias contadas foi determinada, depois multiplicada por (5 x nº de tetos) para expressar o volume total de lavagem e depois multiplicado pelo fator de diluição para se obter o total de unidades formadoras de colônias recuperadas a partir da lavagem de cada teto. O total de colônias contadas para cada produto testado foi convertido na forma de logarítmo (log), e este valor de log foi subtraído do valor de log do controle negativo, para se obter o log de redução (LR) para esse produto. Em casos onde os

micro-organismos não foram recuperados a partir de um teto, o valor de 0,01 foi substituído por zero na determinação das contagens das médias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção dos extratos

As extrações orgânicas das folhas e raízes de *S. auriculata* coletadas entre Dezembro de 2012 e Março de 2013 foram realizadas por quatro tipos de solventes (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e etanol) através da maceração exaustiva juntamente com o banho ultrassônico (Figura1) e apresentaram rendimentos (em peso seco) de acordo com a tabela 1.



**Figura 1** Fluxograma de extração orgânica de folhas e raízes de *Salvinia auriculata*

**Tabela 1** Rendimento em porcentagem (%) dos extratos de folhas e raízes secas de *Salvinia auriculata* em diferentes solventes

*Extrato/Mês	Extrato moído e seco (g)	Solvente extrator			
		Éter de Petróleo	Diclorometano	Acetato de Etila	Etanol
F-Dez.	220,0	0,43	0,90	0,51	6,21
R-Dez.	195,0	0,33	0,61	0,60	0,73
F-Jan.	176,0	0,31	0,79	0,63	1,63
R-Jan.	210,0	0,18	0,47	0,48	0,21
F-Fev.	226,0	0,33	0,84	0,50	4,82
R-Fev.	273,0	0,17	0,37	0,36	0,79
F-Mar.	206,0	0,25	0,85	0,46	2,43
R-Mar.	335,0	0,07	0,35	0,31	0,04

\***F-Dez.:** Folhas – Dezembro; **R-Dez.:** Raízes – Dezembro; **F-Jan.:** Folhas – Janeiro; **R-Jan.:** Raízes – Janeiro; **F-Fev.:** Folhas – Fevereiro; **R-Fev.:** Raízes – Fevereiro; **F-Mar.:** Folhas – Março; **R-Mar.:** Raízes – Março.

As técnicas de extração por ultrassom e maceração seguida pela filtração permitiu a separação dos componentes estruturais da planta e a extração dos compostos orgânicos presentes nas folhas e raízes de *S. auriculata*. Os compostos orgânicos de interesse no presente estudo são os metabólitos secundários, que conferem diversas funções no vegetal, tais como: odor, coloração, sabor, defesa de insetos, entre outros.

Com relação à tabela 1, os maiores rendimentos foram os extratos produzidos com etanol, destacando-se o rendimento de folhas coletadas em Dezembro com 6,21%. Já os menores rendimentos foram para os extratos produzidos por éter de petróleo, sendo o rendimento de raízes coletadas em Março a menor, com 0,07%. Para todos os solventes usados, os rendimentos de extração de folhas foram maiores que os de raízes, apesar de que a massa seca de raízes coletadas foi maior do que a massa seca de folhas.

O extrato de etanol por apresentar alta polaridade permite a extração dos glicosídeos presentes nas folhas e raízes, enquanto os solventes extratores de menor polaridade realizam a extração das geninas, resultando em um maior rendimento para o extrato etanólico quando comparado aos demais. Em um trabalho publicado por Oliveira e colaboradores (2012), foi relatado uma extração com solventes em polaridade crescente de folhas de *Solanum lycocarpum* e foi observado que os extratos aquoso e metanólico foram os que tiveram maior rendimento se comparado com as outras extrações. Isso porque grande parte dos açúcares e produtos glicosilados presentes no pó da folha são extraídos por esses dois solventes.

#### 4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos orgânicos de *S. auriculata*

Os testes de concentração inibitória mínima foram realizados com todos os trinta e dois extratos produzidos. Os dados, para cada solvente extrator, estão representados nas tabelas 2, 3, 4 e 5. No controle positivo, não foi observado o crescimento bacteriano.

**Tabela 2** Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos brutos de folhas e raízes de *Salvinia auriculata* preparados com éter de petróleo contra estirpes de *Staphylococcus aureus* (mg/mL)

Extrato/Mês	<i>Staphylococcus aureus</i>			Média
F – Dez.	1,25	1,25	1,25	1,25
R – Dez.	0,63	1,25	2,50	1,46
F – Jan.	1,25	0,31	0,31	0,62
R – Jan.	2,50	0,08	0,63	0,89
F – Fev.	2,50	0,08	0,63	1,07
R – Fev.	1,25	1,25	0,08	0,86
F – Mar.	0,08	0,04	0,04	0,05
R – Mar.	0,08	0,04	0,08	0,06

**Tabela 3** Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos brutos de folhas e raízes de *Salvinia auriculata* preparados com diclorometano contra estirpes de *Staphylococcus aureus* (mg/mL)

Extrato/Mês	<i>Staphylococcus aureus</i>			Média
F – Dez.	2,50	2,50	2,50	2,50
R – Dez.	2,50	1,25	2,50	2,25
F – Jan.	2,50	2,50	2,50	2,50
R – Jan.	1,25	1,25	1,25	1,25
F – Fev.	2,50	2,50	2,50	2,50
R – Fev.	1,25	2,50	1,25	1,67
F – Mar.	2,50	2,50	2,50	2,50
R – Mar.	1,25	1,25	1,25	1,25

**Tabela 4** Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos brutos de folhas e raízes de *Salvinia auriculata* preparados com acetato de etila contra estirpes de *Staphylococcus aureus* (mg/mL)

Extrato/Mês	<i>Staphylococcus aureus</i>			Média
F – Dez.	2,50	2,50	2,50	2,50
R – Dez.	2,50	1,25	2,50	2,08
F – Jan.	2,50	2,50	2,50	2,50
R – Jan.	1,25	1,25	1,25	1,25
F – Fev.	2,50	2,50	2,50	2,50
R – Fev.	1,25	2,50	1,25	1,67
F – Mar.	2,50	2,50	2,50	2,50
R – Mar.	1,25	1,25	1,25	1,25

**Tabela 5** Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos brutos de folhas e raízes de *Salvinia auriculata* preparados com etanol contra estirpes de *Staphylococcus aureus* (mg/mL)

Extrato/Mês	<i>Staphylococcus aureus</i>			Média
F – Dez.	2,50	5,00	2,50	3,33
R – Dez.	2,50	2,50	2,50	2,50
F – Jan.	0,63	1,25	0,31	0,73
R – Jan.	1,25	1,25	0,63	1,04
F – Fev.	2,50	1,25	5,00	2,92
R – Fev.	1,25	1,25	2,50	1,67
F – Mar.	0,31	1,25	1,25	0,94
R – Mar.	0,04	0,16	0,16	0,12

Com relação os dados apresentados na tabela 2, os extratos que apresentaram fraca atividade inibitória foram os de folhas e raízes de Dezembro, os que apresentaram moderada atividade foram os de folhas e raízes de Janeiro e Fevereiro e os que apresentaram forte atividade foram os extratos de folhas e raízes de Março. Nas tabelas 3 e 4, todos os extratos apresentaram fraca inibição contra os isolados de mastite bovina. Na tabela 5, os extratos que apresentaram fraca inibição foram os de folhas e raízes de Dezembro e Fevereiro, os que apresentaram moderada atividade foram os de folhas e raízes de Janeiro e os extratos de folhas de Março. O extrato de raízes de Março apresentou forte atividade antibacteriana. A atividade antibacteriana do extrato contra estirpes *S. aureus* foi classificada de acordo com Aligiannis e colaboradores (2001) que consideram como de forte atividade antimicrobiana extratos que apresentaram CIM até 0,50 mg/mL; de atividade moderada, os que apresentaram CIM entre 0,6 e 1,50 mg/mL; e de fraca atividade os que apresentaram CIM acima de 1,60 mg/mL.

Rossi e colaboradores (2011) mostraram que, dentre os extratos produzidos de folhas e raízes de *S. auriculata* coletadas entre Abril e Junho, apenas o extrato hexânico de raízes apresentou concentração inibitória mínima forte de 0,30 mg/mL. Inoue e colaboradores (2015) avaliaram antraquinonas isoladas de extratos brutos de raízes de *Senna macranthera* e que se

mostraram ativas contra cepas de *S. aureus* isoladas de animais com manifestação de mastite bovina.

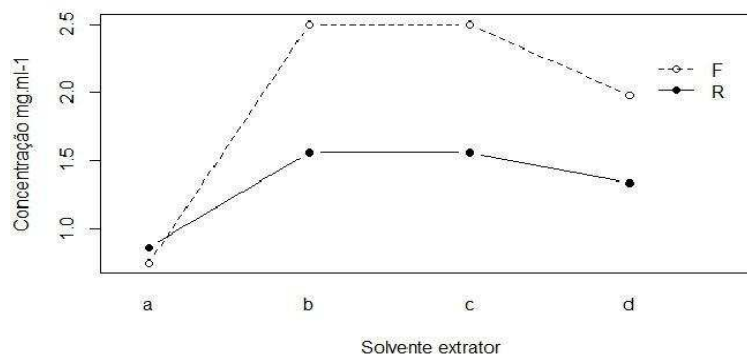
As plantas apresentam uma enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas, o que justifica o crescente interesse de indústrias farmacêuticas na síntese de fármacos a partir destas fontes naturais. Extratos, frações e compostos isolados extraídos destas fontes têm sido estudados por pesquisadores por mostrarem significativas propriedades, entre essas, a antimicrobiana (ROZATTO, 2012).

Muitos trabalhos já avaliaram o uso de plantas no combate às bactérias causadoras da mastite bovina, como a *S. aureus* e elas podem ser uma alternativa aos antibióticos, porque as plantas apresentam metabólitos secundários que são ativos contra uma vasta gama de micro-organismos. Segundo Nader e colaboradores (2010), o extrato clorofórmico de *Croton antispyhiliticus*, na concentração de 5,00 mg/mL, apresentou destacada atividade bactericida *in vitro* frente *S. aureus* isolados de leite de animais com mastite, com resultados superiores aos obtidos com o antibiótico sulfato de gentamicina (30,0 mg/mL), utilizado no estudo. Nikolic' e colaboradores (2014) mostraram que o extrato etanólico de *Zingiber officinalis* demonstrou forte atividade antibacteriana contra *S. aureus* ATCC 25923 com CIM em 0,0024 mg/mL.

Coelho e colaboradores (2012) avaliaram o uso do óleo de semente de girassol (*Helianthus annus*) no tratamento de lesões cutâneas no metatarso de um equino. Foi observada a melhora clínica e macroscópica da lesão. Análises preliminares químicas e físicas demonstraram que o ácido esteárico como principal componente do óleo usado. Os resultados sugeriram que o óleo de semente de girassol é capaz de acelerar e melhorar a qualidade de cicatrização em feridas de equinos, podendo ser também um provável antimicrobiano.

Pesquisas já indicaram que ácidos graxos insaturados de cadeia longa como o ácido oleico e os ácidos graxos saturados de cadeia média como o ácido láurico, são responsáveis pela atividade antimicrobiana do leite humano e bovino, inativando tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (ISAACS et al., 1990; ISAACS et al., 1995). A presença de ácidos graxos saturados nos extratos de *S. auriculata* sugere que esses podem estar contribuindo para a atividade antimicrobiana observada contra as cepas de *S. aureus*.

De acordo com a análise de variância realizada nos dados fornecidos pelas tabelas anteriores, as interações planta-solvente e mês-solvente foram avaliadas (figuras 2 e 3). A interação planta – mês não obteve significância de acordo com a análise de variância (ANOVA).

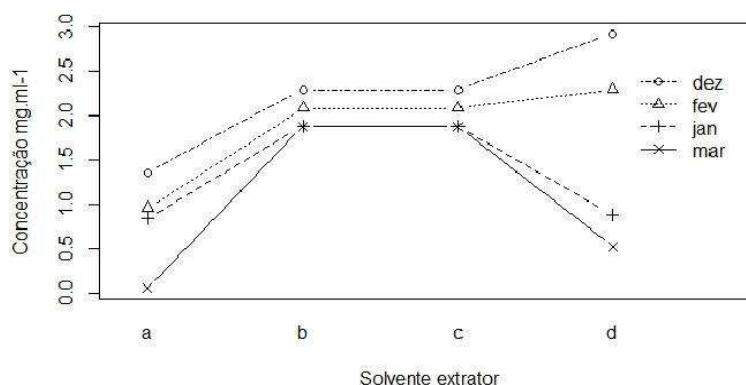


F- folhas; R- raízes

a- Éter de petróleo, b- diclorometano, c-acetato de etila, d-etanol 95%

**Figura 2** Interação planta – solvente nas concentrações inibitórias mínimas bacterianas obtidas contra *Staphylococcus aureus*

A interação biológica entre as partes da planta *S. auriculata* testadas (folhas e raízes) foi observada apenas nos extratos obtidos pelo solvente extrator éter de petróleo, ou seja, as CIM adquiridas foram muito próximas, independente do mês de extração. Nos demais solventes, já não houve a interação, mostrando que as concentrações inibitórias obtidas de extratos de folhas são maiores que as de raízes, ou seja, as raízes da planta tem um poder maior de inibição antibacteriana do que as folhas. Este resultado corrobora com os resultados obtidos por Rossi e colaboradores (2011) que avaliaram a ação antibacteriana de extratos de folhas e raízes de *S. auriculata* utilizando como solventes extratores o hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol. Foi demonstrado que apenas o extrato hexânico de raízes apresentou atividade bacteriana para todas as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalatae* testadas.



**Figura 3** Interação mês – solvente nas concentrações inibitórias mínimas bacterianas obtidas contra *Staphylococcus aureus*.

De acordo com a figura 3, observou-se que a interação mês-solvente ocorreu entre os meses de Janeiro e Março com os solventes diclorometano e acetato de etila. A concentração inibitória mínima dos extratos obtidos com esses dois solventes e nos meses citados foram iguais a 2,50 mg/mL para folhas e 1,25 mg/mL para raízes. Já nos demais solventes e meses, a interação não foi observada. Os extratos obtidos pela coleta de Março e produzidos pelos solventes éter de petróleo e etanol obtiveram as menores CIM, sendo considerados os extratos com forte atividade antibacteriana frente à *S. aureus*. Os extratos mais ativos (folhas e raízes - éter de petróleo e raízes-etanol) foram agrupados nas mesmas proporções (1:1:1) devido a pouca quantidade de extrato produzida e foi avaliada a CIM dessa mistura (tabela 6).

**Tabela 6** Concentração Inibitória Mínima (CIM) da mistura dos extratos orgânicos de *Salvinia auriculata* com forte atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (mg/mL)

Extrato	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Mistura de extratos ativos (1:1:1)	5,00	5,00

A CIM da mistura de extratos ativos foi maior do que a CIM dos extratos ativos separados. A interação sinérgica pode ser encontrada, para testes biológicos, quando o efeito de combinação de diferentes agentes difere do efeito encontrado para os mesmos agentes, em separado (BERENBAUM, 1989). Apesar de existir estudos mostrando que o potencial antimicrobiano *in vitro* de extratos brutos de plantas, muitas vezes, não está relacionado a um único princípio ativo, no caso dos extratos *S. auriculata* aconteceu ao contrário. Um dos prováveis motivos pode ser o antagonismo existente entre compostos orgânicos, ou a baixa concentração de extratos ativos. Mesmo assim, os extratos misturados não perderam a capacidade de inibir o crescimento bacteriano, apresentando CIM de 5,00 mg/mL.

#### **4.3 Avaliação de toxicidade dos extratos orgânicos ativos de *S. auriculata* em células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T).**

Os extratos mais ativos de acordo com a concentração inibitória mínima foram os extratos de éter de petróleo das raízes e folhas coletadas em Março e extrato etanólico de raízes coletadas em Março. Estes três, em proporções iguais, foram misturados devido à pequena quantidade desses extratos e sua toxicidade foi avaliada em células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T) como mostra a tabela 7.

**Tabela 7** Avaliação da mistura dos extratos brutos ativos de *Salvinia auriculata* na viabilidade celular de células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T)

Amostra	CC <sub>10</sub> <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>b</sup>
Extrato	87,12 µg/mL	562,6 µg/mL

<sup>a</sup> Concentração do composto relacionada com redução de 10% da viabilidade celular.

<sup>b</sup> Concentração do composto relacionada com redução de 50% da viabilidade celular.

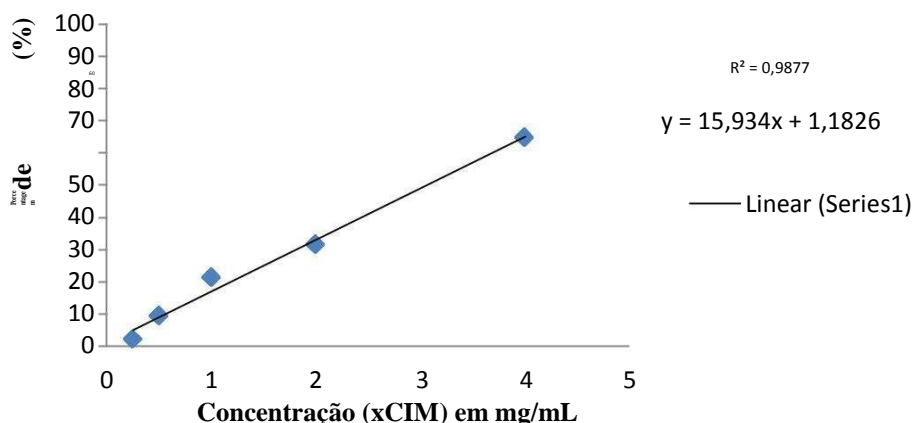
O potencial citotóxico da mistura dos extratos ativos (1:1:1) foi investigado pelo método de redução do sal tetrazólio MTT. A presença do extrato, nas diferentes concentrações estudadas (18,75 - 300,00 µg/mL), reduziu a viabilidade das células epiteliais mamárias em cultura no intervalo investigado de 72 horas.

De acordo com Dolabela (2007), a citotoxicidade para células VERO (células normais), pelo método colorimétrico do MTT, estabeleceu-se que extratos/frações/substâncias com  $CC_{50} < 100$  µg/mL foram considerados muito tóxicos;  $100 > CC_{50} > 500$  µg/mL, moderadamente tóxicos e  $CC_{50} > 500$  µg/mL, baixa toxicidade. Sendo assim, o resultado obtido da mistura de extrato ativo foi considerado de baixa toxicidade ( $CC_{50} = 562,6$  µg/mL). Os resultados demonstraram que o extrato não apresentou toxicidade contra as células MAC-T nas concentrações testadas, quando comparado com o controle. Nenhum estudo foi encontrado na literatura sobre a avaliação da citotoxicidade de *S. auriculata*.

Atualmente, o interesse no desenvolvimento de pesquisas sobre plantas medicinais vem crescendo e é importante conhecer o potencial citotóxico e a real eficácia das plantas que são popularmente utilizadas para o tratamento das mais variadas doenças. Quando não se conhece os efeitos tóxicos, a inclusão de protocolos de citotoxicidade e toxicidade se faz necessário, pois são úteis na determinação do potencial tóxico (SHAHID, 2012).

#### **4.4 Avaliação da ação dos extratos orgânicos ativos de *S. auriculata* na formação do biofilme pré – formado**

A mistura dos três extratos mais ativos (folhas e raízes – éter de petróleo e raízes – etanol) foi avaliada quanto a sua capacidade de inibir a formação do biofilme pré-formado produzido por cepas de *S. aureus* como mostrado na figura 4.



**Figura 4** Avaliação da capacidade de inibição na formação do biofilme pré – formado por estirpes de *Staphylococcus aureus* de origem bovina de extratos orgânicos ativos de *Salvinia auriculata*

A mistura dos extratos se mostrou uma potente bloqueadora do crescimento bacteriano inibindo em quase 70% a formação do biofilme pré-formado. À medida que a concentração do extrato diminuiu, a porcentagem de inibição do biofilme formado pelas *S. aureus* 3828, 4125 e 4182 também diminuiu.

Os estudos de produtos naturais têm adquirido relevância significativa quando são pautados os benefícios trazidos à população e a facilidade de acesso a várias espécies de plantas medicinais com atividade terapêutica. Os produtos naturais entram nesse processo como um componente da biodiversidade de importância econômica e para a saúde (RAHMAN et al., 2004). A avaliação da atividade antibacteriana de diferentes extratos de plantas frente a micro-organismos formadores do biofilme vem sendo amplamente estudada, devido, principalmente, ao fato de essas bactérias serem de grande importância nos processos iniciais e de desenvolvimento de doenças infecciosas como o caso da mastite bovina.

Gomashe e colaboradores (2014) mostraram que o extrato de *Psidium guajava* apresentou forte atividade contra *Streptococcus mutans* isolado da placa bacteriana dentária, impedindo também a formação do biofilme. Sasirekha e colaboradores (2015) avaliaram o efeito dos extratos aquosos de folhas de *Aloe vera*, *Curcuma longa*, *Plecthranthus amboinicus* e *Syzyguim aromaticum* na formação do biofilme pré-formado e observaram porcentagem

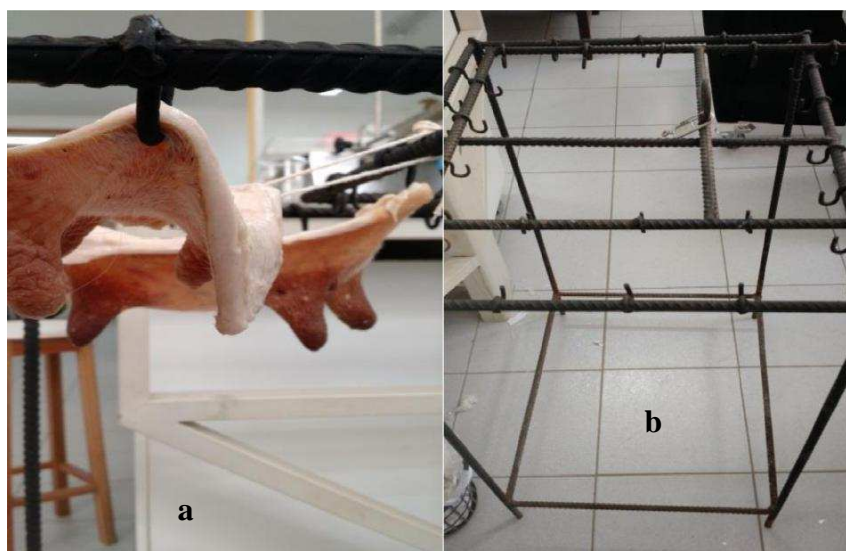
de inibição de biofilme pré-formado para todos os extratos, com destaque para *C. longa* com quase 80% de inibição. Rejiníemon e colaboradores (2014) mostraram que uma quinona isolada de folhas de *Aegle marmelos* apresentou porcentagem de inibição de biofilme em torno de 60% e 50% para *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

A formação de biofilmes deve ser prevenida, pois uma vez formados, são de difícil remoção. Assim, busca-se a aplicação de tratamentos com antimicrobianos associados à sanitização que reduzam ou impeçam a adesão e, ou promovam a desestabilização da matriz extracelular, permitindo assim que os protocolos atuais de limpeza sejam melhorados, aumentando a eficácia dos sanitizantes que são incapazes de penetrar na matriz extracelular de biofilmes. A pesquisa de antimicrobianos que impeçam ou reduzam a formação de biofilmes bacterianos é de importância estratégica para controle e prevenção de doenças como a mastite bovina (ANDRE, 2015).

Portanto, os resultados apresentados no presente estudo permitem uma maior elucidação e otimização de protocolos microbiológicos deste potencial antimicrobiano visando seu emprego na terapêutica veterinária para o controle da mastite bovina causada por *S. aureus*, contribuindo para o desenvolvimento de produtos fitossanitários mais eficazes para o tratamento e prevenção de micro-organismos resistentes, além de proporcionar atoxicidade de efeitos residuais de suma importância para a saúde do animal e do ser humano.

#### **4.5 Modelo de excisão do teto (ex-vivo)**

O modelo de excisão do teto (Figura 5) foi utilizado para avaliar a eficácia dos extratos ativos de *S. auriculata*. O teste *in vivo* não foi viável devido a pouca quantidade de extrato bruto obtido. Então, optou-se pelo modelo *ex-vivo*. Os dados estão apresentados na tabela 8.



**Figura 5** Quartos mamários excisados e pendurados (a) nos grampos da grade (b).

**Tabela 8** Eficácia germicida dos extratos orgânicos ativos de *Salvinia auriculata* contra estirpes de *Staphylococcus aureus* de origem bovina

Produto	<i>Staphylococcus aureus</i> (LR)*		
	3828	4125	4182
Pré-dipping (Agrisept® MC TABS, Intervet)	4,17	4,15	4,19
Pós-dipping (Lat Plus Qualimilk, Start Química)	4,12	4,23	4,12
Mistura de extratos ativos **	3,95	3,97	3,89

\*(LR) = Logaritmo da redução \*\* Logaritmo controle = 8,30

Um germicida de eficácia conhecida deve atingir 3, e de preferência 4 e 5 LR de micro-organismo do modelo de excisão do teto (PHILPOT et al, 1978). Todos os produtos testados foram eficazes contra as cepas de *S. aureus*. Os germicidas comerciais (pré e pós-ordenha) apresentaram LR acima de 4,00, enquanto que a mistura de extratos de *S. auriculata* apresentou LR próximo de 4,00, demonstrando ser um eficaz antimicrobiano como os germicidas comerciais utilizados. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Lima e colaboradores (2013) que incorporam extrato bruto ativo obtido de *S. auriculata* em uma formulação de sabonete com o intuito de utilizá-lo na

assepsia tanto do local como dos ordenhadores. Os testes *in vitro* com a formulação desenvolvida avaliaram que o sabonete herbal apresentou grande eficácia contra cepas de *S. aureus* testadas, reforçando o potencial antimicrobiano da planta aquática, podendo ser, futuramente, usada como um germicida comercial. Inoue e colaboradores (2015) testaram *in vitro* e *in vivo* sabonetes contendo em sua formulação extratos brutos ativos de *Senna macranthera* contra bactérias isoladas de vacas com manifestação da mastite e verificaram o potencial germicida da formulação contendo a planta.

Philpot e colaboradores (1978) avaliaram germicidas comerciais frente a *S. aureus*, *S. agalatae*, *E. coli* e *P. aeruginosa* através do modelo de excisão dos tetos. Os produtos contendo cloro e iodo em suas formulações foram os que apresentaram os melhores resultados. Boddie e colaboradores (2002) avaliaram seis germicidas de diferentes classes contra micoplasma bovino utilizando a mesma metodologia e todas formulações testadas foram eficazes contra as bactérias testadas. O melhor germicida apresentou LR de 6,29.

Schuch (2008) avaliou a atividade antisséptica e desinfetante de extratos vegetais e decoctos das espécies *Baccharis trimera*, *Bidens pilosa*, *Eucalyptus sp.*, *Polygonum hidropiper* e *Tagetes minuta* frente *Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus spp.*, e *Pseudomonas aeruginosas*, causadores de mastite bovina e concluiu que os extratos vegetais apresentaram atividade antibacteriana, com destaque para a espécie *Eucalyptus sp.*, que inativou todos os micro-organismos avaliados.

Yokoya (2010) avaliou o efeito desinfetante do muco de *A. fulica* em tetos de vacas na pré e pós-ordenha comparando-o com o iodo, desinfetante comumente utilizado. Em seus resultados verificou que o muco foi tão eficiente quanto o iodo no controle da microbiota dos tetos. Além disto, verificou-se que o muco proporcionou ao tecido dos tetos aspecto macio e hidratado evitando-se, portanto, a presença de fissuras que quase sempre ocorrem quando se faz uso do iodo e que podem representar porta de entrada aos patógenos causadores da mastite.

Mitidiero (2012) em seu trabalho avaliou os aspectos sanitários e de produção de uma bovinocultura leiteira na qual os animais eram tratados apenas com homeopatia, bioterápicos e fitoterapia e concluiu que em relação à mastite, é viável realizar o controle sanitário em um rebanho leiteiro de alta

produção pelo uso destas terapêuticas em substituição aos medicamentos alopáticos, com redução nos custos de produção, sem comprometer o desempenho produtivo e sem os riscos da contaminação do leite por resíduos.

O efeito antibacteriano de extratos de folhas da planta *Schinus terebinthifolius* Raddi foi demonstrado por Faccin e colaboradores (2016) através do estudo do extrato hidroalcoólico da aroeira na antissepsia de tetos pré e pós-ordenha durante doze semanas consecutivas. Nenhum dos índices analisados – caneca de fundo escuro, CMT, novas infecções intramamárias, “saúde da pele e do esfíncter do teto” demonstraram diferenças estatísticas entre os tratamentos usados, sugerindo que o extrato da planta pode ser usado na pré e pós-ordenha para desinfecção de tetos, como substituto dos produtos convencionais, para rebanhos em sistema de produção orgânica.

## 5 CONCLUSÕES

- Todos os extratos brutos de *S. auriculata* avaliados apresentaram concentração inibitória mínima entre 5,00 e 0,04 mg/mL. Os extratos orgânicos com potente atividade antibacteriana foram folhas e raízes (Março) obtidos por éter de petróleo e raízes (Março) obtido por etanol; os de atividade moderada foram folhas e raízes (Dezembro, Janeiro e Fevereiro) obtidos por éter de petróleo, raízes (Janeiro, Fevereiro e Março) obtidos por diclorometano e acetato de etila; folhas (Janeiro e Março) e raízes (Janeiro e Fevereiro) obtidos por etanol; os extratos de baixa atividade foram folhas (de todos os meses) e raízes (Dezembro) obtidos por diclorometano, folhas (todos os meses) e raízes (Dezembro e Janeiro) obtidos por acetato de etila;
- A mistura de extratos orgânicos ativos apresentou baixa toxicidade em células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T);
- A mistura de extratos orgânicos ativos foi capaz de interromper o crescimento bacteriano na formação do biofilme pré- formado;
- A mistura de extratos orgânicos ativos apresentou grande eficácia como um germicida se comparados aos germicidas comerciais utilizados nas etapas de pré e pós-*dipping*;
- O extrato bruto de *S. auriculata* pode ser usado futuramente na bovinocultura como um potente sanitizante, em substituição aos germicidas comerciais.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALIGIANNIS N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.40, p.4168-4170, 2001.
- ANDRE, C. **Adesão, formação e composição de biofilme por *Staphylococcus aureus* em poliestireno na presença de nisina**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2015.
- BENFATTI C.S.; CORDOVAL, S.M.; GUEDES, A.; MAGINA, M.D.A.; CORDOVA, C.M.M. Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp. **Revista Pan-AmazSaúde**, 1(2):33-39, 2010.
- BODDIE, R. L.; OWENS, W.E.; RAY, C.H.; NICHESON, S.C.; BODDIE, N.T. Germicidal Activities of Representatives of Five Different Teat Dip Classes Against Three Bovine Mycoplasma Species Using a Modified Excised Teat Model. **Journal Dairy Science** 85:1909–1912, 2002.
- DOLABELA, M.F. **Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de *Esenbeckia febrifuga* (a.st-hil.) Juss. Ex mart. (rutaceae) e de espécies do gênero *Aspidosperma* (apocynaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2007.
- FACCIN, A.; SCHUCH, L.F.D.; SCHIAVON, D.B.A.; GONCALVES, C.L.; MOTA, F.V.; LESSA, L.F. Use of hydroalcoholic extract of *schinus terebinthifolius* raddi in pre- and post-milking antiseptics of the teat in dairy cows. **Ciência animal brasileira**, v.17 (1), 2016.
- FAGUNDES, H. **Ocorrência de resíduos de antimicrobianos utilizados no tratamento de interrupção de lactação no início da lactação subsequente e, animais com período seco recomendado**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo (USP), 2003.
- 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.<sup>a</sup> Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal, 2007.
- GOMASHE, A.V; SHARMA, A.A.; KASULKAR, A. Investigation of Biofilm Inhibition Activity and Antibacterial Activity of *Psidium guajava* Plant Extracts against *Streptococcus mutans* Causing Dental Plaque. **International Journal Current Microbiology Applied Sciences**. 3(9) 335-351, 2014,
- INOUE, F. A.; PURGATO, G.A.; MAIA, T.F.; SIQUEIRA, R.P.; LIMA, S.; DIAZ, M.A.N.; MUNOZ, G.D. Chemical constituents and an alternative medicinal veterinary herbal soap made from *Senna macranthera*. **Evidence-based Complementary and Alternative medicine**, 2015.

ISAACS, C.E.; KASHYAP, S.; THORMAR, H.; HEIRD, W.C. Antiviral and antibacterial lipids in human milk and infant formula feeds. **Archive Disease in Childhood**, 65: 861-864. 1990.

ISAACS, C.E.; LITOV, R.E.; THORMAR, H. Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. **J Nutr Biochem** 6: 362-366. 1995.

KLEIN, R.C.; FABRES-KEIN, M.H.; OLIVEIRA, L.L.; FEIO, R.N.; MALOUIN, F.; RIBON, A.O.B. A C-Type Lectin from Bothrops jararacussu Venom Disrupts Staphylococcal Biofilms. **PLoS ONE**. 2015.

LIMA, S.; MUNOZ, G.D.; DIAZ, M.A.N. Antibacterial Chemical Constituent and Antiseptic Herbal Soap from *Salvinia auriculata* Aubl. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2013.

MATHABE, M.C.; NIKOLOVA, R.V.; LALL, N.; NYAZEMA, N.Z. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoeas in limpopo province, South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, 105: 286 – 93, 2006.

MELÉNDEZ, P.A.; CAPRILES, V.A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**, 13: 272 – 76, 2006.

MITIDIERO, A.M.A. **Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. 132p. 2012.

NADER, T.T.; COPPEDE, J.S.; AMARAL, L.A.; FACCHIN, A.L.; PEREIRA, A.M.S.; FERREIRA, L.M. Avaliação *in vitro* da eficácia de extratos de plantas medicinais do Cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes fontes de propriedades leiteiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.429-433, 2010.

NIKOLIĆ, M.; VASIC, S.; DURIDEVIĆ, J.; STEFANOVIĆ, O. Antibacterial and anti-biofilm activity of ginger (*Zingiber officinale* (Roscoe) ethanolic extract. **Kragujevac Journal of Science**. 36, 129-136, 2014.

PHILPOT, W.N.; BODDIE, R. L.; PANKEY, J. W. Hygiene in the prevention of udder infections. IV. Evaluation of teat dips with excised cows' teats. **Journal of Dairy Science**. 61:950–955, 1978.

RAHMAN, M.A.; MOSSA, J.S.; AL-SAID, M.S.; AL-YAHYA, M.A. Medicinal plant diversity in the flora of Saudi Arabia : a report on seven plant families. **Fitoterapia**; 75:149-161, 2004.

REJINIEMON, T.S.; ARASILE, M.V.; DUBAIPANDUYAN, V. In-vitro antimicrobial, antibiofilm, cytotoxic, antifeedant and larvicidal properties of novel quinone isolated from *Aegle marmelos* (Linn.) Correa. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 2014.

ROSSI, C.C.; AGUILAR, A.P.; DIAZ, M.A.N.; RIBON, A.O.B. Aquatic plants as potential sources of antimicrobial compounds active against bovine mastitis pathogens. **African Journal of Biotechnology** Vol. 10(41), pp. 8023-8030, 2011.

ROZATTO, M.R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”, 2012.

SASIREKHA, B.; MEGHA, D.M.; SHATATH CHANDRA, M.S.; SOUJANYA, R. Study on effect of different plant extracts on microbial biofilms. **Asian Journal of biotechnology** 7(1): 1-12, 2015.

SCHUCH, L.F.D. **Plantas medicinais em atenção primária veterinária: atividade antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e a dermatófitos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2008.

SHAHID, A.A. Cytotoxicity evaluation of the crude extracts against Vero African Green monkey kidney cell lines. **Pretória (ZA)**: Universidade de Pretória; 2012.

YOKOYA, E. **Controle de infecções intramamárias no gado leiteiro usando as propriedades antibacterianas e cicatrizantes do muco de escargot *Achatina* sp no pré e pós dipping**. Dissertação de Mestrado em Ciências. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

## CAPÍTULO II

### **ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE EXTRATOS OBTIDOS DE FOLHAS E RAÍZES DE *Salvinia auriculata* Aubl.**

#### **1. INTRODUÇÃO**

A pesquisa fitoquímica busca conhecer os constituintes químicos das plantas ou conhecer o grupo de metabólitos secundários relevantes. O estudo fitoquímico é um desafio a ser ultrapassado pela comunidade científica, uma vez que o uso das espécies vegetais para fins terapêuticos é crescente. As análises fitoquímicas fornecem informações relevantes sobre a presença de metabólitos secundários nas plantas, para que assim possa chegar ao isolamento de princípios ativos importantes na produção de novos fitoterápicos (SILVA et al., 2010).

As drogas que são constituídas por extratos orgânicos ou compostos biologicamente ativos isolados de espécies vegetais usadas na medicina popular podem ser fontes promissoras para a pesquisa de novos fármacos antimicrobianos (AL-FATIMI et al., 2007).

Em geral, os princípios ativos das plantas medicinais com atividade antimicrobiana são resultados do seu metabolismo secundário e acumulados em um ou vários dos seus tecidos. As plantas são capazes de produzir inúmeros compostos provenientes desse metabolismo (SCHUCH, 2008).

As principais razões para o enorme interesse em investigar e identificar compostos de origem vegetal e suas atividades biológicas são justificadas pela vasta gama de substâncias presentes nas plantas que podem ser usadas para tratar infecções crônicas bem como doenças infecciosas, aumento da resistência microbiana aos medicamentos, presença de efeitos colaterais nos medicamentos sintéticos, segurança e eficácia com menor efeito adverso de medicamentos produzidos a partir de fontes naturais, o custo da terapia bem como o aumento de doenças emergentes (ROZATTO, 2012).

Os fitoesteróis são esteróis derivados de plantas e são componentes estruturais importantes de membranas celulares. Mais do que 100 tipos de fitosteróis têm sido relatados em espécies de plantas, mas o mais abundante é o sitosterol, o estigmasterol. Outros fitosteróis podem ser encontrados em plantas

em pequenas quantidades como o brassicasterol, A5-avenasterol, sitostanol e campestanol (FRVE, 2012).

O  $\beta$ -sitosterol é um fitoesterol bem conhecido na composição de fitoterápicos conhecidos para o tratamento da hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. Além disso, o composto eleva a oxidação enzimática e não enzimática em células tornando-se um agente quimiopreventivo eficaz. O elevado potencial deste composto e dos seus análogos no tratamento de várias doenças, o classifica como uma droga notável do futuro (SAEIDNIA et al., 2014).

A presença de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol nas folhas de *Amaranthus tricolor* foi relacionada a uma forte inibição contra bactérias gram-positivas e uma atividade moderada contra bactérias gram-negativas (SHARMA, 1993). Manriquez-Torres e colaboradores (2007) avaliaram a concentração inibitória mínima de vários metabólitos isolados de *Acacia cochiliacantha* e a mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol apresentou CIM de 16,5 mg/mL.

No presente trabalho foi realizada a análise do perfil cromatográfico dos extratos orgânicos de raízes e das folhas de *S. auriculata* através do CLAE e do CG-EM e identificação de metabólitos secundários presentes na planta aquática.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Analisar o perfil cromatográfico e identificação de compostos orgânicos dos extratos obtidos de folhas e raízes de *Salvinia auriculata*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Analisar o perfil cromatográfico dos extratos orgânicos mais ativos (forte atividade antibacteriana);
- Isolar os compostos bioativos utilizando a cromatografia em camada preparativa a partir de diferentes de misturas fases móveis;
- Identificar compostos orgânicos isolados presentes nos diferentes extratos brutos analisados através das técnicas de RMN e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Perfil cromatográfico dos extratos vegetais

##### 3.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O perfil cromatográfico dos extratos brutos mais ativos de *S. auriculata* foi determinado com auxílio de CLAE com detectores UV-Vis e DAD Shimadzu Prominence (bomba LC - 20 AD, detector SPD - M 20 A, forno CTO - 20 A, software LabSolutions).

Para o preparo das amostras foram pesados 10 mg dos 3 extratos mais ativos obtidos em microtubos de capacidade 2 mL. Aos microtubos foram adicionados 2 mL de metanol (MeOH) grau HPLC. A solubilização dos extratos ocorreu com auxílio de sonicação por 30 min em aparelho Unique® - Ultrasonic cleaner. O conteúdo dos microtubos foi transferido para balões volumétricos de 10 mL. Após o ajuste de volume, as amostras foram transferidas para frascos âmbar de capacidade 10 mL.

Com o auxílio de seringas descartáveis (3 mL) e filtros *milipore* (20 µm) foram recolhidos aproximadamente 3 mL de cada extrato. O volume da primeira passagem no filtro foi descartado (1 mL) e o restante foi transferido para *vials* (1,5 mL), que foram, então, hermeticamente fechados e alocados no injetor automático de amostras do HPLC.

A coluna utilizada nas eluições (Shimpack®, 15 cm por 4,6 mm) foi de fase reversa (C-18). As condições de corrida foram: tempo de corrida: 60 min, fase móvel gradiente de 5% a 95% de MeOH; fase A: H<sub>2</sub>O/metanol 0,5 % (v/v) e fase B: MeOH.

Foi realizada a varredura dos picos presentes nos cromatogramas. As varreduras compreenderam uma faixa de comprimentos de onda de 200 a 400 nm.

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

O perfil dos extratos mais ativos também foi analisado através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando-se um aparelho da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Ultra, com coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de

0,25  $\mu\text{m}$ ) e hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor e da fonte foi de 290 C. Para a coluna, a temperatura inicial foi de 80  C por 5 minutos, aumentando até 285  C, com taxa de 4  C/minutos e permanecendo nesta temperatura durante 40 minutos. A temperatura na interface do sistema foi de 290 C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 35 a 700 Da.

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

### **3.2 Fracionamento cromatográfico dos extratos vegetais**

Após a evaporação dos solventes, os extratos brutos de *S. auriculata* foram fracionados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placas de sílica-gel 20 x 20 cm, com 0,75 mm de espessura e como fase móvel foram utilizadas misturas dos seguintes solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila, acetato de etila e etanol 95%. As frações mais evidentes foram reunidas em grupos, sendo prioritariamente elaboradas de acordo com a quantidade de material contido e complexidade da mistura.

Para a revelação das frações, foram utilizados ácido fosfomol bdico P.A ACS da Vetec<sup> </sup> diluído em etanol 95 % com concentração de 1% m/v e a c ma-ra escura de luz UV (254 e 365nm) modelo MA-544 da Marconi<sup> </sup>.

### **3.3 Isolamento de metabólitos presentes nos extratos orgânicos de *S. auriculata***

As substâncias isoladas foram identificadas pela Ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (<sup>1</sup>H) e carbono (<sup>13</sup>C) e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Os equipamentos pertencem ao Departamento de Química – UFV.

Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz) e <sup>1</sup>H (300 MHz) foram obtidos em espectrômetro VARIAN MERCURY 300. Utilizou-se o solvente deuterado (CDCl<sub>3</sub>) e o cloreto de tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna. As constantes de acoplamento escalar (*J*) foram expressas em Hertz (Hz).

Os compostos foram analisados também por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, como especificado anteriormente. A identificação dos compostos foi realizada através de comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles existentes no banco de dados do aparelho e com os dados da literatura.

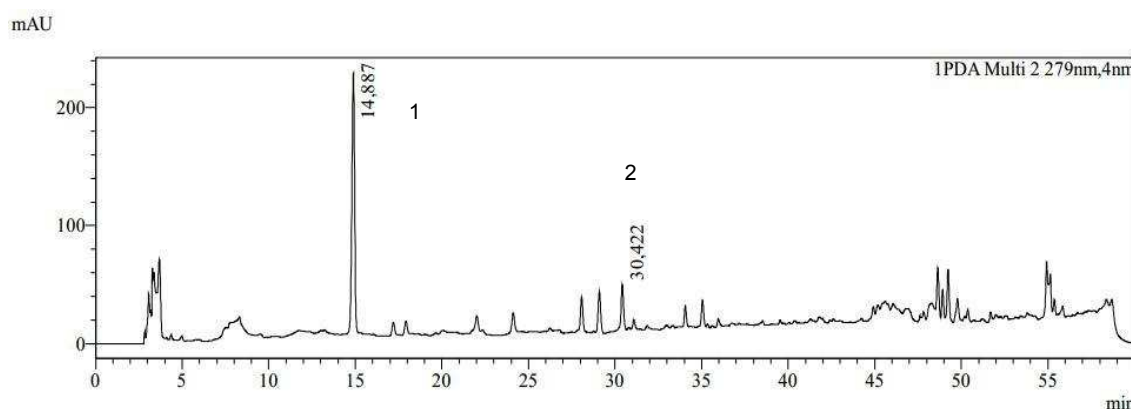
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos orgânicos ativos de *S. auriculata*

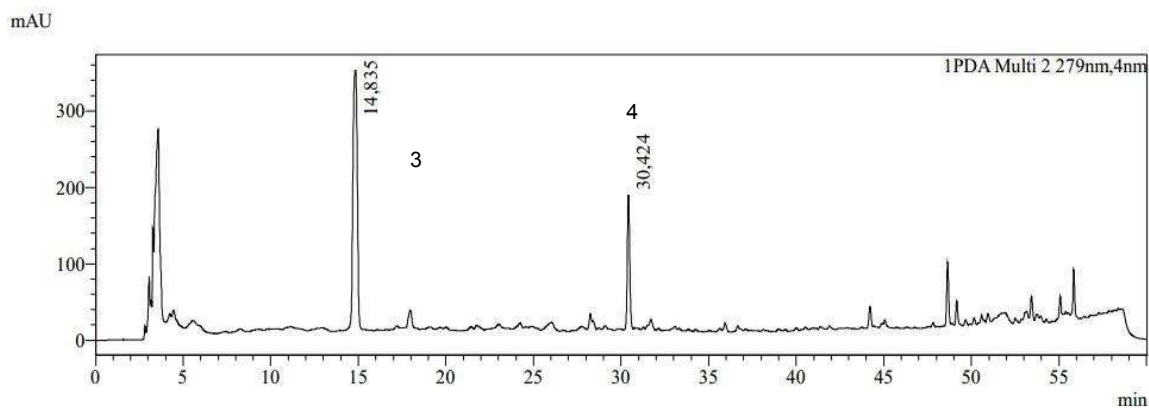
O perfil cromatográfico dos extratos ativos de *S. auriculata* obtidos através da CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e do CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas) trouxe considerações quanto à composição química dos diferentes extratos obtidos da planta (raízes e folhas, solventes extratores, meses de coleta). Os extratos mais ativos, de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM) (Capítulo I) foram os extratos brutos éter de petróleo de folhas e raízes coletadas em Março e o extrato bruto etanólico de raízes também coletadas no mesmo mês. Esses extratos ativos foram submetidos às técnicas mencionadas acima.

#### 4.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os extratos ativos de raízes apresentaram um perfil cromatográfico semelhante quando foram analisados por CLAE (figuras 1 e 2). As análises dos cromatogramas obtidos permitiram identificar vários picos e com destaque para os picos 1, 2, 3 e 4 nos tempos de retenção de 14.887, 30.422, 14.835 e 30.424 minutos, respectivamente.

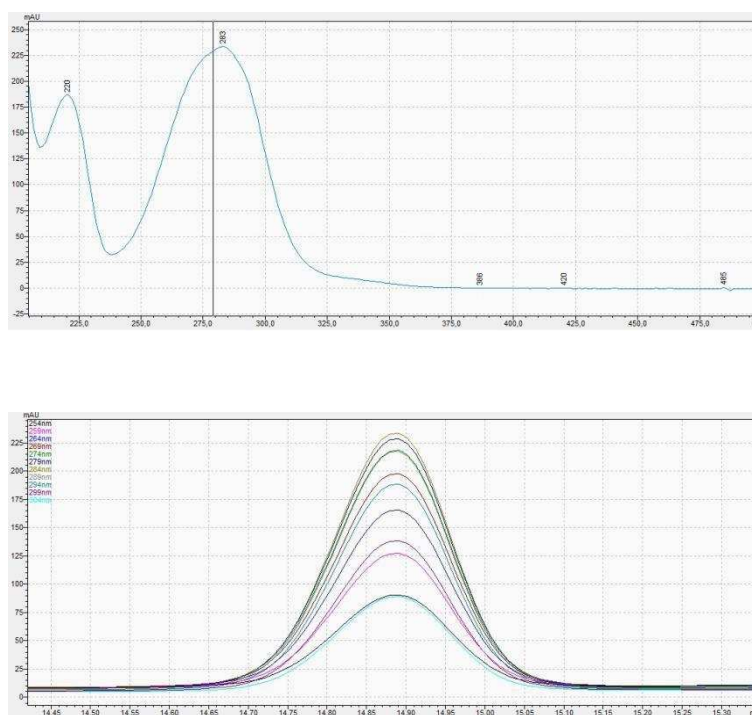


**Figura 1** Cromatograma referente ao extrato ativo etanólico de raízes de *Salvinia auriculata* obtido em Março de 2013.

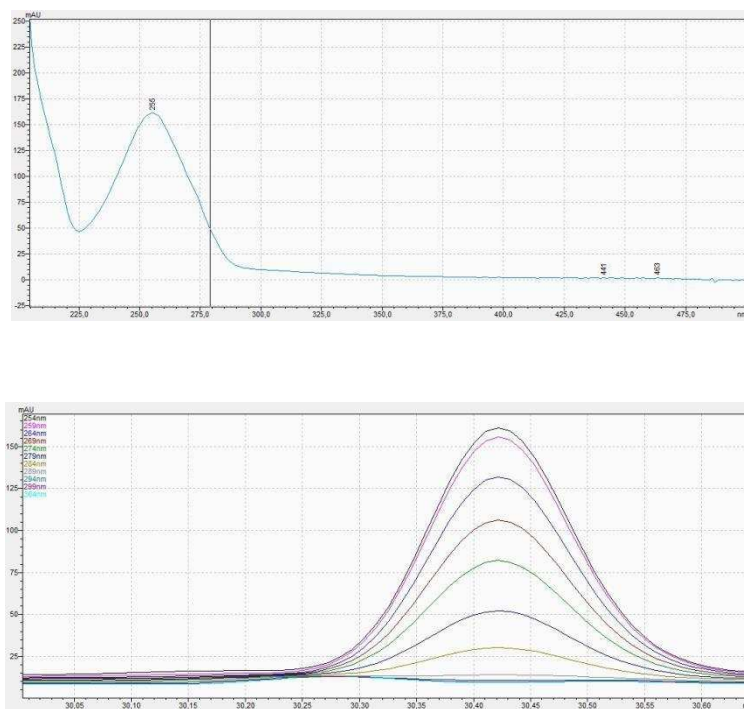


**Figura 2** Cromatograma referente ao extrato ativo éter de petróleo de raízes de *Salvinia auriculata* obtido em Março de 2013.

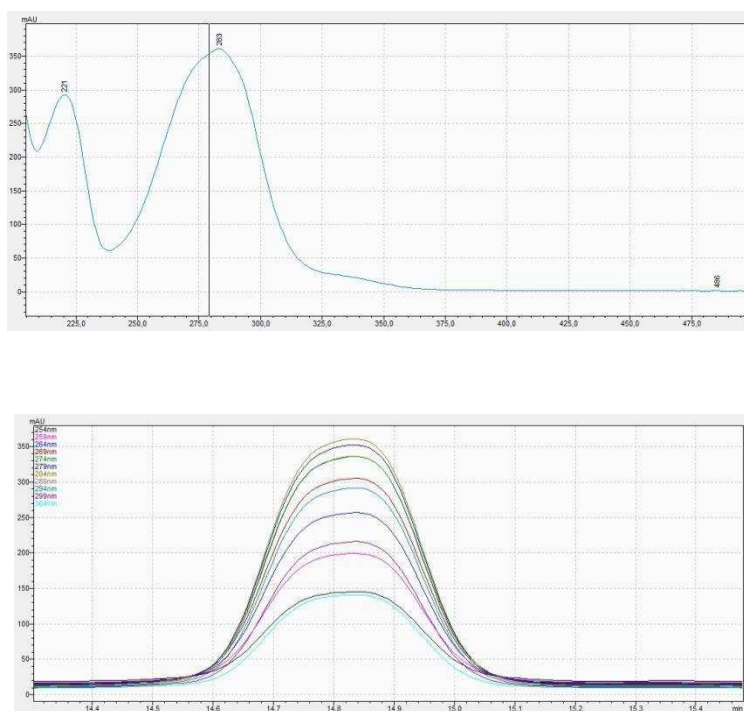
Foram feitas varreduras (espectro UV) para os picos em destaque como mostram as figuras 3, 4,5 e 6.



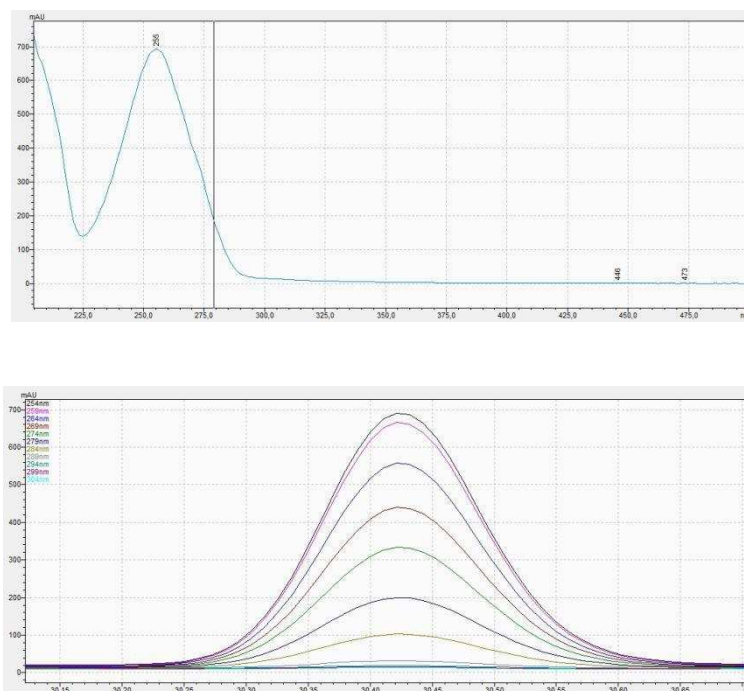
**Figura 3** Espectro DAD/UV do pico 1 referente ao extrato orgânico ativo etanólico de raízes de *Salvinia auriculata* obtido em Março de 2013.



**Figura 4** Espectro DAD/UV do pico 2 referente ao extrato orgânico etanólico de raízes de *Salvinia auriculata* obtido em Março de 2013.



**Figura 5** Espectro DAD/UV do pico 3 referente ao extrato orgânico ativo éter de petróleo de raízes de *Salvinia auriculata* obtido em Março de 2013.



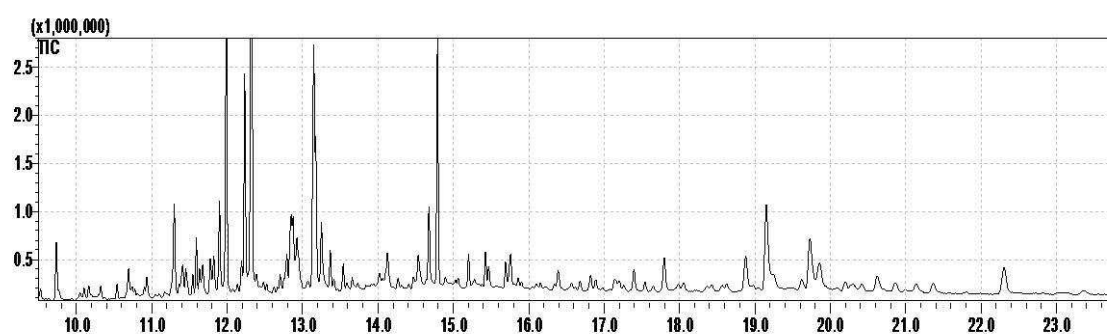
**Figura 6** Espectro DAD/UV do pico 4 referente ao extrato orgânico ativo éter de petróleo de raízes de *Salvinia auriculata* obtido em Março de 2013.

Os cromatogramas foram obtidos a partir dos extratos orgânicos ativos de raízes (etanol e éter de petróleo) de *S. auriculata* e apresentaram picos (2 e 4) com máximo de absorção no espectro de UV em 255 nm cada, característico de grupo carbonila  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado. Em um trabalho de Velve e colaboradores (1982), o triterpeno cordialina A identificado em *Cordia verbenácea* apresentou o mesmo máximo de absorção em 255 nm. Já para picos 1 e 3, a análise realizada identificou duas bandas de absorção no espectro de UV de 220 e 283 nm que correspondem a um composto com dois cromóforos. Cromóforos aromáticos são típicos de flavonoides, pois seu espectro de absorção no UV mostra, em geral, dois picos máximos de absorção, um entre 240-280 nm e outro a 300-550 nm (SOUZA et al., 2005). O perfil de absorção no ultravioleta sugere a presença de flavonoides dos grupos das flavanonas, flavanonois, 3,4 diidroxiflavanos e etc, onde se pode observar a banda II igual a 220-280 nm e que corresponde à porção benzoíla do anel flavonoídico (MABRY et al., 1970). Porém, nenhum composto foi isolado e identificado com essas características.

#### 4.1.2 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas

Os extratos orgânicos ativos obtidos de folhas e raízes (éter de petróleo) e raízes (etanol) de *S. auriculata* foram analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). As análises dos cromatogramas obtidos (figuras 7, 16 e 29) permitiram visualizar vários picos e foi sugerida a fragmentação dos picos mais abundantes com base nos espectros de massas obtidos e nos tempos de retenção selecionados ( $T_R$ ).

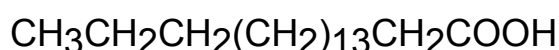
##### 4.1.2.1 Extrato bruto de raízes éter de petróleo de *Salvinia auriculata* obtido em Março de 2013



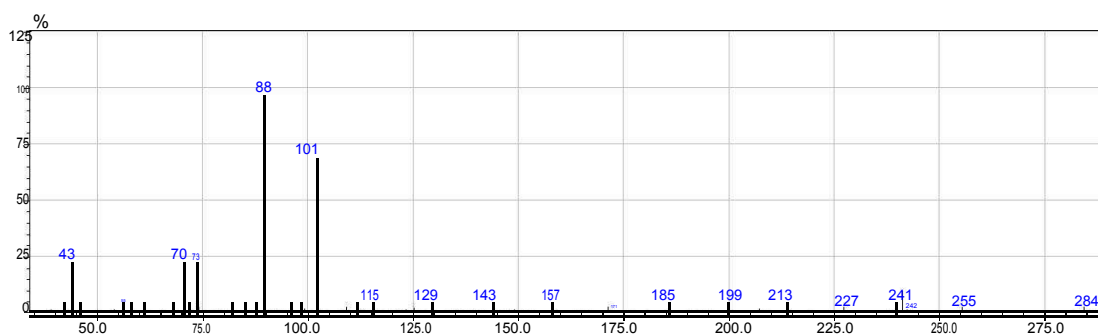
**Figura 7** Cromatograma ao extrato bruto ativo éter de petróleo de raízes de *Salvinia auriculata* obtido em Março de 2013.

A análise do cromatograma referente ao extrato bruto éter de petróleo (figura 7) permitiu a identificação dos seguintes compostos:

##### Composto 1 - Ácido octadecanóico

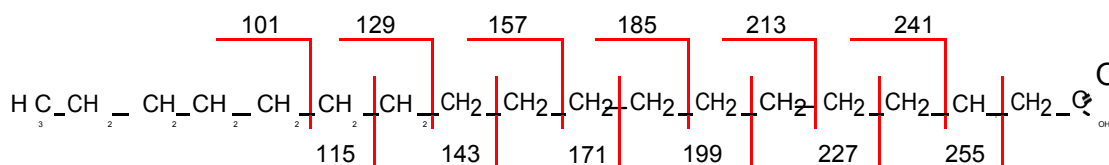


$T_R = 12,32$  min.



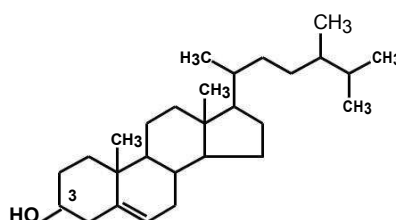
**Figura 8** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 12,32$  min. referente à fragmentação do extrato bruto éter de petróleo de raízes de *Salvinia auriculata* (94 % de similaridade com a biblioteca)

O pico correspondente ao tempo de retenção de 12,32 minutos (figura 8) apresentou fragmentação característica do ácido octadecanóico. Os íons  $m/z$  88; 101; 115; 147; 129; 143; 157; 171; 185; 199; 213; 227; 241; 255 e 284 obtidos no espectro de massas corroboram com a fragmentação proposta na figura 9.

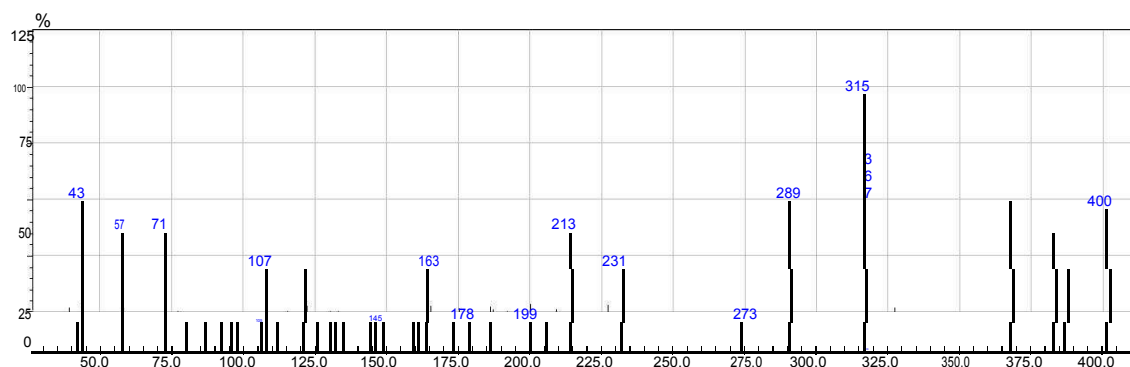


**Figura 9** Fragmentação característica do ácido octadecanóico.

### Composto 2 - Campesterol

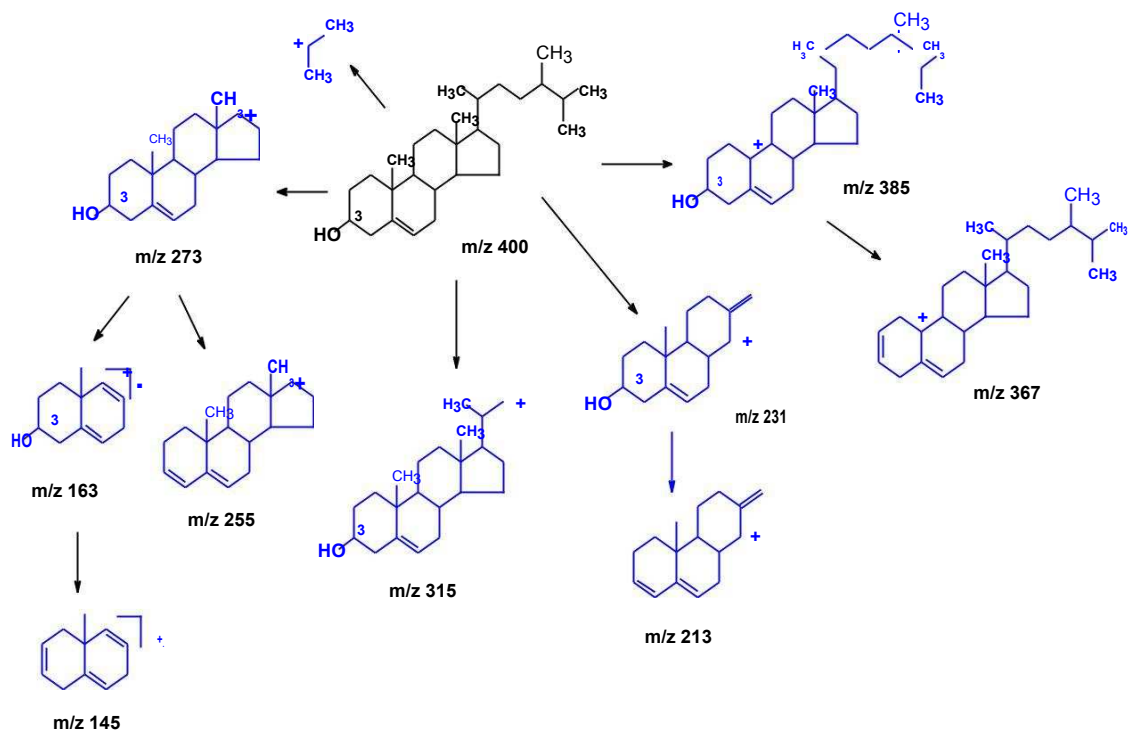


$T_R = 18,82$  min.



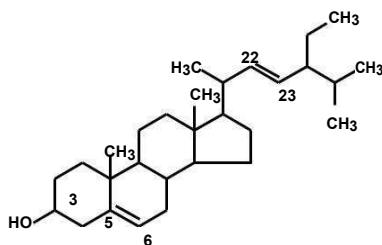
**Figura 10** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 18,82$  min. referente à fragmentação do extrato bruto éter de petróleo de folhas de *Salvinia auriculata* (74 % de similaridade com a biblioteca)

O pico correspondente ao tempo de retenção de 18,82 minutos (figura 10) apresentou fragmentação característica de campesterol (GONÇALVES, 2011). A proposta de fragmentação do composto está apresentada na figura 11.

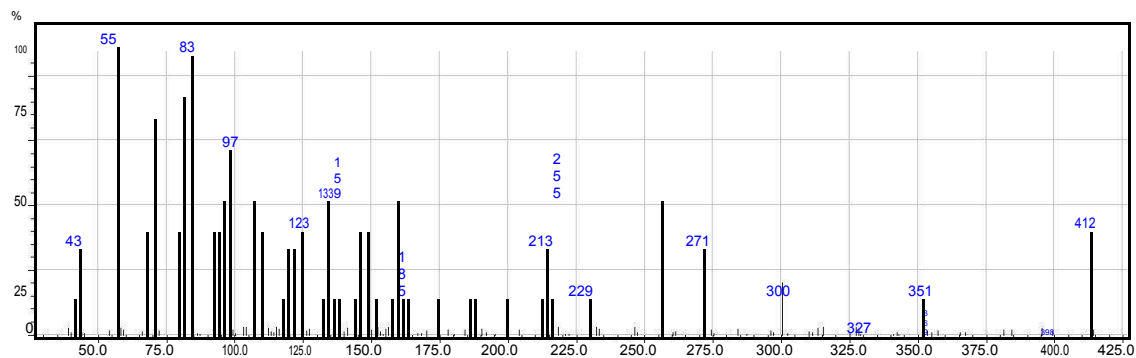


**Figura 11** Proposta de fragmentação do composto 2, onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta.

### Composto 3 – Estigmasterol

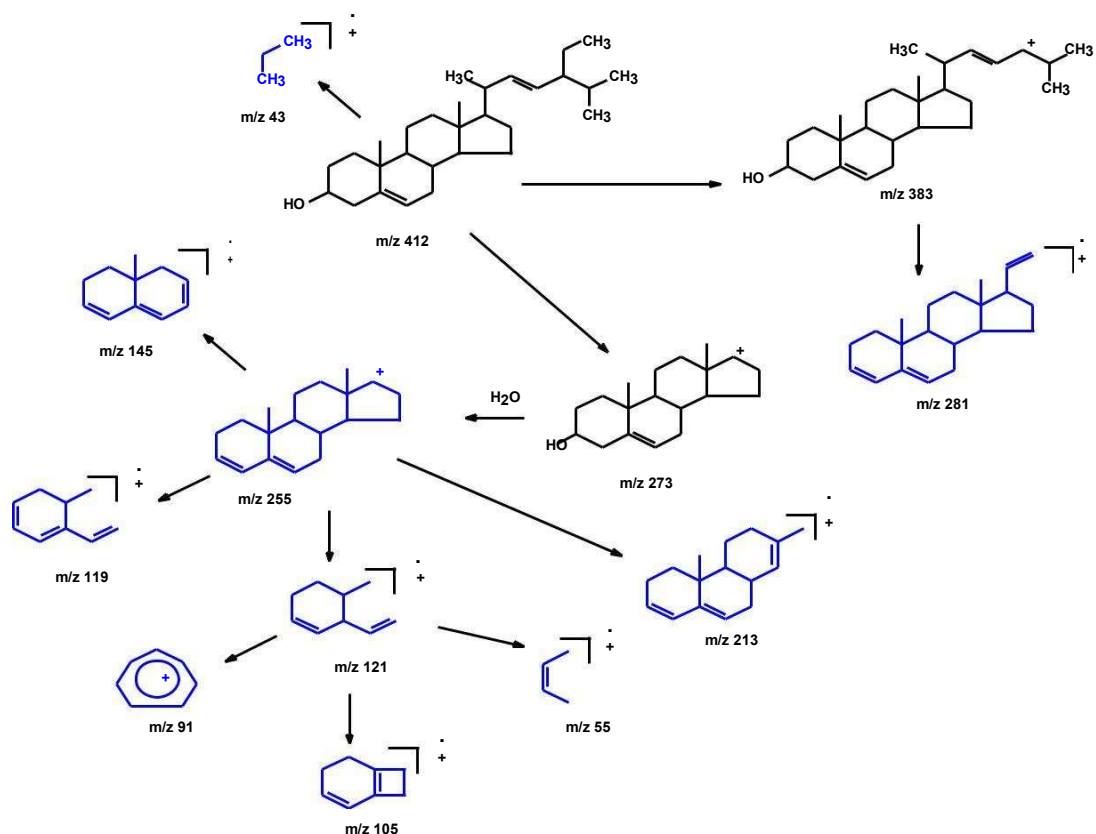


$T_R = 19,13$  min.



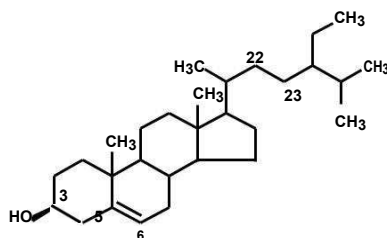
**Figura 12** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 19,13$  min. referente à fragmentação do extrato bruto éter de petróleo de folhas de *Salvinia auriculata* (87 % de similaridade com a biblioteca).

O pico correspondente ao tempo de retenção de 19,13 minutos apresentou fragmentação característica do estigmasterol. Os íons  $m/z$  55; 91; 119; 147; 213; 255; 281 e 412 observados no espectro de massas (figura 12) estão de acordo com a fragmentação proposta abaixo (figura 13).

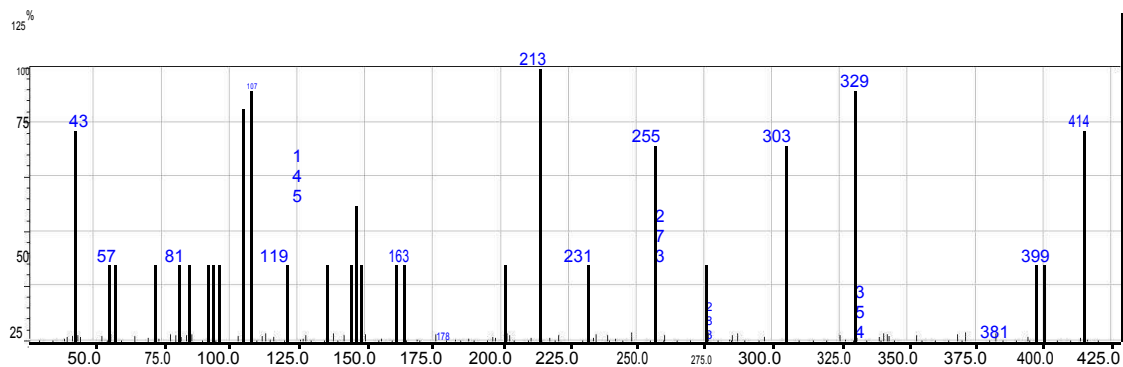


**Figura 13** Proposta de fragmentação do estigmasterol, onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura do composto.

#### Composto 4 - $\beta$ -sitosterol

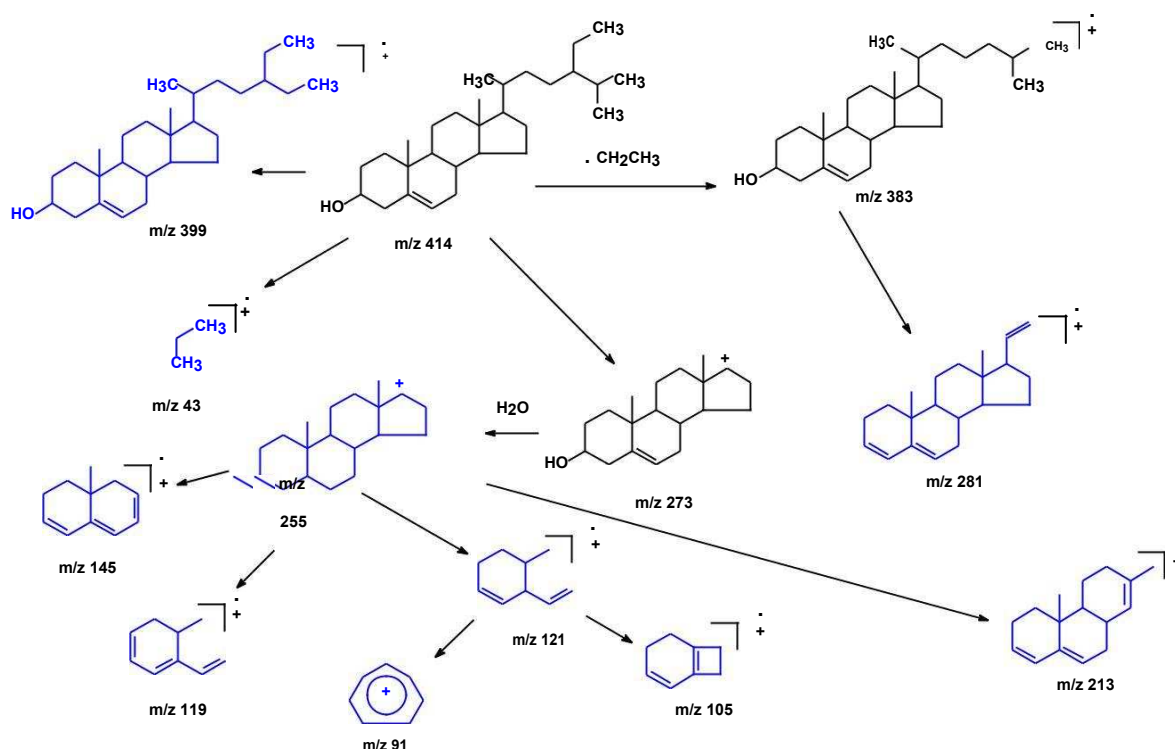


$T_R = 19,66$  min.



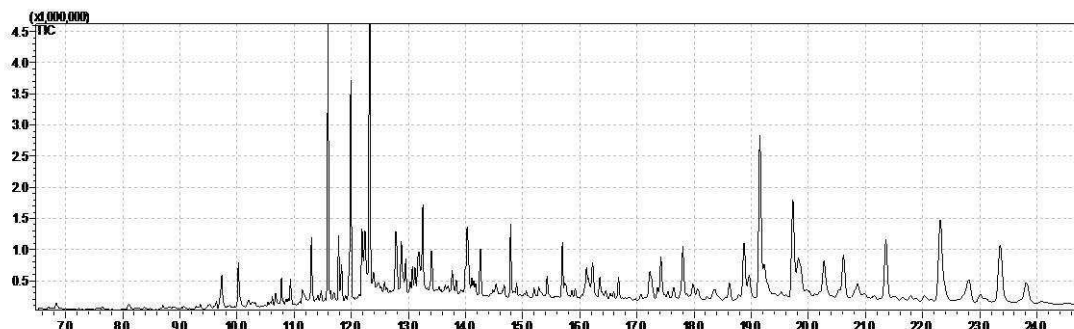
**Figura 14** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 19,66$  min. referente à fragmentação do extrato bruto éter de petróleo de folhas de *Salvinia auriculata* (79 % de similaridade com a biblioteca).

O pico correspondente ao tempo de retenção de 19,66 minutos apresentou fragmentação característica do  $\beta$ -sitosterol. Os íons  $m/z$  43, 119, 145, 213, 255, 273, 399 e 414 observados no espectro de massas (figura 14) estão de acordo com a fragmentação proposta abaixo (figura 15).



**Figura 15** Proposta de fragmentação referente ao  $\beta$ -sitosterol, onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura do composto.

#### 4.1.2.2 Extrato bruto de folhas éter de petróleo de *Salvinia auriculata* obtido em Março de 2013

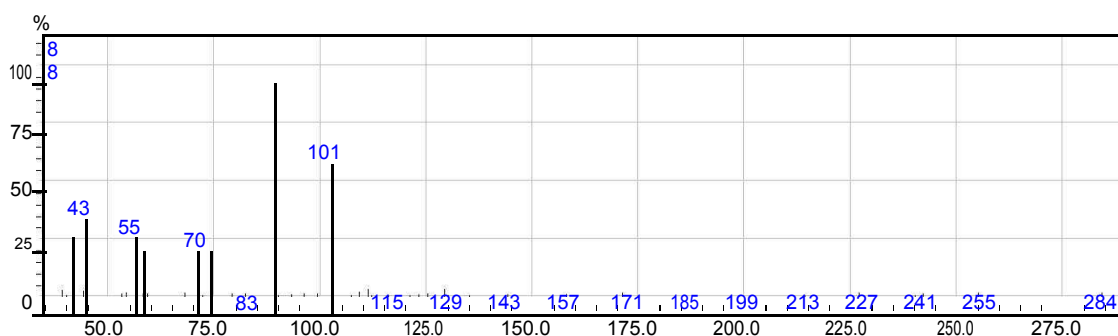


**Figura 16** Cromatograma referente ao extrato bruto ativo éter de petróleo de folhas de *Salvinia auriculata* coletada em Março de 2013.

A análise do cromatograma do extrato bruto éter de petróleo de folhas (figura 16) permitiu a identificação dos seguintes compostos:

##### Composto 1 - Ácido octadecanóico

$T_R = 12,32$  min

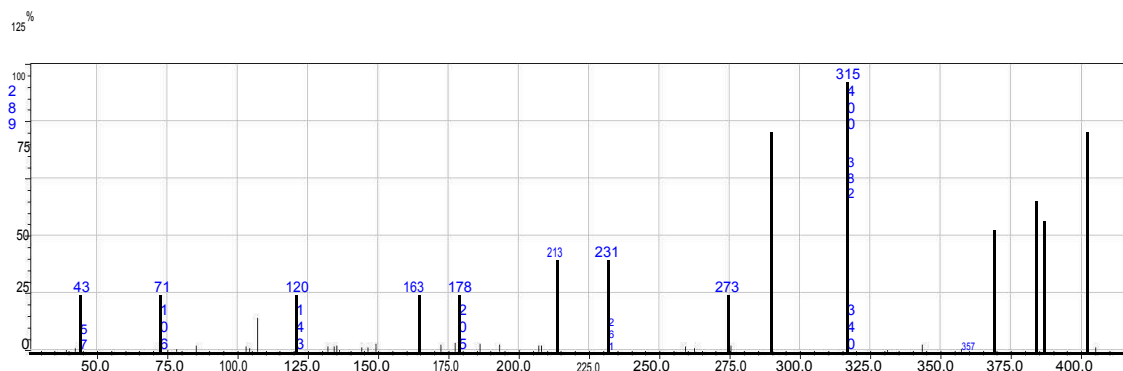


**Figura 17** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 12,32$  min. referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de *Salvinia auriculata* (93 % de similaridade com a biblioteca).

O pico correspondente ao tempo de retenção de 12,32 minutos (figura 17) apresentou fragmentação característica do ácido octadecanóico, já discutido anteriormente.

## Composto 2 - Campesterol

$T_R = 18,82$  min.

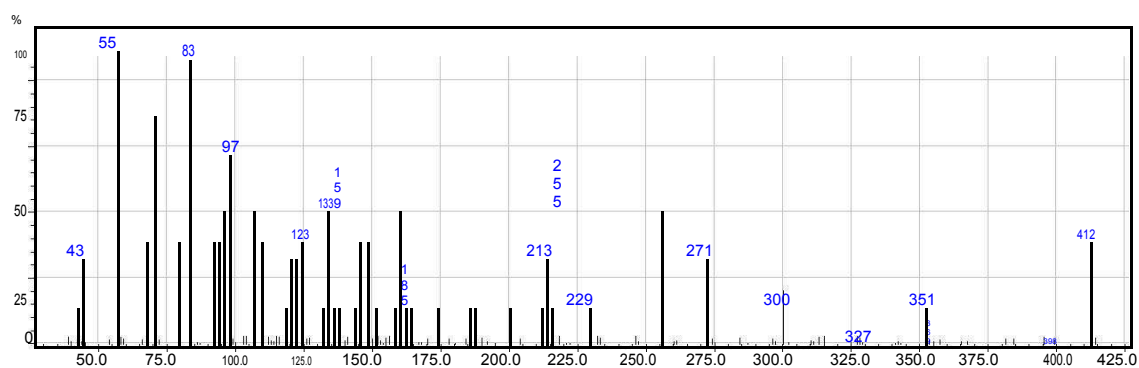


**Figura 18** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 18,82$  min. referente à fragmentação do extrato bruto éter de petróleo de folhas de *Salvinia auriculata* (74 % de similaridade com a biblioteca).

O pico correspondente ao tempo de retenção de 18,82 minutos (figura 18) apresentou fragmentação característica da campesterol, já discutida anteriormente.

## Composto 3 - Estigmasterol

$T_R = 19,13$  min.

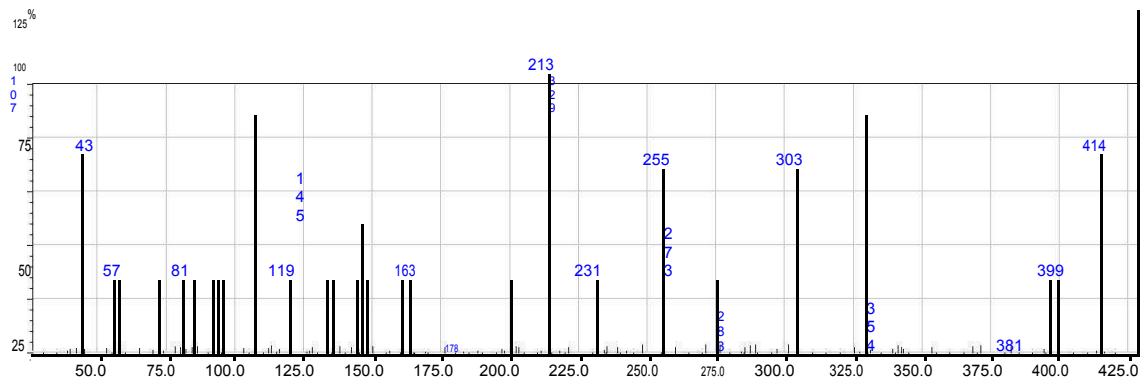


**Figura 19** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 19,13$  min. referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de *Salvinia auriculata* (87 % de similaridade com a biblioteca)

O pico correspondente ao tempo de retenção de 19,13 minutos (figura 19) apresentou fragmentação característica do estigmasterol, já discutido anteriormente.

### Composto 4 - $\beta$ -sitosterol

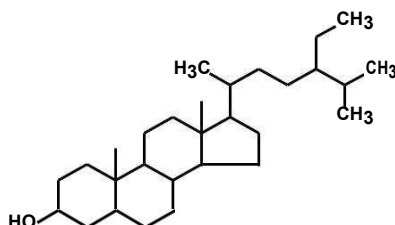
$T_R = 19,69$  min.



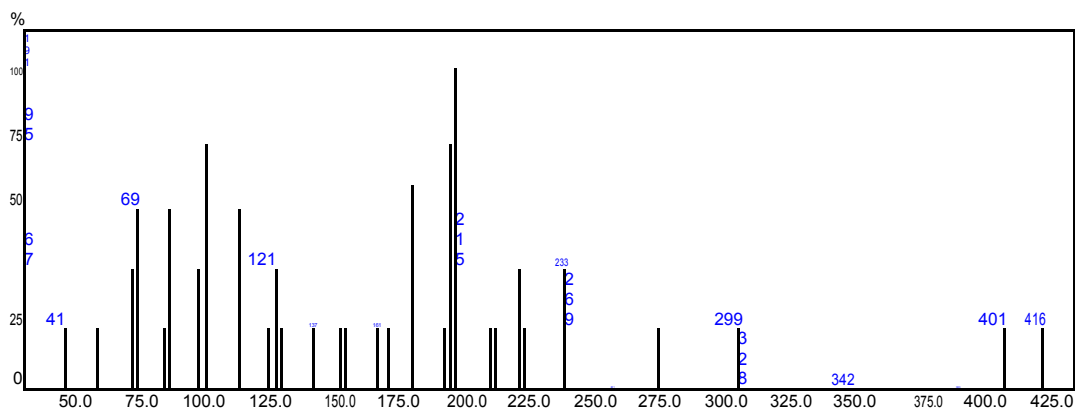
**Figura 20** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 19,69$  min referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de *Salvinia auriculata* (79 % de similaridade com a biblioteca).

O pico correspondente ao tempo de retenção de 19,69 minutos (figura 20) apresentou fragmentação característica do  $\beta$ -sitosterol, já discutido anteriormente.

### Composto 5 - Sitostanol



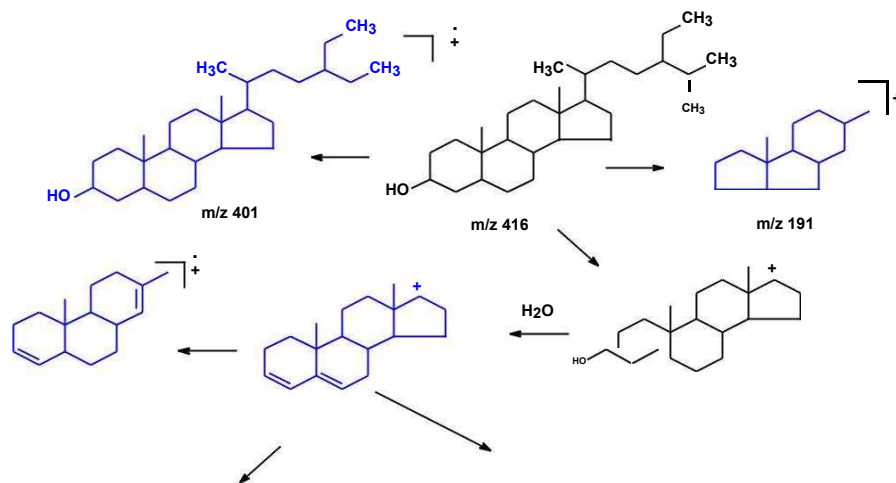
$T_R = 19,85$  min.

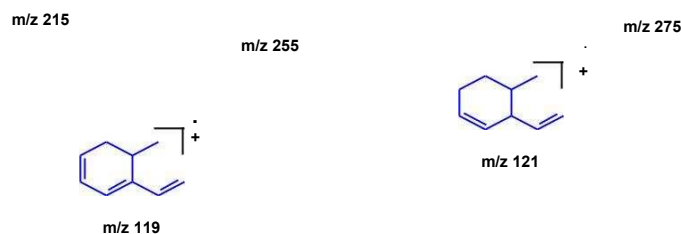




**Figura 21** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 19,85$  min referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de *Salvinia auriculata* (79 % de similaridade com a biblioteca).

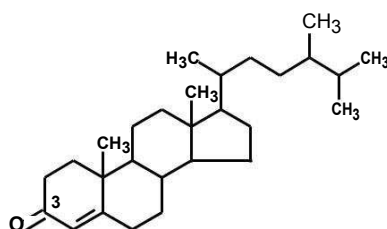
O pico correspondente ao tempo de retenção de 19,85 minutos (figura 21) apresentou fragmentação característica da sitostanol (GONÇALVES, 2011). A proposta de fragmentação do composto foi apresentada abaixo (figura 23).



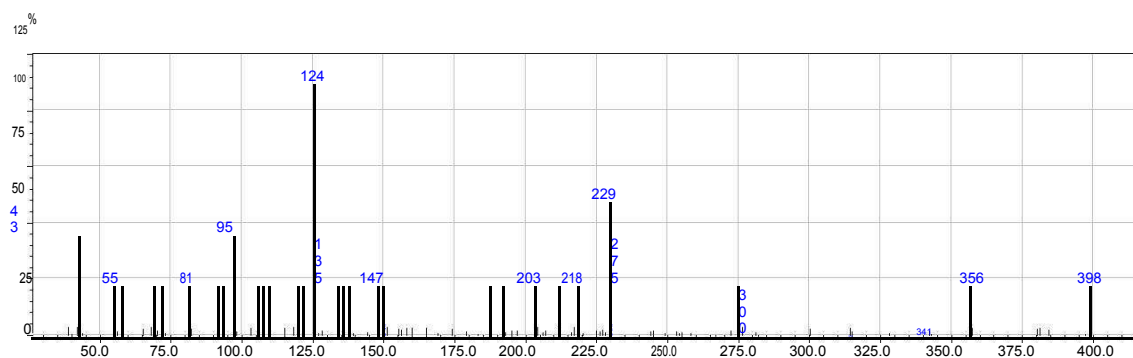


**Figura 22** Proposta de fragmentação referente ao composto **5**, onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura do composto.

### Composto 6 - Campestenona

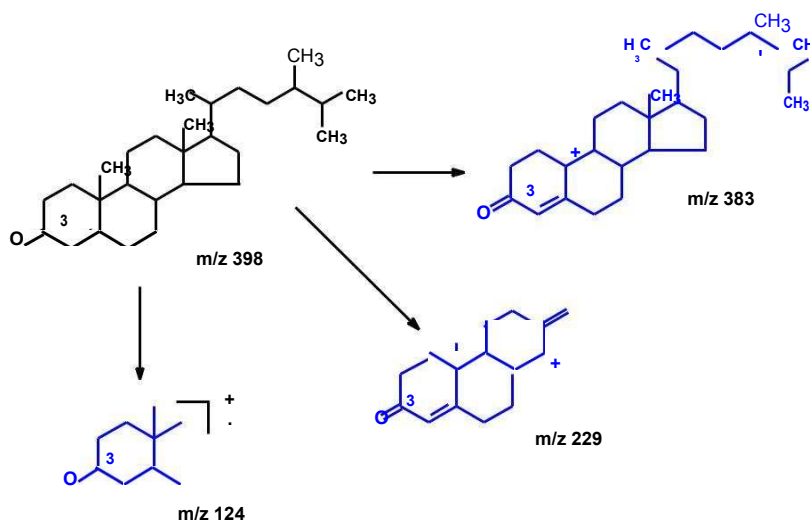


$T_R = 20,24$  min.



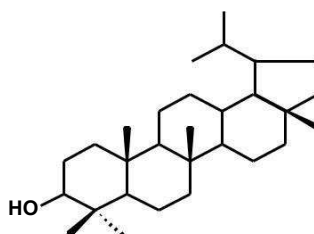
**Figura 23** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 20,24$  min. referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de *Salvinia auriculata* (79 % de similaridade com a biblioteca)

O pico correspondente ao tempo de retenção de 20,24 minutos (figura 23) apresentou fragmentação característica da campestenona (GONÇALVES, 2011). A proposta de fragmentação do composto foi apresentada abaixo (figura 24).

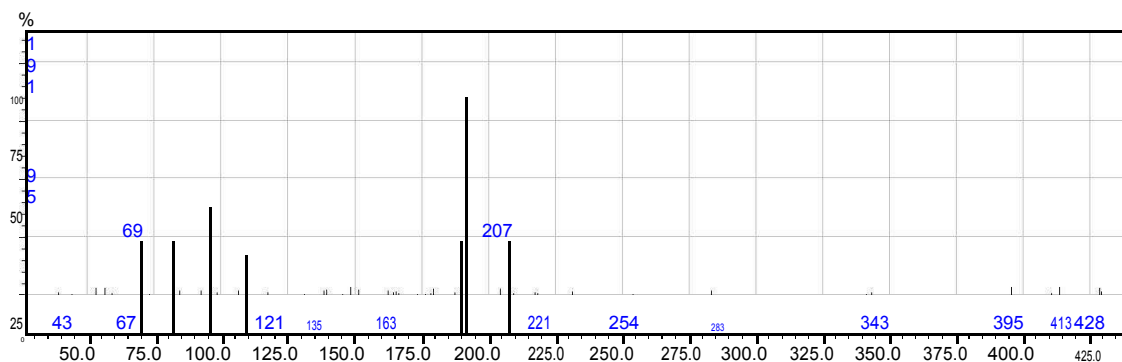


**Figura 24** Proposta de fragmentação do composto 6, onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta

### Composto 7 – Lupanol

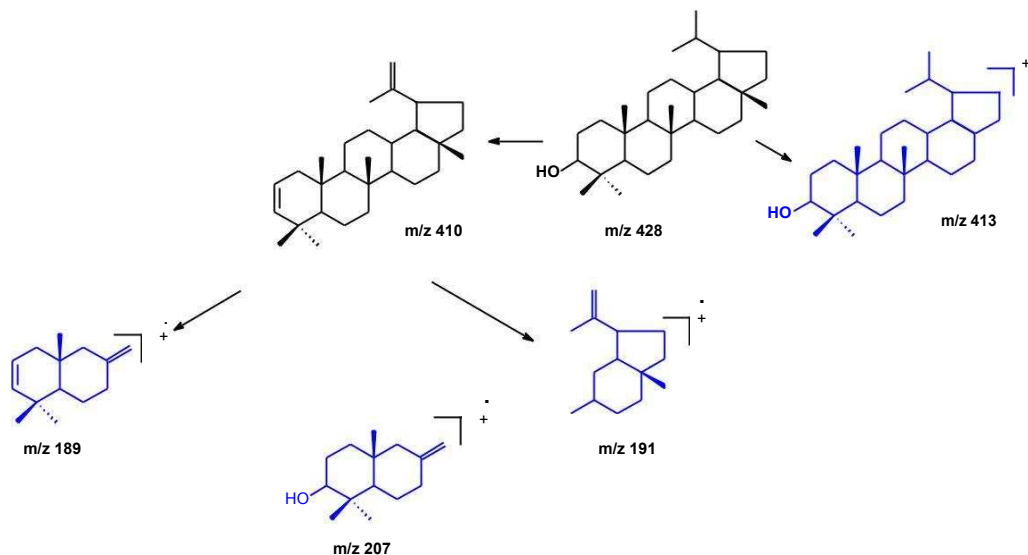


$T_R = 23,28$  min.



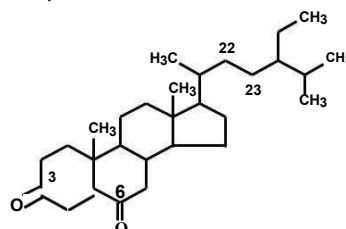
**Figura 25** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 23,28$  min. referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de *Salvinia auriculata* (74 % de similaridade com a biblioteca)

O pico correspondente ao tempo de retenção de 23,28 minutos (figura 25) apresentou fragmentação característica de lupanol. Os íons  $m/z$  207 e 189 são característicos de fragmentação de terpenos com esqueleto lupano dotado de grupo hidroxila na posição 3 (GONÇALVES, 2011). A proposta de fragmentação do composto está apresentada abaixo (figura 26).

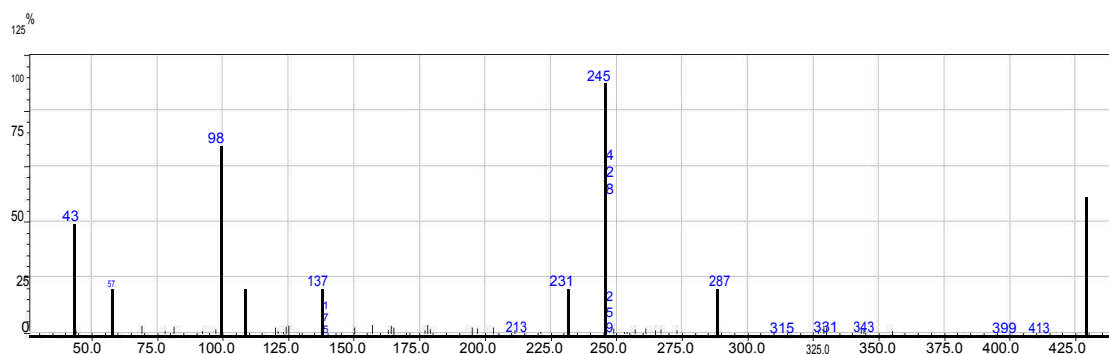


**Figura 26** Proposta de fragmentação do composto **7**, onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta

### Composto 8 - Estigmastan-3,6-diona

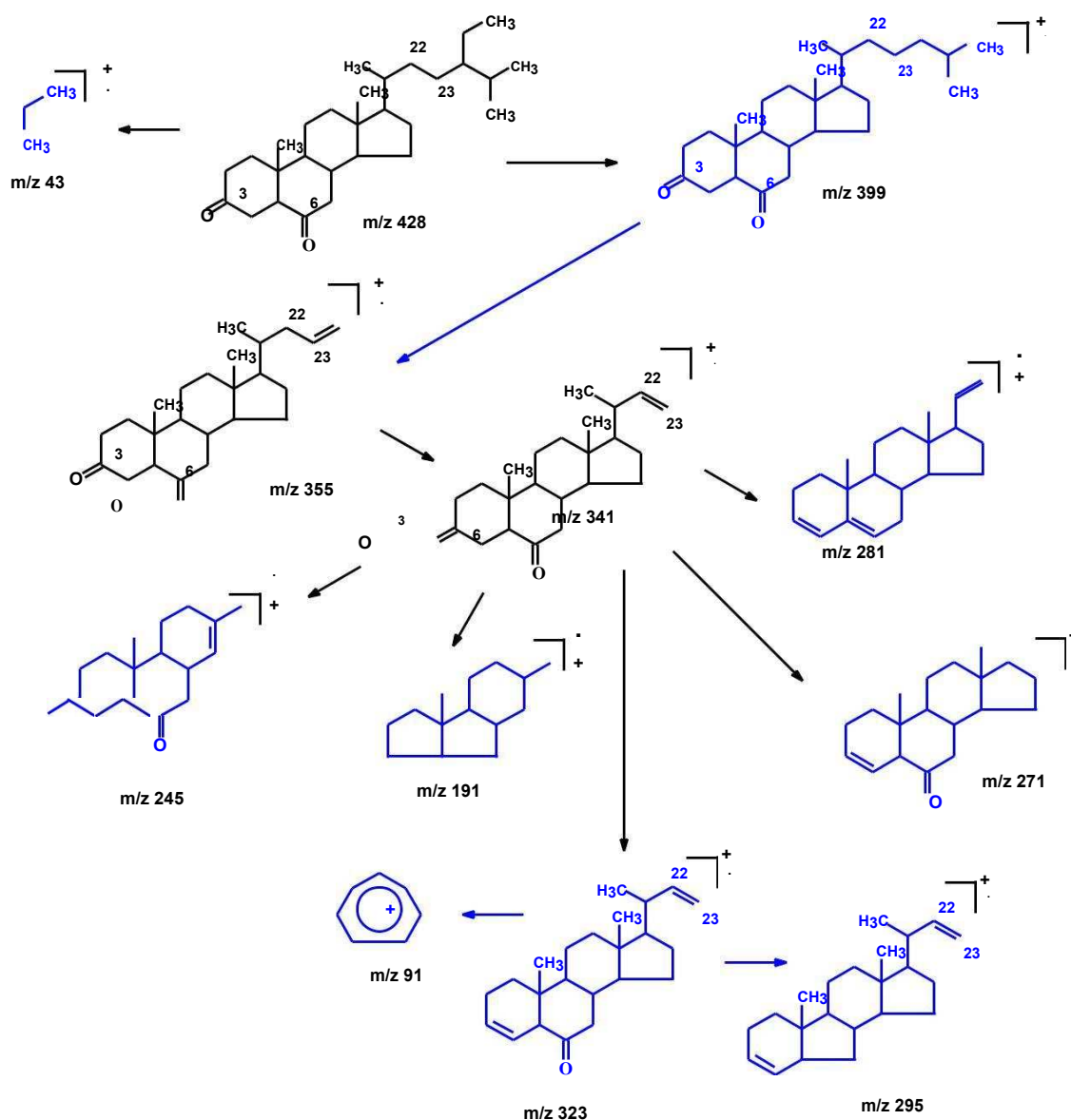


$T_R = 23,78$  min.



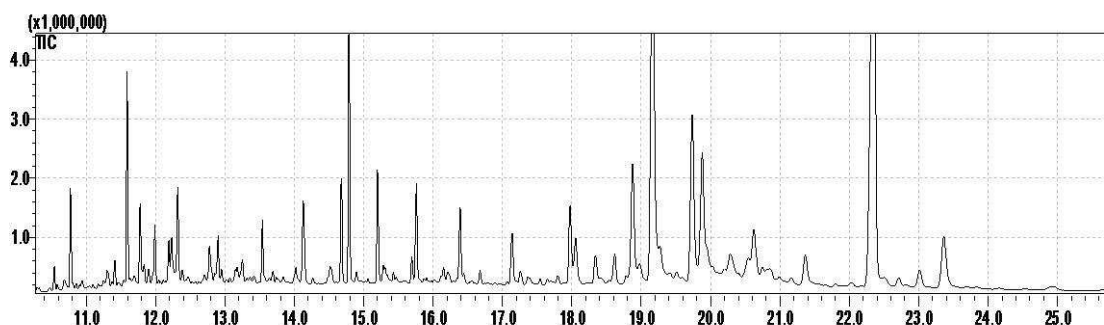
**Figura 27** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 23,78$  min. referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de *Salvinia auriculata* (82 % de similaridade com a biblioteca)

O pico correspondente ao tempo de retenção de 23,78 minutos apresentou fragmentação característica do estigmasteran-3,6-diona. Foram observados íons  $m/z$  399, 281 além do íon característico para o composto proposto como  $m/z$  245 (figura 27). As fragmentações obtidas corroboram com a fragmentação proposta (figura 28).



**Figura 28** Proposta de fragmentação do composto 8, onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta

#### 4.1.2.3 Extrato bruto etanólico de raízes de *Salvinia auriculata* obtido em Março de 2013

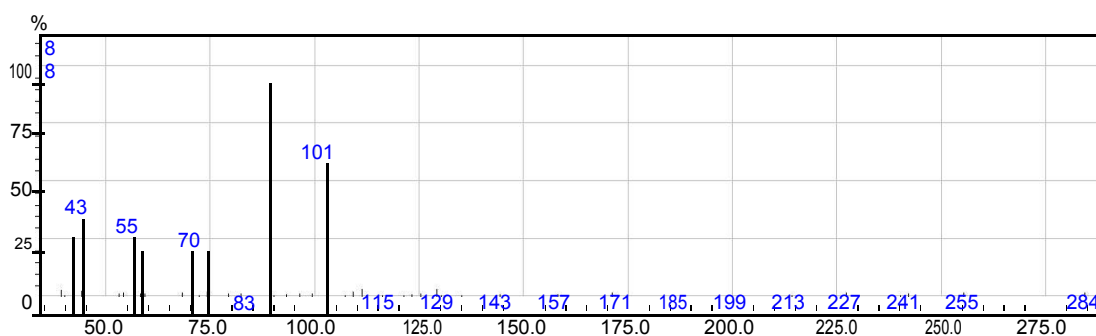


**Figura 29** Espectro de massas do extrato bruto ativo etanólico de raízes de *Salvinia auriculata* coletada em Março de 2013

A análise do cromatograma do extrato bruto etanólico de raízes (figura 29) permitiu a identificação dos seguintes compostos:

#### Composto 1 – Ácido octadecanóico

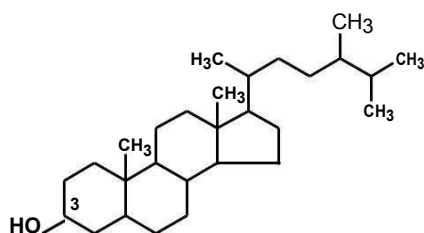
$T_R = 12,30$  min.



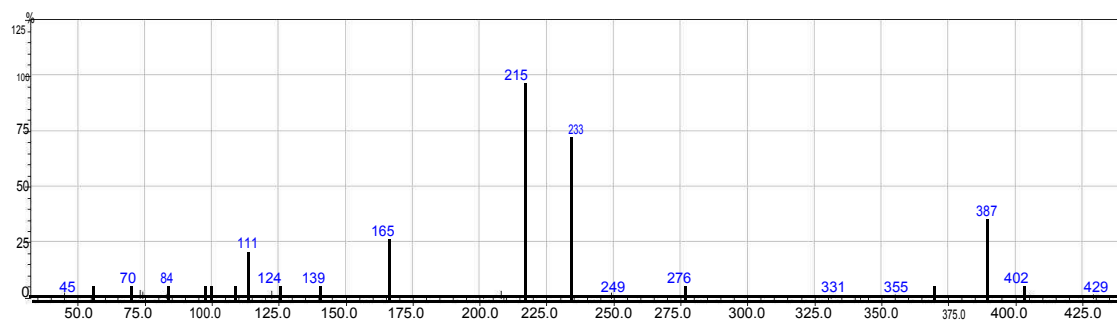
**Figura 30** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 12,30$  min. referente à fragmentação do extrato ativo etanólico de raízes de *Salvinia auriculata* (93 % de similaridade com a biblioteca)

O pico correspondente ao tempo de retenção de 12,30 minutos (figura 30) apresentou fragmentação característica do ácido octadecanóico, já discutido anteriormente.

## Composto 2 – Campestanol

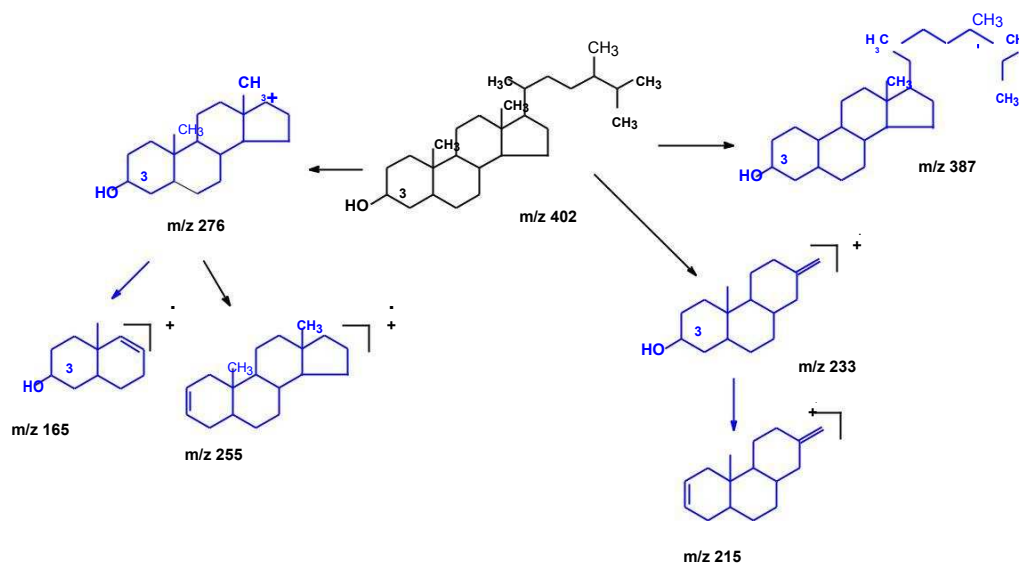


$T_R = 18,94$  min.



**Figura 31** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 18,94$  min. referente à fragmentação do extrato ativo etanólico de raízes de *Salvinia auriculata* (74 % de similaridade com a biblioteca)

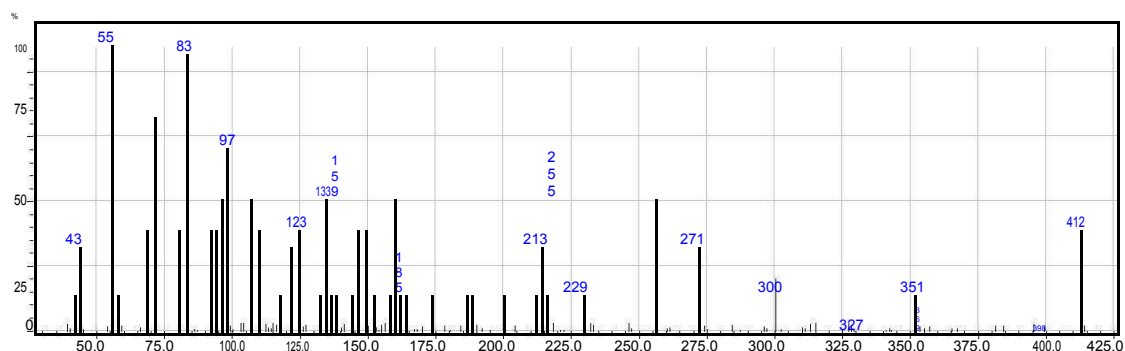
O pico correspondente ao tempo de retenção de 18,94 minutos apresentou fragmentação característica do campestanol (GODBER e XU, 1999). Foram observados íons  $m/z$  402, 387, 276, 233, 215 e 165 (figura 31). As fragmentações obtidas estão de acordo com a fragmentação proposta (figura 32).



**Figura 32** Proposta de fragmentação do composto 2, onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta.

### Composto 3 - Estigmasterol

$T_R = 19,13$  min.

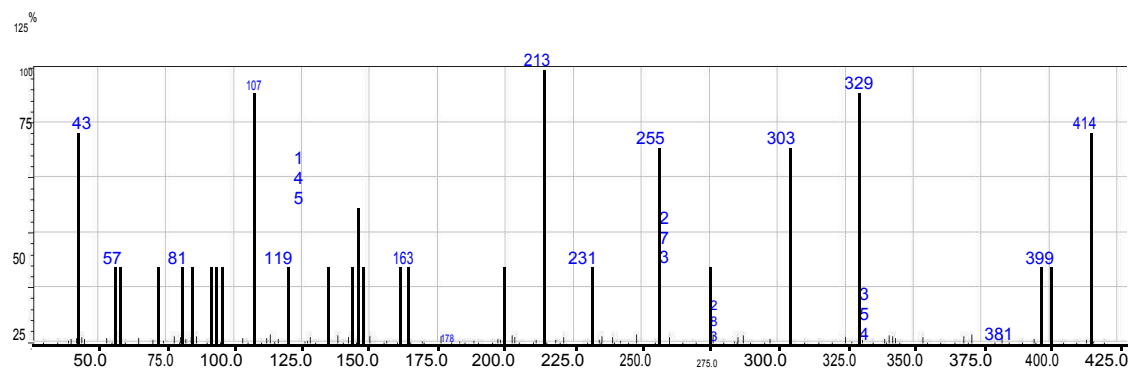


**Figura 33** Espectro de massa obtida do pico  $T_R = 19,13$  min. referente à fragmentação do extrato ativo etanólico de raízes de *Salvinia auriculata* (87 % de similaridade com a biblioteca)

O pico correspondente ao tempo de retenção de 19,13 minutos (figura 33) apresentou fragmentação característica do estigmasterol, já discutido anteriormente.

### Composto 4 - $\beta$ -sitosterol

$T_R = 19,70$  min.

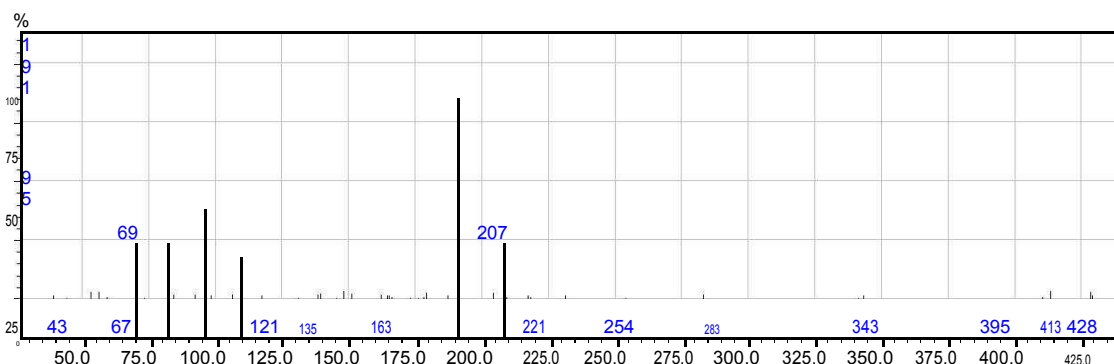


**Figura 34** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 19,70$  min. referente à fragmentação do extrato ativo do etanólico de raízes de *Salvinia auriculata* (79 % de similaridade com a biblioteca)

O pico correspondente ao tempo de retenção de 19,70 minutos (figura 34) apresentou fragmentação característica do  $\beta$ -sitosterol, já discutido anteriormente.

### Composto 5 - Lupanol

$T_R = 22,26$  min.

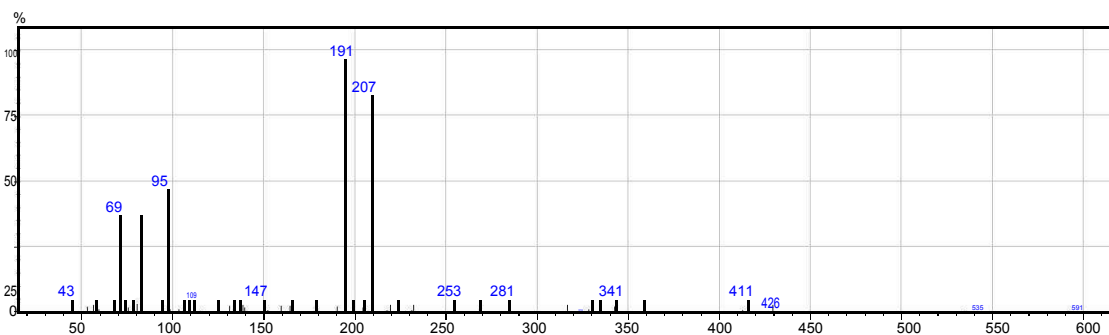


**Figura 35** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 22,26$  min. referente à fragmentação do extrato ativo éter de petróleo de folhas de *Salvinia auriculata* (74 % de similaridade com a biblioteca)

O pico correspondente ao tempo de retenção de 22,26 minutos (figura 35) apresentou fragmentação característica do lupanol, já discutido anteriormente.

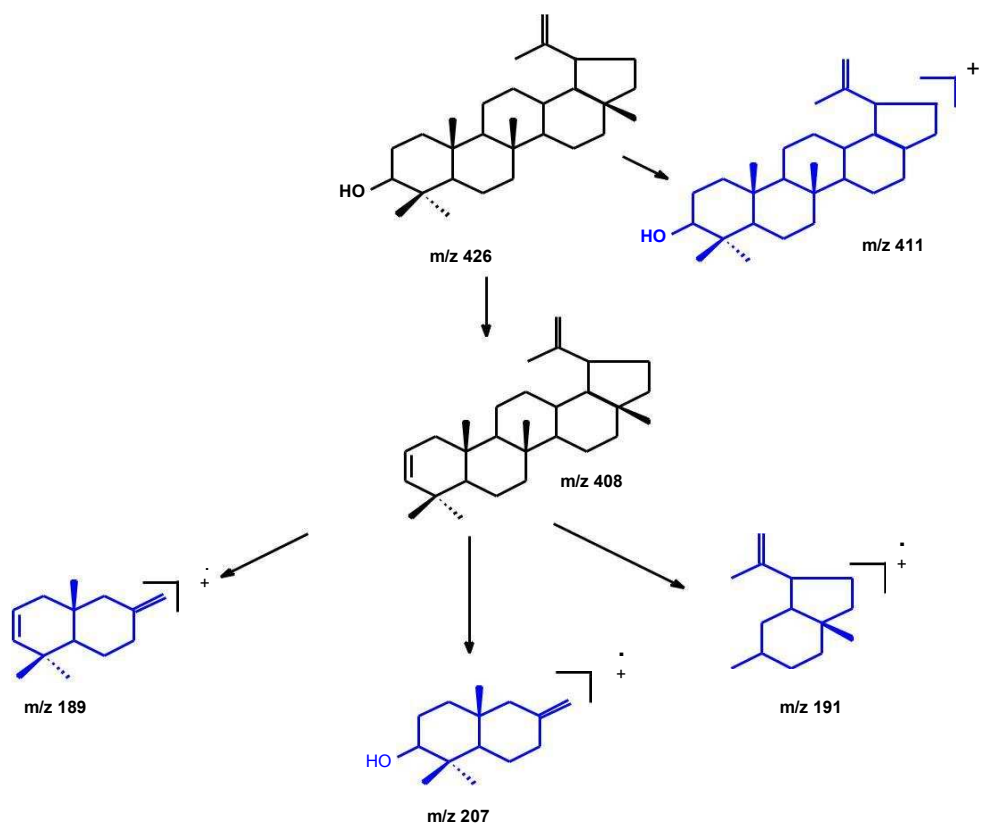
### Composto 6 - Lupeol

$T_R = 22,95$  min.



**Figura 36** Espectro de massa obtido do pico  $T_R = 22,95$  min. referente à fragmentação do extrato ativo etanólico de raízes de *Salvinia auriculata* (74 % de similaridade com a biblioteca)

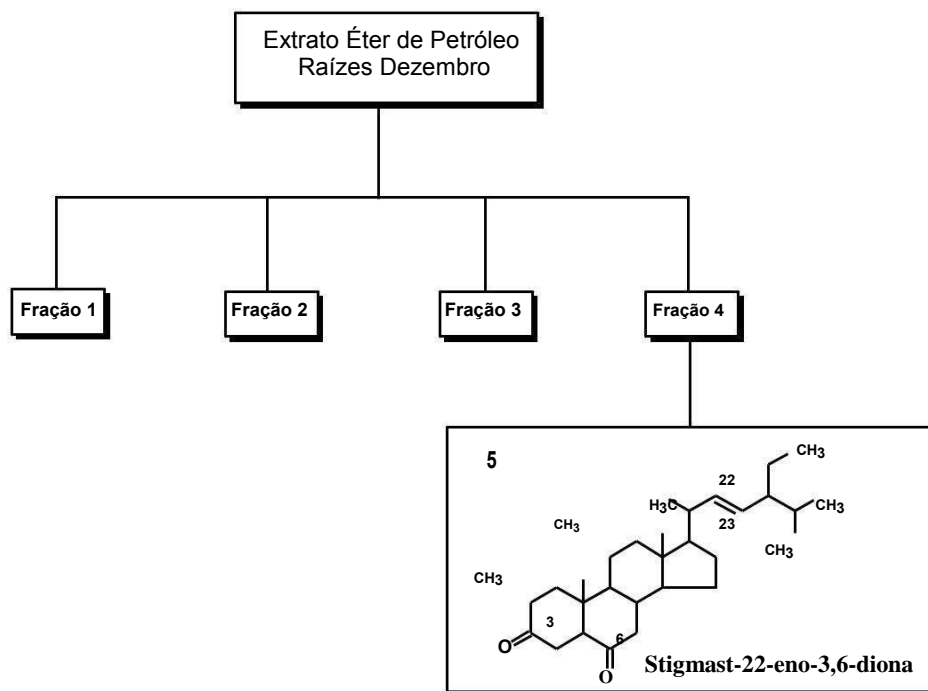
O pico correspondente ao tempo de retenção de 22,95 minutos apresentou fragmentação característica do lupeol (JAIN e BARI, 2010). Os íons  $m/z$  426, 411, 207, 191 e 189 observados no espectro de massas (figura 36) estão de acordo com a fragmentação proposta abaixo (figura 37).



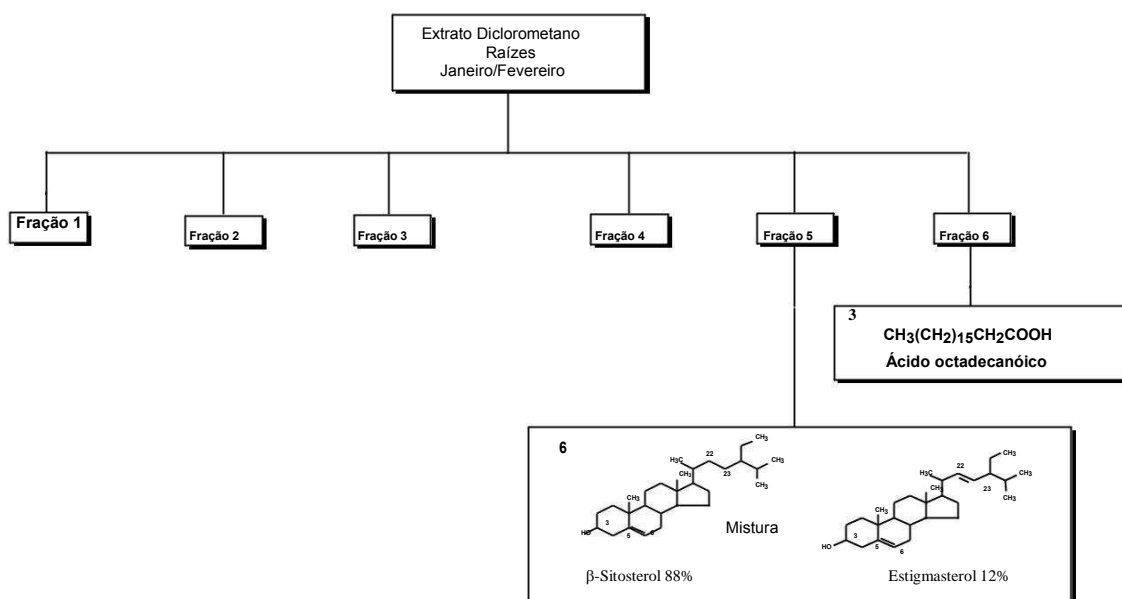
**Figura 37** Proposta de fragmentação do composto **6**, onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta

## 4.2 Compostos orgânicos isolados e identificados

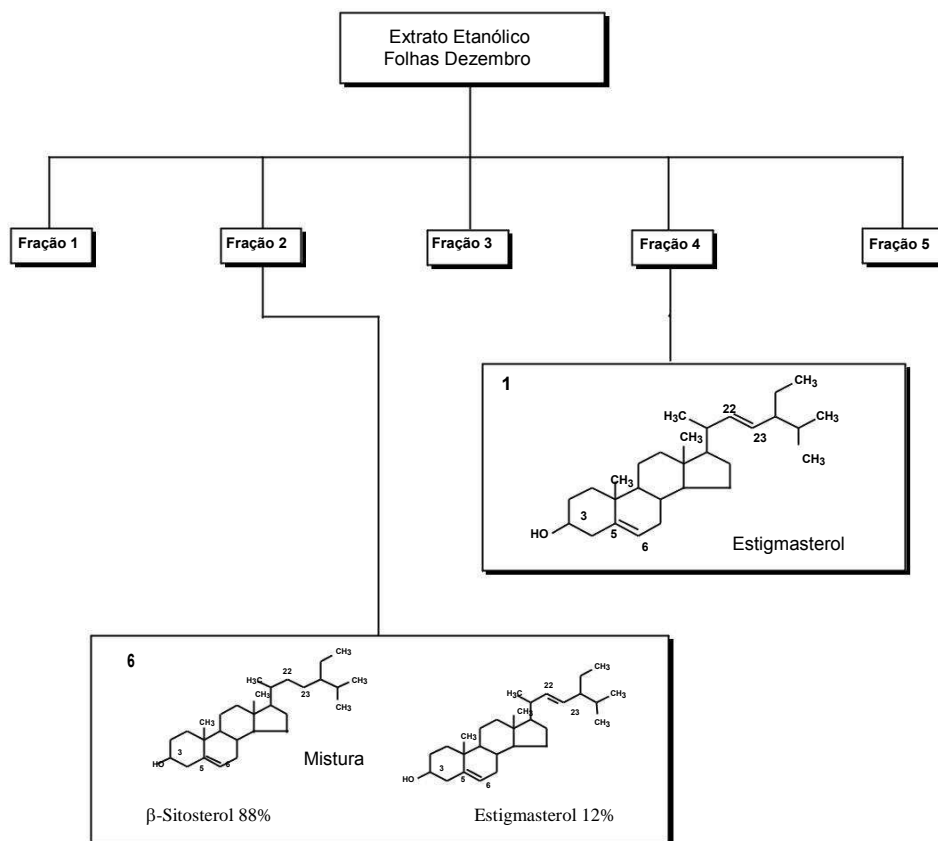
Os compostos isolados a partir dos extratos vegetais obtidos de folhas e raízes de *S. auriculata* foram identificados de acordo com os esquemas abaixo (figuras 38, 39, 40 e 41).



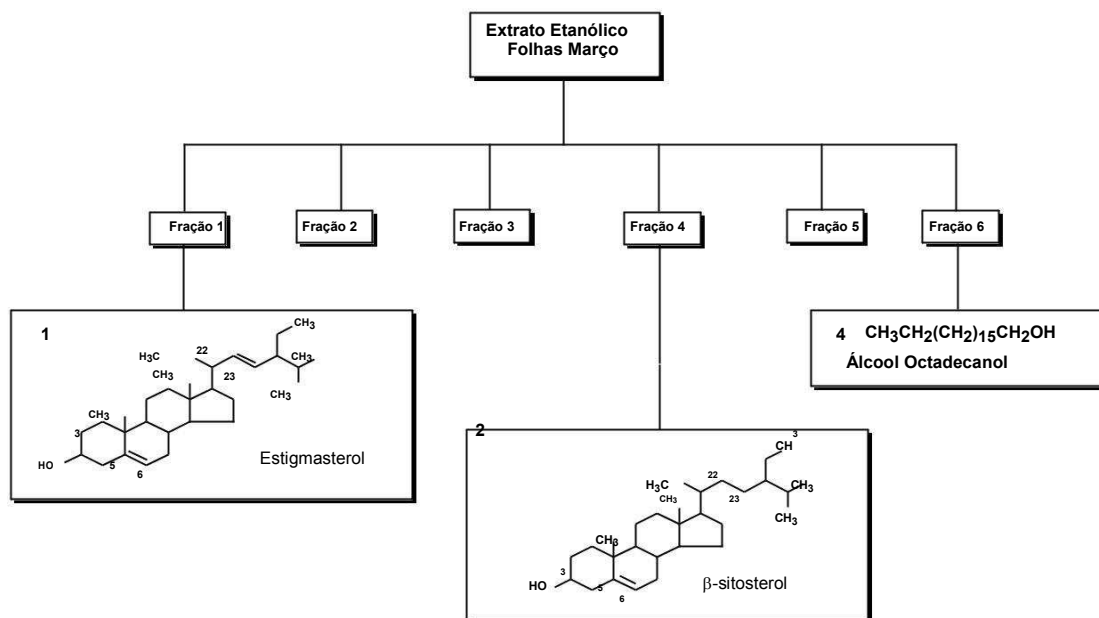
**Figura 38** Substância isolada e identificada a partir do extrato bruto obtido por éter de petróleo em Dezembro de 2012 de raízes de *Salvinia auriculata*



**Figura 39** Substâncias isoladas e identificadas a partir do extrato bruto obtido por diclorometano em Janeiro e Fevereiro de 2013 de raízes de *Salvinia auriculata*

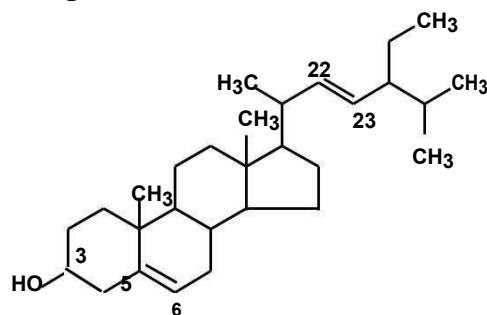


**Figura 40** Substância isolada e identificada a partir do extrato bruto obtido por etanol em Dezembro de 2012 de folhas de *Salvinia auriculata*.

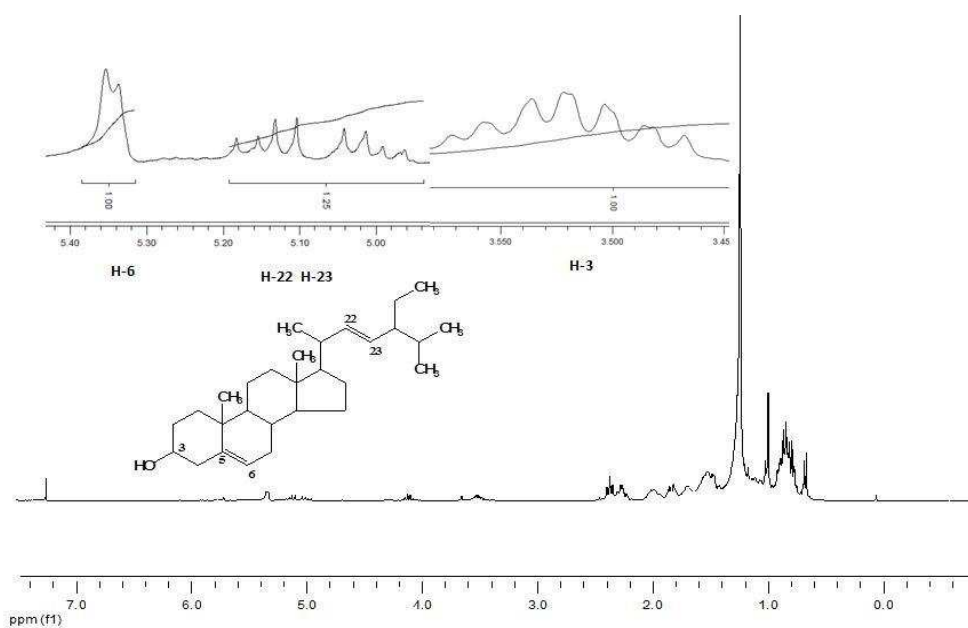


**Figura 41** Substâncias isoladas e identificadas a partir do extrato bruto obtido por etanol em Março de 2013 de folhas de *Salvinia auriculata*.

#### 4.2.1 Composto 1 - Estigmasterol



A estrutura do composto **1** (Pf: 162-166 °C) foi elucidada pela análise espectral de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 42) confirmando a presença de hidrogênios ligados a carbono  $\text{sp}^2$ , atribuídos pelos sinais em  $\delta$  5,34 (d,  $J= 5,1$  Hz) relativo ao hidrogênio H-6 e  $\delta$  5,03 (dd, 1H,  $J= 8,5$  Hz H-22) e  $\delta$  5,12 (dd, 1H,  $J= 15,3$  Hz, H-23) relativos a dupla ligação em trans da cadeia lateral. O multiplete em  $\delta$  3,45-3,60, com integração para um hidrogênio sugere a presença de hidrogênio ligado a carbono carbinólico atribuído ao H-3. Sinais singletos em  $\delta$  0,66-1,40 sugerem a presença de grupos  $\text{CH}_3$  ligados ao carbono quaternário. Os deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  foram confrontados com a literatura (JAIN e BARI, 2010) que permitiram estabelecer a substância como estigmasterol (tabela 1).



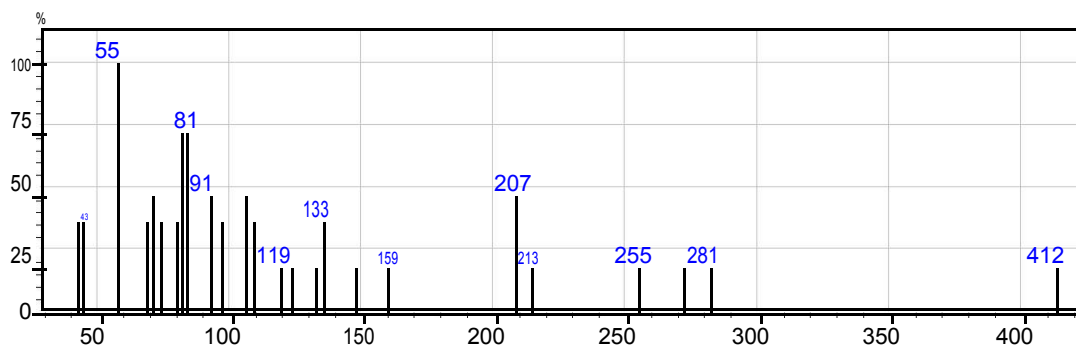
**Figura 42** Espectro obtido através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ ) referente ao estigmasterol.

**Tabela 1** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de hidrogênio obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto estigmasterol

Hidrogênios	Deslocamento químico ( $\delta$ )	
	Composto 1	Estigmasterol*
3	3,45-3,60 (m, 1H)	3,51 (tdd, 1H)
6	5,34 (d, 1H)	5,14 (m, 1H)
22	5,03 (dd, 1H)	4,68 (m, 1H)
23	5,12 (dd, 1H)	5,19 (m, 1H)
Metilênicos (anel esteroidal)	0,60-1,40 (s)	0,69-1,60 (m)

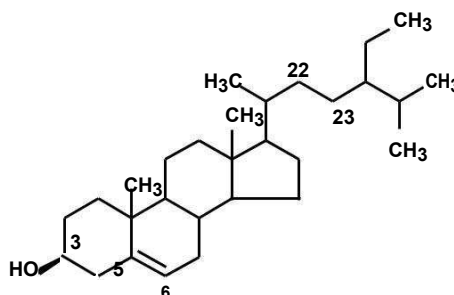
\*JAIN e BARI, 2010

No espectro de massas do composto **1** (figura 43) observaram-se os picos  $m/z$  55; 91; 119; 145; 213; 255; 281 e 412 que são característicos para anel do tipo esteroidal (JAIN e BARI, 2010) corroborando com a proposta inicial pela análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$ . A proposta de fragmentação foi discutida anteriormente.



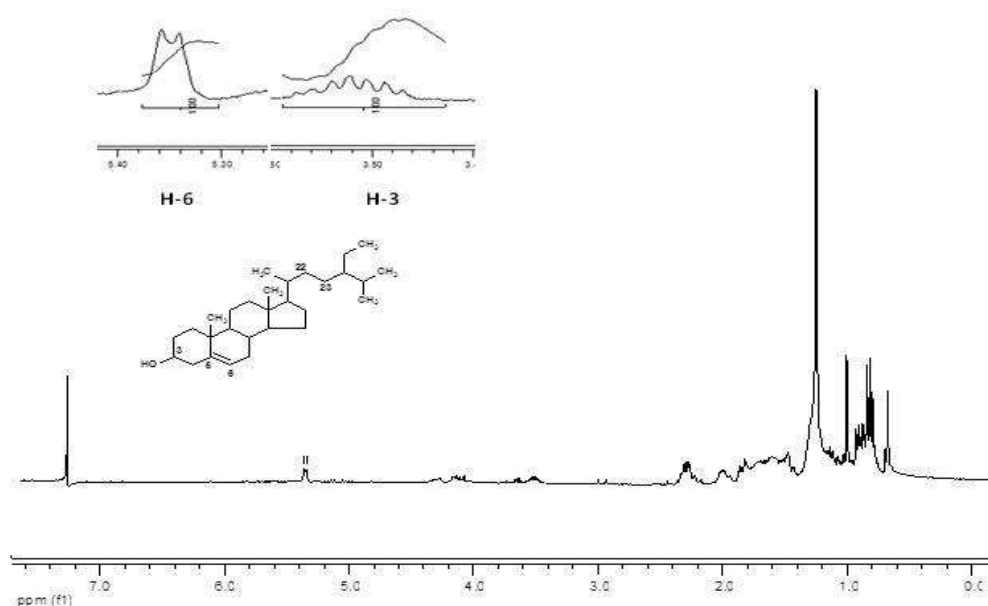
**Figura 43** Espectro de massas referente à fragmentação do estigmasterol

#### 4.2.2 Composto 2 - $\beta$ -sitosterol



A estrutura do composto **2** (Pf: 124-128  $^0\text{C}$ ) foi elucidada pela análise espectral de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 44) onde foram observados sinais em  $\delta$  0,6-1,0 (m) e  $\delta$  1,2-2,0 relativo aos hidrogênios metilênicos do anel esteroidal e a

presença de hidrogênios ligados a carbono  $sp^2$  pelo aparecimento do sinal  $\delta$  5,35 (d,  $J = 5,1$  Hz, H-6) sugerindo tratar-se de uma dupla ligação endocíclica, além de um multipletto em  $\delta$  3,52 com integração para um hidrogênio sugerindo um hidrogênio ligado a carbono carbinólico atribuído ao hidrogênio H-3. Os dados estão de acordo com os dados obtidos por Chaturvedula e Prakash (2012) (tabela 2).



**Figura 44** Espectro obtido pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ ) referente ao  $\beta$ -sitosterol

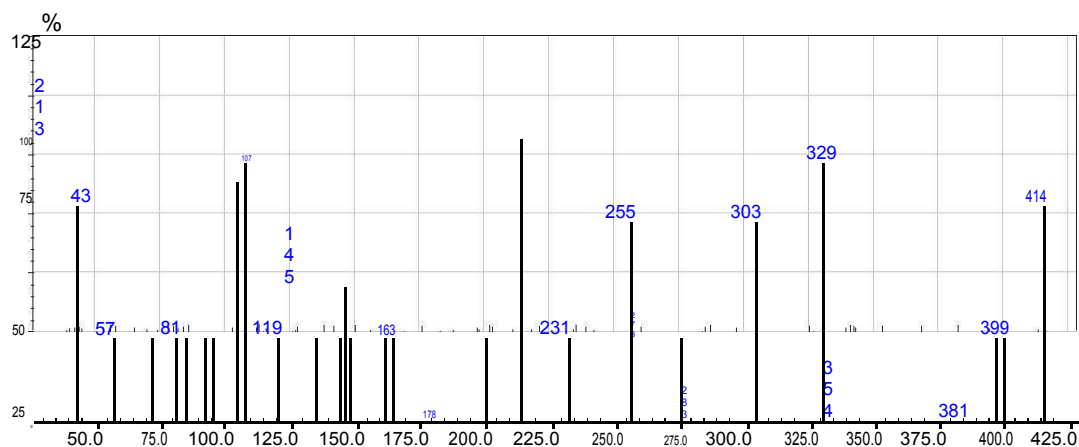
**Tabela 2** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de hidrogênios obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto  $\beta$ -sitosterol

Hidrogênios	Deslocamento químico ( $\delta$ )	
	Composto 2	$\beta$ -sitosterol*
3	3,52 (m, 1H)	3,53 (tdd, 1H)
6	5,35 (d, 1H)	5,36 (m, 1H)
Metilênicos (anel esteroidal)	0,60-1,0/ 1,2-2,0	0,69-1,01 (s)

\*CHATURVEDULA e PRAKASH, 2012

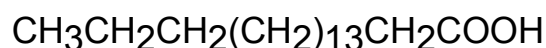
A estrutura do composto **2** também foi elucidada através da análise do espectro de massas (figura 45) onde foram observados íons característicos para anéis esteroidais (JAIN e BARI, 2010) corroborando com a proposta inicial

pela análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$ . A proposta de fragmentação foi discutida anteriormente.

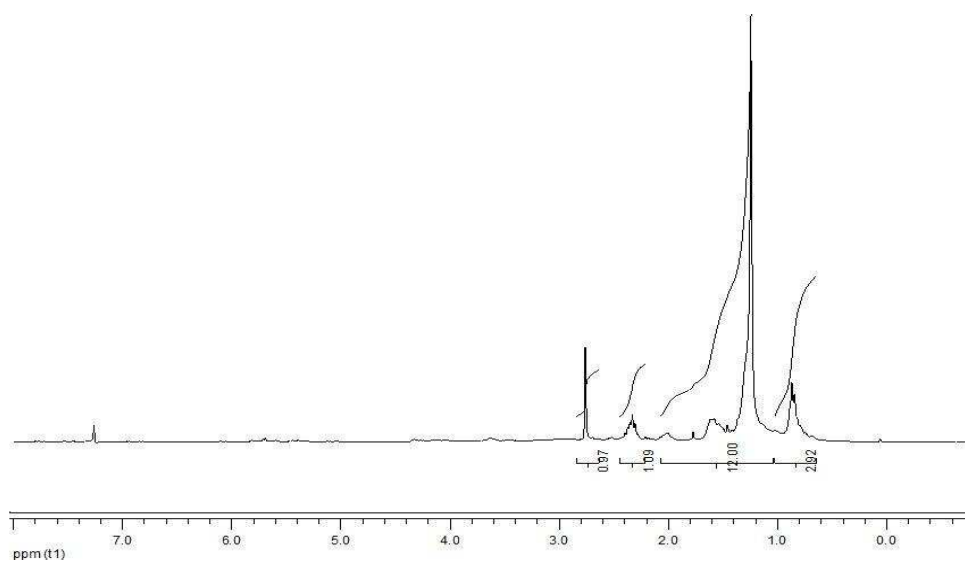


**Figura 45** Espectro de massas referente à fragmentação do  $\beta$ -sitosterol

#### 4.2.3 Composto 3 - Ácido octadecanóico



A estrutura do composto **3** (Pf: 72-74  $^0\text{C}$ ) foi elucidada pela análise espectral de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 46). Observou-se um sinal em  $\delta$  0,87 (3H, t,  $J= 7,7$  Hz) relativo aos hidrogênios da metila terminal;  $\delta$  1,3-1,4 relativo aos hidrogênios dos carbonos metilênicos ligados a cadeia longa; e multipletos em  $\delta$  2,37-2,30 (2H, m) relativos aos hidrogênios  $\alpha$  ligados a carbonila. Os dados obtidos estão de acordo com os dados obtidos por Knothe (2006) e mostrados na tabela 3.



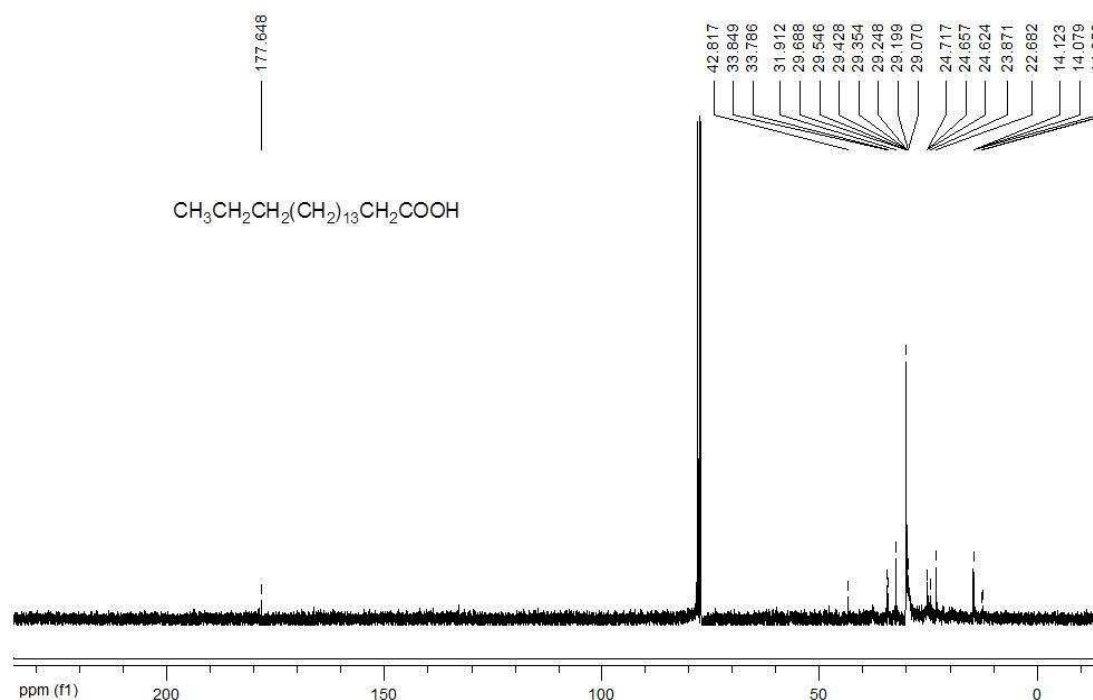
**Figura 46** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ ) referente ao ácido octadecanóico.

**Tabela 3** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de hidrogênios obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto ácido octadecanóico

Hidrogênios	Deslocamento químico ( $\delta$ )	
	Composto 3	Ácido octadecanóico*
Metila terminal	0,87 (t, 3H)	0,88 (t, 3H)
Metilênicos	1,3-1,4	1,3-1,4
Metilênicos (anel esteroidal)	2,3-2,37 (m, 2H)	2,35 (t, 2H)

\*KNOTHE, 2006

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 47), observou-se um sinal em  $\delta$  177,65 relativo à carbonila de ácido graxo. Foram observados também sinais na faixa de  $\delta$  14,06 e 37,24 característicos de carbonos alifáticos de ácidos graxos de cadeia longa. Os deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  foram confrontados com a literatura (KONDAVEETI et al., 2014) que permitiram estabelecer a substância como ácido octadecanóico como mostrado na tabela 4 .



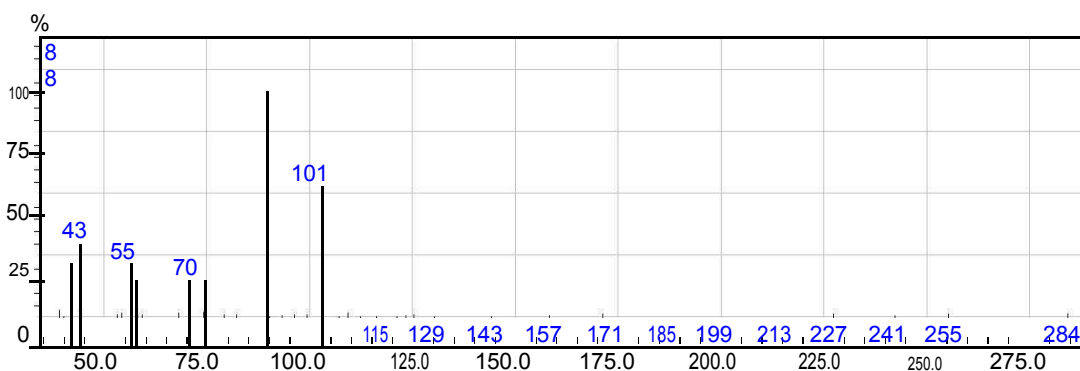
**Figura 47** Espectro obtido pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do carbono ( $^{13}\text{C}$ ) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ ) referente ao ácido octadecanóico.

**Tabela 4** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de carbonos obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto ácido octadecanóico

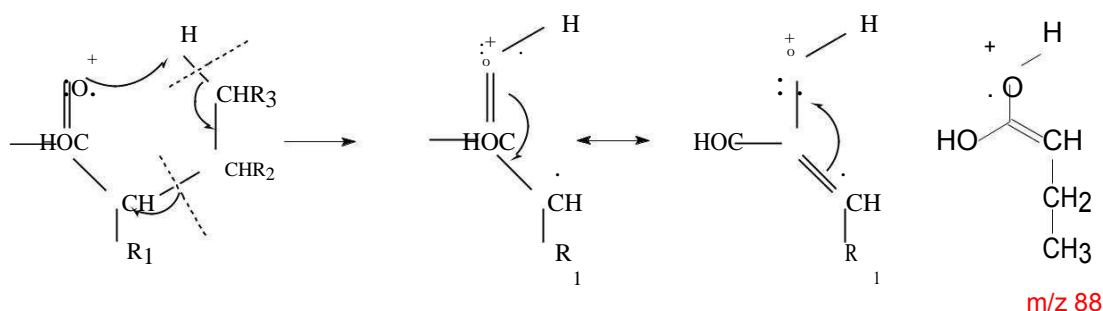
Carbonos	Deslocamento químico ( $\delta$ )	
	Composto 3	Ácido octadecanóico*
Carbonila	177,65	180,6
Alifáticos	14,06-37,24	15,6-39,1

\*KONDAVEETI et al., 2014

No espectro de massas do ácido octadecanóico (figura 48), observou-se o pico de íon molecular  $m/z$  284 e fragmentação característica de hidrocarbonetos de cadeia longa com a perda dos grupos metilênicos sequenciais, além da observação de um fragmento característico  $m/z$  88 que é descrito através da fragmentação proposta por McLafferty (figura 49) (ROCHA et al., 2008).



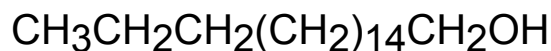
**Figura 48** Espectro de massas referente à fragmentação do ácido octadecanóico.



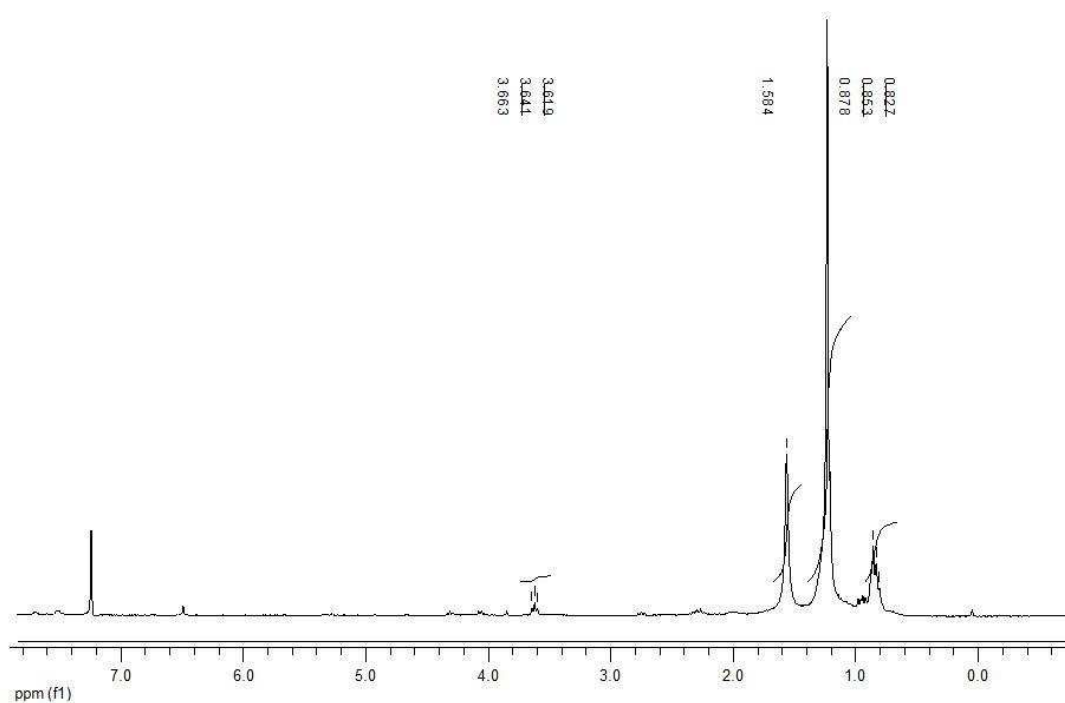
**Figura 49** Rearranjo de McLafferty para o ácido octadecanóico.

De acordo com os dados observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , e de massas pode-se afirmar que o composto **3** se trata de um ácido de cadeia longa, com estrutura provável  $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ .

#### 4.2.4 Composto 4 - Álcool octadecanol



No espectro obtido pelo RMN de  $^1\text{H}$  (figura 50) do composto **4** (Pf: 76-79  $^{\circ}\text{C}$ ) foram observados sinais em  $\delta$  0,87 (3H, t,  $J=7,7$ ) relativos aos hidrogênios da metila terminal;  $\delta$  1,24 (s, H) relativo aos hidrogênios  $\text{CH}_2$ ;  $\delta$  1,58 (s, 1H) sinal relativo ao hidrogênio da hidroxila e 3,66 (2H, t  $J=6,60$ ) relativo ao grupo metilênico ligado a hidroxila. Os deslocamentos químicos obtidos são compatíveis com os dados da literatura mostrados na tabela 5.



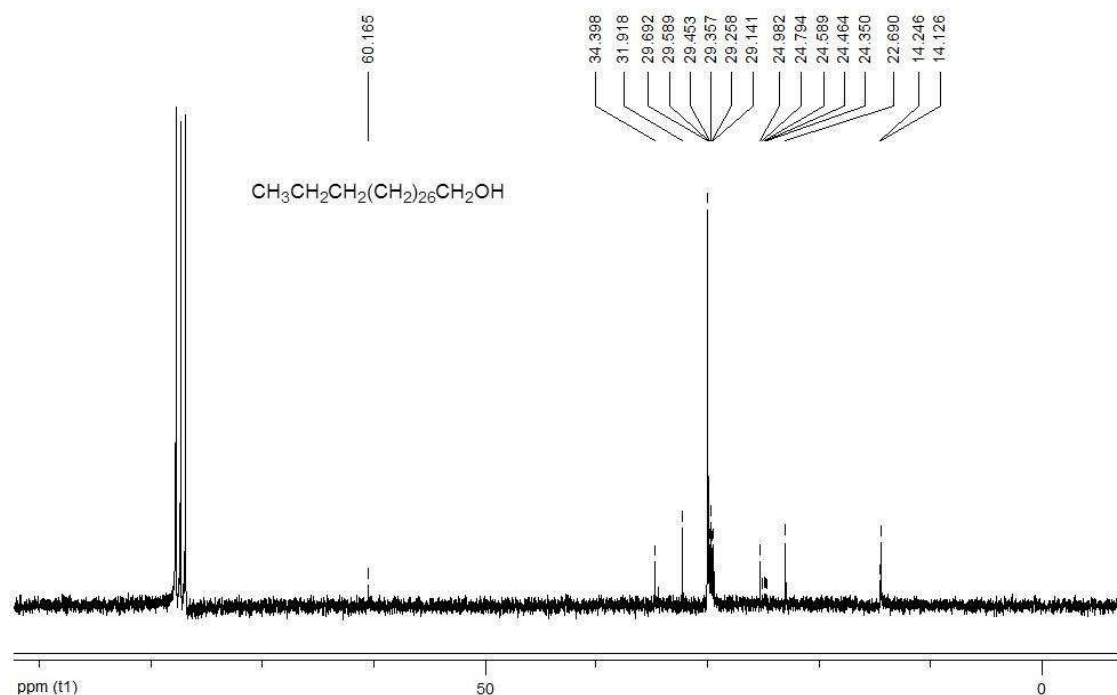
**Figura 50** Espectro obtido pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ ) referente ao octadecanol

**Tabela 5** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de hidrogênios obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto octadecanol

Hidrogênios	Deslocamento químico ( $\delta$ )	
	Composto 4	Octadecanol*
Metila terminal	0,87 (t, 3H)	0,88 (t, 3H)
Metilênicos	1,24	1,37 (s, 1H)
Hidroxila	1,58 (s, 1H)	1,98 (s, 1H)
CH <sub>2</sub> ligado a OH	3,66 (t, 2H)	3,00 (t, 2H)

\*KNOTHE, 2006

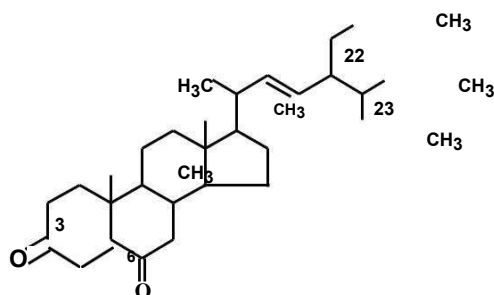
No espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 51) foi observado um sinal em  $\delta$  60,2, re-lativo ao carbono carbinólico e um sinal em  $\delta$  31,9 relativo ao carbono  $\beta$  em relação à hidroxila. Os deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup>C foram confrontados com a literatura (GUNSTONE, 1993) que permitiram estabelecer a substância como octadecanol como mostrado na tabela 6.



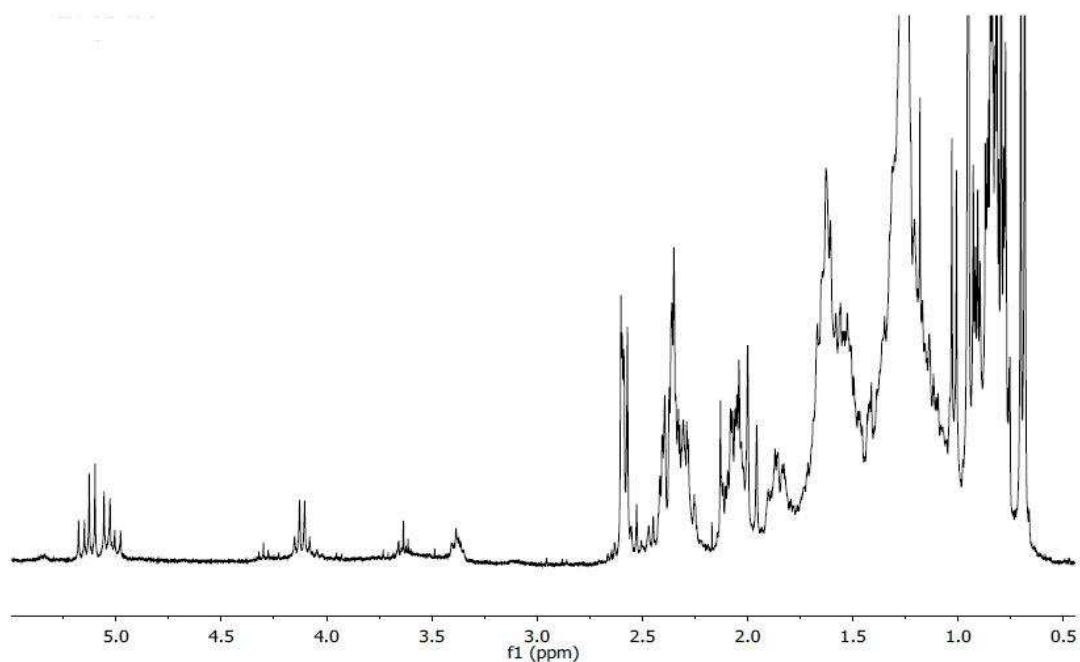
**Figura 51** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de carbono <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>  $\delta$ ) referente ao octadecanol



#### 4.2.5 Composto 5 - Estigmast-22-eno-3,6-diona



A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **5** (figura 54) permitiu observar dois dupletos duplos centrados em  $\delta$  5,20 (dd,  $J = 15,1, 8,4$  Hz, H-22) e 5,08 (dd,  $J = 15,1, 8,4$  Hz, H-23) referentes aos hidrogênios olefínicos, típicos de substituintes de cadeias laterais de esteroides. A natureza da ligação dupla foi determinada como sendo *trans* a partir do valor da constante de acoplamento  $J = 15,10$  Hz referentes aos hidrogênios H-22 e H-23. Os deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  foram confrontados com a literatura que permitiram estabelecer a substância como estigmast-22-eno-3,6-diona como mostrado na tabela 7.



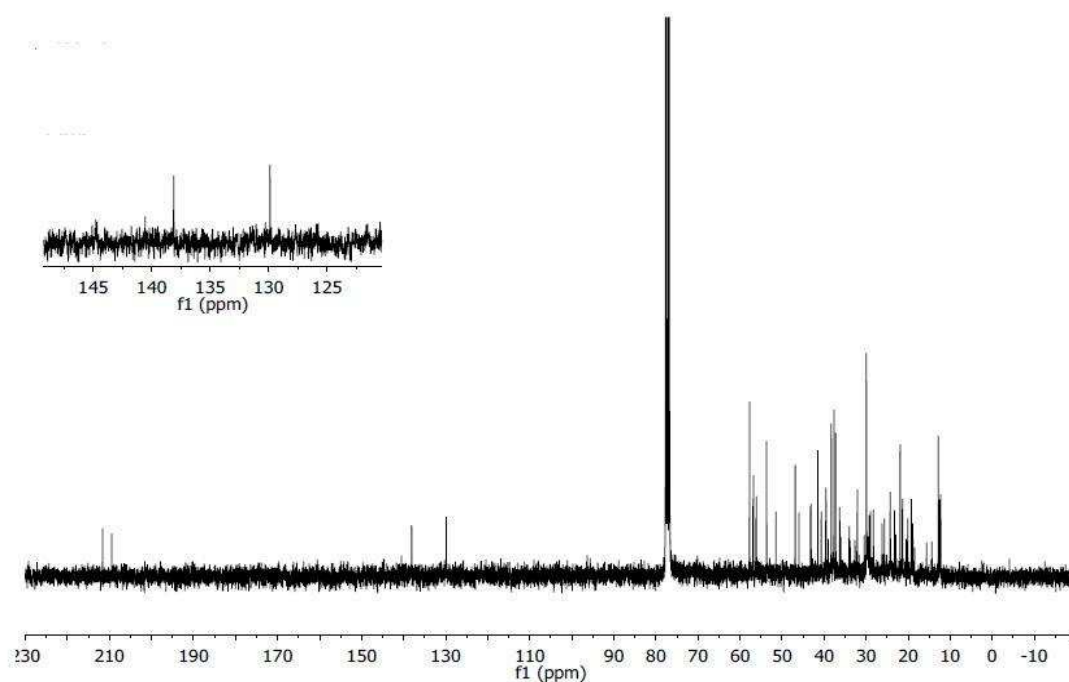
**Figura 54** Espectro obtido através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ ) referente ao estigmast-22-eno-3,6-diona

**Tabela 7** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de hidrogênios obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto estigmast-22-eno-3,6-diona

Hidrogênios	Deslocamento químico ( $\delta$ )	
	Composto 5	Estigmast-22-eno-3,6-diona*
H-22	5,20 (dd, 1H)	5,15 (dd, 1H)
H-23	5,08 (dd, 1H)	5,04 (dd, 1H)

\*FERNANDEZ et al., 1983

No espectro de  $^{13}\text{C}$ , (figura 55) observou-se a presença de dois sinais em  $\delta$  129,8 e 138,1 característicos dos carbonos olefínicos C-22 e C-23, respectivamente. Além disso, os sinais observados em  $\delta$  211,7 e 209,5 confirmaram a presença de dois carbonos quaternários relativos às carbonilas em C-3 e C-6, respectivamente. Os deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  foram confrontados com a literatura que permitiram estabelecer a substância como estigmast-22-eno-3,6-diona como mostrado na tabela 8.



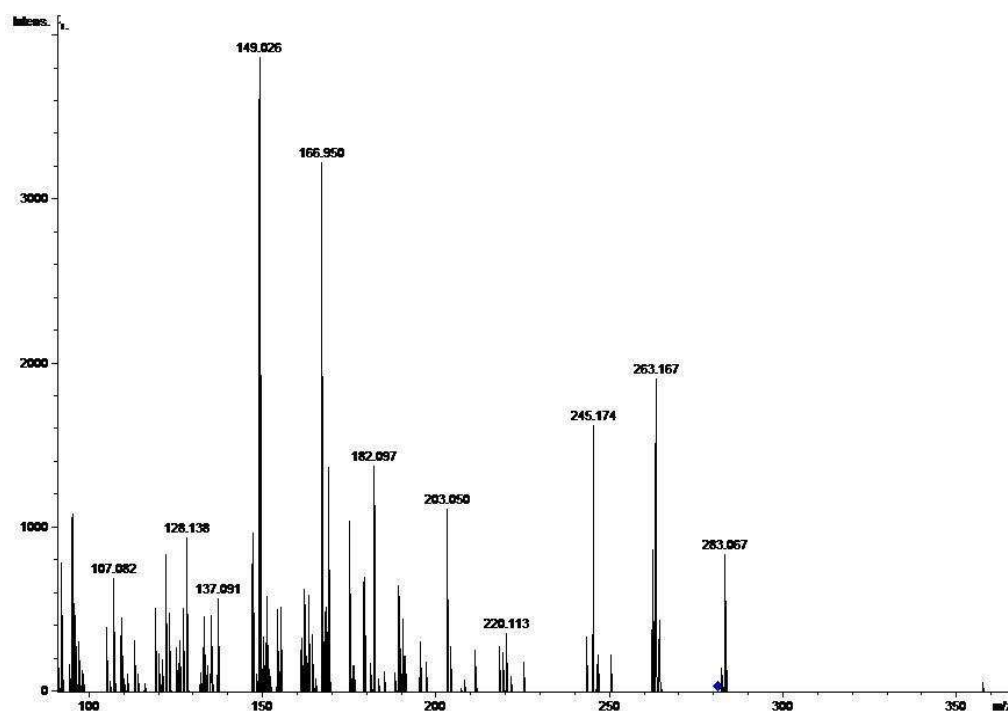
**Figura 55** Espectro obtido através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de carbono  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ ) referente ao estigmast-22-eno-3,6-diona

**Tabela 8** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de carbonos obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o composto estigmast-22-eno-3,6-diona

Carbonos	Deslocamento químico ( $\delta$ )	
	Composto 5	Estigmast-22-eno-3,6-diona*
C-3	211,7	210,6
C-6	209,5	202,6
C-22	129,8	129,5
C-23	138,1	138,5

\* FERNANDEZ et al., 1983

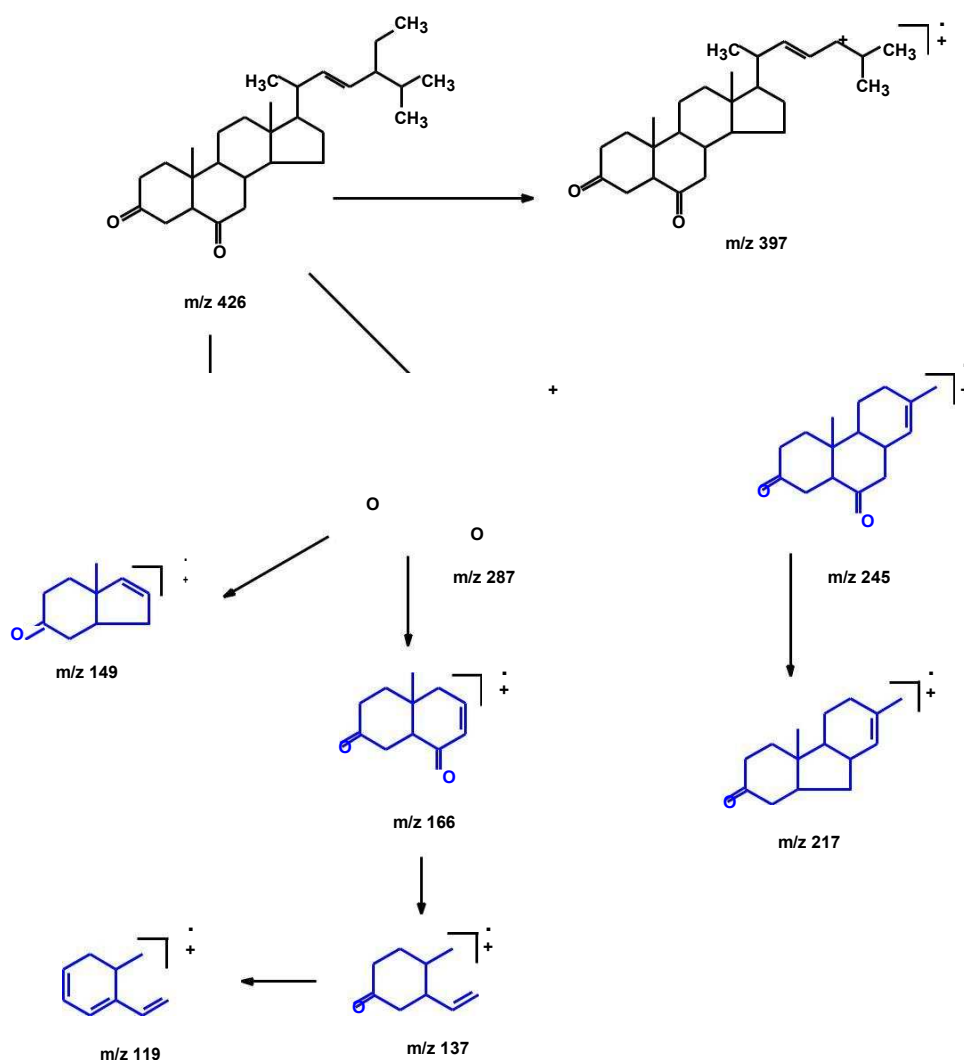
A dificuldade da caracterização do composto pela análise dos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  veio a ser resolvida a partir do seu espectro de massas ( $m/z^+ = 426$ ) (figura 56) que apresentou fragmento em  $m/z$  166 e 245 que sugerem a presença de dois grupos carbonílicos, segundo GEORGES et al., 2006 e que corrobora com os dados observados.



**Figura 56** Espectro de massas referente à fragmentação do estigmast-22-eno-3,6-diona.

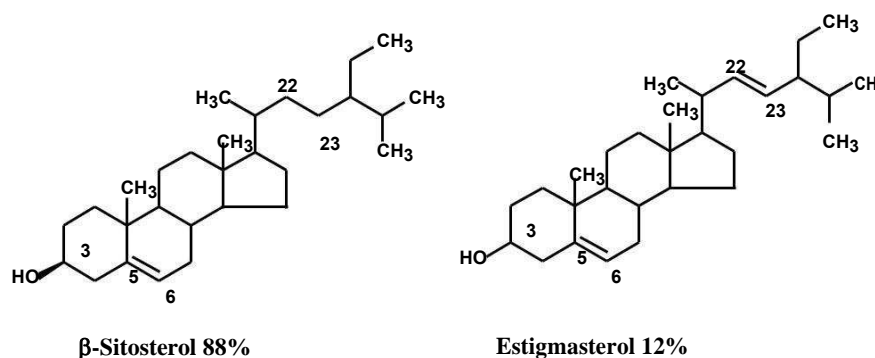
De acordo com os dados observados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , massas e a proposta de fragmentação (figura 57), além da comparação dos dados obtidos com os existentes na literatura (FERNANDÉZ et al., 1983; GEORGES et al., 2006; LIMA et al., 2013) conclui-se que o composto **5** é o estigmast-22-eno-3,6-diona.

Lima e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana de compostos orgânicos isolados de *S. auriculata* e apenas o estigmast-22-eno-3,6-diona apresentou atividade com halos de inibição em torno de 22,0 mm contra cepas de *S. aureus*.



**Figura 57** Proposta de fragmentação para o estigmast-22-eno-3,6-diona, onde fragmentos (em azul) corroboram com a estrutura proposta.

#### 4.2.6 Composto 6 - Mistura dos compostos $\beta$ -sitosterol e estigmasterol

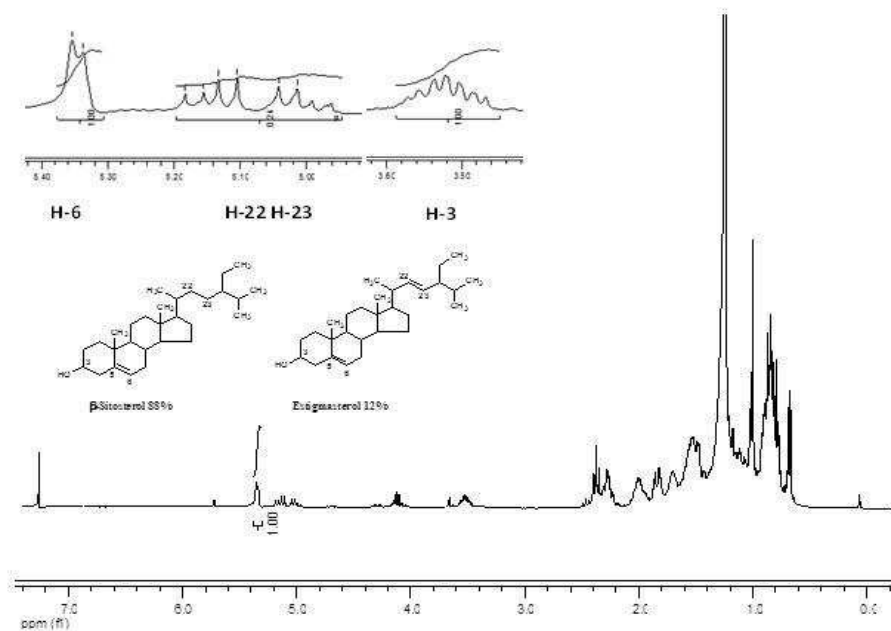


Os compostos da mistura foram elucidados pela análise espectral de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 58), onde foram observados sinais em  $\delta$  0,6-1,0 (m) e 1,2-2,0 relativo aos hidrogênios metilênicos do anel esteroidal e cadeias laterais. A presença de sinais de hidrogênios ligados a carbono  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  5,35 (d,  $J = 5,1$  Hz, H-6) sugere tratar-se de uma dupla ligação endocíclica do esqueleto carbônico de ambos os compostos. Mas, os sinais de dois duplos dupletos observados em  $\delta$  5,01 (dd,  $J = 15,1$  e  $8,5$  Hz, H-22) e  $\delta$  5,12 (dd  $J = 15,1$  e  $8,5$  Hz, H-23) correspondem aos hidrogênios olefínicos típicos de cadeias laterais de esteróides. A natureza da ligação dupla foi determinada como sendo *trans* a partir do valor da constante de acoplamento  $J = 15,10$  Hz referentes aos hidrogênios H-22 e H-23.

A observação de um multiplete centrado em  $\delta$  3,52 com integração para um hidrogênio sugere a presença de hidrogênio ligado a carbono carbinólico atribuído ao hidrogênio H-3.

Como os compostos  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol se diferem entre si pela presença de uma dupla ligação na cadeia lateral do composto estigmasterol, o que se leva a crer que os dois compostos estão em mistura é a intensidade do sinal para hidrogênio H-6. Observou-se pelo espectro de  $^1\text{H}$  que a intensidade relativa dos sinais para os hidrogênios H-6 é de 1,0 ppm ( $\beta$ -sitosterol + estigmasterol) e a intensidade relativa para os hidrogênios H-22 e H-23 (estigmasterol) é de 0,24 ppm, sugerindo-se tratar-se de uma mistura dos dois fitoesteróides. Como a metade de 0,24 representa um hidrogênio da molécula de estigmasterol, subtraindo-se esse valor da intensidade relativa do hidrogênio H-6 do  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, obtém-se a intensidade relativa

correspondente a um hidrogênio do  $\beta$ -sitosterol. Ou seja,  $\beta$ -sitosterol 88% e estigmasterol 12%.



**Figura 58** Espectro obtido através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ ) referente aos compostos  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol

### 4.3 Dados Espectrais dos Compostos Isolados

#### Stigmast-22-eno-3,6-diona

Pf: 187-189 ° C;

IV (KBr): 2925, 2853, 1715  $\text{cm}^{-1}$ ;

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,74 (3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 0,82 (3H, 26- $\text{CH}_3$ ), 0,84 (3H, 29- $\text{CH}_3$ ), 0,89 (3H, 27- $\text{CH}_3$ ), 0,99 (3H, 19- $\text{CH}_3$ ), 1,07 (3H, 21- $\text{CH}_3$ ), 1,20 (1H, 28-H), 1,46 (1H, 28-H), 1,56 (1H, 24-H), 1,60 (1H, 25-H), 2,08 (1H, 20-H), 5,08 (dd,  $J= 15,12$  8,4, 1H, 23-H), 5,20 (dd,  $J= 15,10$ , 8,4 1H, 22-H);

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12,20 (C-18), 12,56 (C-29), 18,93 (C-26), 21,40 (C-21), 21,89 (C-27), 26,20 (C-28), 32,64 (C-25), 40,68 (C-20), 51,47 (C-24), 129,80 (C-23), 138,10 (C-22), 209,50 (C-3), 211,70 (C-6);

EM: m/z (%): 397 (7); 303 (3); 315 (13); 259 (3); 245 (10); 217 (5); 190 (7); 175 (3); 169 (85); 149 (100); 137 (6) e 119 (25).

#### $\beta$ - sitosterol

Pf: 124-128 ° C; (lit. 136 – 140 °C);

IV (KBr): Não obtido;

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5,35 (d,  $J = 5,1$  Hz, H-6); 3,52 (m, 1H, H-3); 0,6-1,0 (m,  $\text{CH}_3$ ) e 1,2-2,0 (m,  $\text{CH}_3$ );

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): não obtido;

EM: m/z (%): 43 (75); 107 (90); 119 (55); 145 (60); 207 (45); 213 (100); 255 (60); 273 (50);  $\text{M}^+$  414 (75).

### Estigmasterol

Pf: 162,0 – 166,0 °C (lit. 174 – 176 °C);

IV (KBr): Não obtido;

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5,34 (d, J = 5,1 Hz, H-6); 5,03 (dd, 1H, J= 15,1 Hz 8,5 Hz H-22) e 5,12 (dd, 1H, J= 15,3 Hz 8,4 Hz H-23); 3,45-3,60 (m, 1H, H-3); 0,66-1,40 (m, CH<sub>3</sub>);

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): não obtido;

EM: m/z (%): 43 (35); 55 (100); 69 (55); 81 (70); 91 (45); 119 (30); 145 ( ); 207 (50); 213 (20); 255 (30); 281 (30); M<sup>+</sup> 412 (15).

### Ácido Octadecanóico

Pf: 72-74 ° C; (lit. 69,6 °C);

IV (KBr): Não obtido;

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,87 ( 3H, t, J= 7,7); 1,24 (30 H, s); 2,37-2,30 (2H, m);

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14,07 (C-18); 22,6 (C-17); 29,1(C-16-C-3); 42,8 (C-2); 177,6 (C-1);

EM: m/z (%): 43 (40); 55 (30); 70 (25); 83 (10); 88 (100); 101 (65); 115 (10); 157 (15); 241 (5); 255 (2); M<sup>+</sup> 284 (1).

### Álcool Octadecanol

Pf: 76-79° C;

IV (KBr): Não obtido;

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,87 ( 3H, t, J= 7,7); 1,24 (40H, s); 1,58 (2H, m); 3,66 (3H, t, J= 6,60);

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14,1 (C-30); 22,7 (C-29); 29,5 (C-27); 29,6 (C-26); 29,7 (C-3 a 26); 31,9 (C-2); 60,2 (C-1);

EM: m/z (%): 41 (75); 43 (80); 55 (100) 57 (95); 69 (80); 83 (95); 97 (75); 111 (45); 125 (20); 139 (1). M<sup>+</sup> ausente.

## 5 CONCLUSÕES

- Foram isolados e identificados cinco compostos orgânicos, sendo a grande maioria fitoesteróis.
- Através da análise dos principais picos de fragmentação dos extratos orgânicos ativos (folhas e raízes – éter de petróleo e raízes etanol) foram identificados nove compostos. Dentre eles, o ácido octadecanóico, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol foram isolados e identificados em outros extratos brutos de *S. auriculata*.
- O ácido octadecanóico, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol foram identificados nos extratos mais ativos.
- Os compostos isolados corroboraram com a atividade antibacteriana apresentada pela planta aquática.

## 6 REFERÊNCIAS

AL-FATIMI, M.; WURSTER, M.; SCHRODER, G.; LINDEQUIST, U. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.657-666, 2007.

BERENBAUM, M.R. What is synergy? **Pharmacological Reviews**. N.41, 1989.

CHATURVEDULA, V.S.P.; PRAKASH, I. Isolation of Stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. **International Current Pharmaceutical Journal**, 1(9): 239-242, 2012.

LIMA, S.; DIAZ, G.; DIAZ, M.A.N. Antibacterial Chemical Constituent and Antiseptic Herbal Soap from *Salvinia auriculata* Aubl. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

FERNANDEZ, M.I.; PEDRO, J.R., SEOANE, E. Constituents of a hexane extract of *Phoenix dactylifera*," **Phytochemistry**, vol. 22, no. 9, pp. 2087–2088, 1983.

FRVE, L. J. **Phytosterols from the seed of *Parkia speciosa***. A dissertation submitted in partially fulfillment of the requirements for the award of degree of Bachelor of Applied Science (Honours) in Industrial Chemistry. Faculty of Industrial Sciences and Technology Universiti Malaysia Pahang, 2012.

GEORGES, P.; SYLVESTRE, M.; RUEGGER, H.; BOURGEOUS, P. Ketosteroids and hydroxyketosteroids, minor metabolites of sugarcane wax. **Steroids**, vol. 71, no. 8, pp. 647–652, 2006.

GONÇALVES, M.S. **Constituintes químicos de *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2011.

JAIN, P.S.; BARI, S.B. Isolation of lupeol, stigmasterol e campesterol from petroleum ether extract of woody stem of *Wrightia tinctoria*. **Asian Journal of Plant Science** 9(3): 163-167, 2010.

KNOTHE, G. <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy of fatty acids and their derivatives. **AOCS Lipid Library**. Disponível em: [www.lipidlibraryaocs.org/2006](http://www.lipidlibraryaocs.org/2006). Acesso em: 15 de Março de 2016.

KONDAVEETI, S.; CHEJARA, D.R.; SIDDHANTA, A.K. Synthesis of self-assembly of agarose-fatty acid ester nanoparticles. **Indian Journal of Chemistry**. 2014.

MABRY, T. J., MARKHAM, K. R. THOMAS. M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**, Springer-Verlag, 1970.

MANRIQUEZ-TORRES, J.J. The Antibacterial Metabolites and Proacacipetalin from *Acacia cochliacantha*. **J. Mex. Chem. Soc**, 51(4), 228-231, 2007.

OLIVEIRA, S.C.C.; GUALTIERI, S.C.J.; DOMINGUEZ, F.A.M.; MOLINILLO, J.M.G; MONTOYA, R.V. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. **Acta Botanica Brasilica** 26(3): 607-618. 2012.

ROCHA, D.Q.; BARROS, K.; COSTA, E.J.C.; SOUZA, K.S.; PASSOS, R.R.; JUNIOR, V.F.V.; CHAAR, J.S. Determinação da matéria-prima utilizada na produção do biodiesel adicionado ao diesel mineral através de monitoramento seletivo de íons. v. 31, No. 5, 1062-1066, 2008.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.

SAEIDNIA, S.; MANAYI, A.; GOHARI, A.R.; ABDOLLAHI, M. The Story of Beta-sitosterol- A Review. **European Journal of Medicinal Plants**, 4(5): 590-609, 2014.

SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.A.; CONCEIÇÃO, G.M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena** 6, 2010.

SCHUCH, L.F.D; **Plantas medicinais em atenção primária veterinária: atividade antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e a dermatófitos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2008.

SHARMA, R. K. Phytosterols: Wide-spectrum antibacterial agents. **Bioorganic Chemistry** 21: 49-60. 1993.

SOUZA, T.M.; SANTOS, L.E.; MOREIRA, R.R.D.; RANGEL, V.L.B.I. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15(1): 36-38, Jan./Mar. 2005.

VELDE, V.V.; LAVIE, D.; ZELNIK, R.; MATIDA, A.K.; PANIZZA, S. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. **Journal of Chemical Society**, Perkin Transactions 1, p. 2697-2700, 1982.

## ANEXOS



## VII SIMPOSIO INTERNACIONAL DE QUIMICA DE PRODUCTOS NATURA- LES Y SUS APLICACIONES

BiNat

### ANTIMICROBIAL PROPERTY OF 3,6-DIKETOSTEROID FROM *SALVINIA AURICULATA*

Sâmia Lima<sup>a</sup>, Gaspar Diaz<sup>b</sup>, Marisa Alves Nogueira Diaz<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs s/n 36570-000, Viçosa-MG, Brazil. marisanogueira@ufv.br

<sup>b</sup>Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brazil

#### Introduction

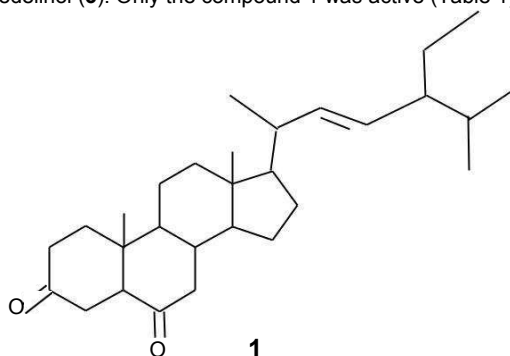
*Salvinia auriculata* (Salviniaceae), also known as eared water moss, is aquatic plant native from South America and is commonly found in sweet watered lakes. Studies have shown the potential of *S. auriculata* in the remediation of polluted water contaminated with heavy metals. However, studies have not yet investigated their chemical compounds as antimicrobial agents. An earlier study in our research group evaluated for the first time the antimicrobial potential of extracts obtained from the roots and leaves of this plant in comparison on Gram-positive bacteria associated to bovine mastitis. This disease, an inflammatory response in cow's udder, is the main infecto-contagious disease affecting dairy cattle. This study aims to isolate the compounds responsible for antibacterial activity.

#### Material and methods

*S. auriculata* was collected in a pond located at Recanto das Cigarras, Federal University of Viçosa, Minas Gerais State, Brazil, from December to February, 2011. An authenticated voucher (VIC 32.122) was deposited in the herbarium of the University. The material was exhaustively washed in water and the roots and leaves were separated. The plant parts were dried at 40 °C for 24 h in an air circulation oven, and 800 g of roots were extracted using *n*-hexane for 2 days and repeated at least five times. Extract was concentrated to dryness under reduced pressure and stored at 4 °C. The extract was dissolved in a minimum amount of hexane and was adsorbed on silica gel (70–230 mesh). It was subjected to a silica gel column using an *n*-hexane mobile phase with polarity gradually increased by addition of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, yielding fifty eight fractions. These fractions were submitted to biological assay using *S. aureus* strain 4127 as an reference microorganism, the positive fraction ten was submitted to a preparative TLC eluted with petrol/EtOAc 8:2 permitting the isolation of **1** (6.5 mg), **2** (27.0 mg) and **3** (5.5 mg) compounds. The bacterial strains used in this study were kindly provided by Embrapa/CNPGL, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, and were isolated from animals with mastitis manifestation. Hole-plate diffusion assay was performed to test for antibacterial activity of the fractions and compounds.

#### Results

Purification of the active fraction obtained from hexane extract of *S. auriculata* roots led to the isolation of 2 steroids and 1 triterpene (Figure 1). The compounds isolated were characterized as stigmast-22-ene-3,6-dione (**1**), stigmasterol (**2**) and Friedelinol (**3**). Only the compound **1** was active (Table 1)



Stigmast-22-ene-3,6-dione

Table 1 - Antibacterial activity of compound 1.

S. aureus	Compound 1	Positive Control <sup>b</sup>	DMSO
582	3.0±0.58	17.0±0.58	0.00
680	3.0±0.60	18.0±0.60	0.00
2221	6.0±0.33	17.0±0.58	0.00
4006	7.0±0.67	17.0±0.58	0.00
4127	6.0±0.58	17.0±0.50	0.00

**Acknowledgements:** Fapemig for Financial support (CEX - APQ-00454-11) and CAPES.



## VII SIMPOSIO INTERNACIONAL DE QUIMICA DE PRODUCTOS NATURA- LES Y SUS APLICACIONES

BioNat

### SALVINIA AURICULATA AN ALTERNATIVE TO CONTROL BOVINE MASTITE

Sâmia Lima<sup>a</sup>, Gaspar Diaz<sup>b</sup>, Marisa Alves Nogueira Diaz<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs s/n 36570-000, Viçosa-MG, Brazil. marisanogueira@ufv.br

<sup>b</sup>Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brazil

#### Introduction

Bovine mastitis, an inflammatory response in cow's udder, is the main infecto-contagious disease affecting dairy cattle and is considered a limiting factor in many dairy properties. The huge economic losses associated with mastitis worldwide motivate researches focused on several aspects of the disease. *Staphylococcus aureus* is the main etiologic causative agents of mastitis and Infections caused by this microorganism frequently turn into chronic and cows with such infections have to be culled. Biofilms are structured community of bacterial cells associated with a surface, enclosed in an extracellular polysaccharide matrix, in recent years several studies show that biofilm formation is a key factor in the establishment and persistence of infections caused by *S. aureus*. In the last few decades, the number of researches on plants antimicrobial properties has increased and aquatic plants have attracted the interest of researchers because plants that live in nutrient-rich environment, as well as plants living in an environment with a very high bacterial cell density will become overwhelmed by microbial biofilms if they lack any means of biofilm control. This study aims to evaluate the antiseptic potentials of *S. auriculata* based herbal soap formulated in our lab.

#### Material and Methods

##### Formulation of Herbal Soap

The hexane extract of *S. auriculata* (250 mg) was incorporated into a soap formulated according patent no PI 1005633-5. After, the semi-solid mixture was poured into a mold and allowed to solidify. A soap without extract was produced and used as a reference product.

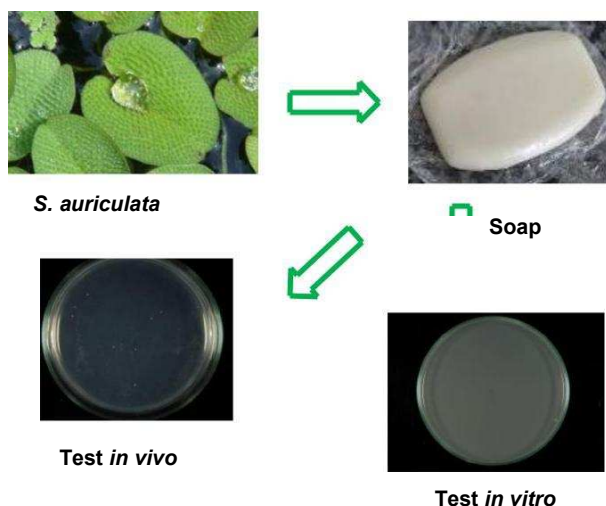
##### Antibacterial assay of the Herbal Soap

The agar-dilution method was employed in the *in vitro* evaluation, using *S. aureus* strain 4127 resistant. For *in vivo* evaluation, the skin of the palm, after manipulation of cow's udder contaminated with *S. aureus* was used.

#### Results

]

The herbal soap formulated with *S. auriculata* demonstrated high inhibition against *S. aureus* of cow's udder and indicates the potential of the plant as excipient in the production of antiseptic soaps for combating bovine mastitis infections especially in small farms. The pharmaceutical industry has major interest in the identification of novel antimicrobials that target microbial biofilms, since their role in pathogenesis was recognized. These findings have high economic, industrial and veterinary significance.



**Acknowledgements:** Fapemig for Financial support (CEX - APQ-00454-11) and CAPES.

## Research Article

# Antibacterial Chemical Constituent and Antiseptic Herbal Soap from *Salvinia auriculata* Aubl.

Samia Lima,<sup>1</sup> Gaspar Diaz,<sup>2</sup> and Marisa Alves Nogueira Diaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG, Brazil

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Federal University of Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Marisa Alves Nogueira Diaz; [marisanogueira@ufv.br](mailto:marisanogueira@ufv.br)

Received 14 October 2013; Revised 12 December 2013; Accepted 18 December 2013

Academic Editor: Ulysses Paulino de Albuquerque

Copyright © 2013 Samia Lima et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The bioassay-guided isolation of the active extract of *Salvinia auriculata* Aubl. led to the separation of three main compounds, characterized as stigmaterone, stigmasterol, and friedelinol. The pure form of diketosteroid presented a potential antibacterial activity with a minimum inhibitory concentration (MIC) value of  $0.01 \text{ mg mL}^{-1}$  against *Staphylococcus aureus* isolated from animals with mastitis infections. The active extract also showed a similar result to that previously obtained with pure diketosteroid when tested with the same isolates. The present study's results demonstrate the potential of this plant as an excipient for the production of antibacterial soaps aimed at controlling bovine mastitis infections, especially on small farms.

## 1. Introduction

In recent decades, research on plants with antimicrobial properties has intensified, due mainly to the fact that these plants are considered sources of pharmacologically active compounds that can become new antibiotics after their pure constituents or active extracts have been evaluated [1]. Plants that live in nutrient-rich environments, as well as plants living in environments containing exceptionally high bacterial cell density (i.e., aquatic plants), will be overwhelmed by microbial biofilms if they lack any means of biofilm control [2, 3]. For this reason, aquatic plants have attracted the interest of researchers and have proven to be promising sources of antimicrobial agents [4].

*Salvinia auriculata* Aubl. (Salviniaceae), also known as *orelha de onça*, is a native aquatic plant from South America and is commonly found in freshwater lakes [5]. Currently few studies show the potential of *S. auriculata* in the remediation of water sources contaminated with heavy metals [6], and no studies in the literature report on the antimicrobial agents of their chemical constituents and active extracts.


In a preliminary study performed with this plant, the present study's research group evaluated the antimicrobial potential of extracts obtained from the roots and leaves of this plant against Gram-positive bacteria associated with

bovine mastitis. The subsequent results illustrated a strong potential of this plant to combat *Staphylococcus aureus*, the main etiologically causative agent of bovine mastitis [7]. This disease, an inflammatory response found in cows' udders, is the leading infectious disease affecting dairy cattle today [8]. According to the Brazilian Department of Agriculture, while Brazil produces nearly 27 billion gallons/year of milk to be distributed worldwide, the search for the control and treatment of this disease presents a major issue for both political policies and the Brazilian economy [9]. Thus, this work aims to examine the bioassay-guided isolation of compounds responsible for antibacterial activity from active extract and to evaluate the antiseptic potential of an herbal soap produced with *S. auriculata*.

## 2. Materials and Methods

**2.1. General.** Silica gel (70–230 mesh) and glass columns were used for column chromatography. All of the solvents used were of analytical grade. The melting point was determined using a Thermopan apparatus (C. Reichert Optische Werke A G). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on 300 MHz and 75 MHz NMR spectrometers, respectively (Mercury 300 spectrometer). Tetramethylsilane (TMS) was used as an internal standard. HR-EI-MS spectra

Nº 2220  
23 de julho de 2013



**Patentes  
Desenhos Industriais  
Contratos de Tecnologia  
Programas de Computador  
Indicações Geográficas  
Topografias de Circuitos  
Integrados**

(21) PI 1103394-0 A2

3.1

(22) 04/07/2011

(51) A61K 36/11 (2006.01), A61K 36/889 (2006.01), A61P 31/04 (2006.01)

(54) COMPOSIÇÕES DOMISSANEANTES À BASE DE ÓLEO DE MACAÚBA E EXTRATOS DE SALVINIA AURICULATA E SEUS DERIVADOS COM AÇÃO TERAPÊUTICA E SEU USO PARA PREVENÇÃO E/OU CONTROLE DE MASTITE BOVINA

(57) COMPOSIÇÕES DOMISSANEANTES À BASE DE ÓLEO DE MACAÚBA E EXTRATOS DE SALVINIA AURICULATA E SEUS DERIVADOS COM AÇÃO TERAPÊUTICA E SEU USO PARA PREVENÇÃO E/OU CONTROLE DE MASTITE BOVINA. A presente invenção, objeto de pedido de patente, destina-se à indústria farmacêutica para preparação de agentes terapêuticos para tratamento, prevenção e controle de microrganismos causadores da mastite

(71) Universidade Federal de Viçosa (BR/MG), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (BR/MG), Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (BR/MG)

(72) Marisa Alves Nogueira Diaz, Gaspar Diaz Muñoz, Ciro César Rossi, Ananda Pereira Aguiar, Sâmia Lima, Andréa de Oliveira Barros Ribeiro

(74) Paulo Augusto Malta Moreira

(21) PI 1103410-6 A2

3.1