

SÂMIA LIMA

***Salvinia auriculata*: UMA ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA
MASTITE BOVINA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

L732s
2012

Lima, Sâmia, 1986-

Salvinia auriculata: uma alternativa para o tratamento da
mastite bovina / Sâmia Lima. – Viçosa, MG, 2012.
iv, 42f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 32-37

1. *Salvinia auriculata*. 2. Mastite. 3. Sabão. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 581.76

SÂMIA LIMA

***Salvinia auriculata*: UMA ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA
MASTITE BOVINA**

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

APROVADA: 14 de fevereiro de 2012

Maria Esther Ricci da Silva

Tânia Toledo de Oliveira

Virgínia Ramos Pizziolo
(Presidente da Banca Examinadora)

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. A importância do leite.....	03
2.2. Mastite Bovina.....	04
2.3. Produtos Naturais.....	07
2.3.1. Produtos Naturais provenientes de plantas.....	09
2.4. <i>Salvinia auriculata</i>	10
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. Objetivos gerais.....	12
3.2. Objetivos específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Material vegetal.....	14
4.2. Preparo dos extratos vegetais.....	14
4.3. Micro-organismos e meios de cultivo.....	15
4.4. Atividade antimicrobiana de extratos e composto(s) isolado(s).....	15
4.5. Fracionamento cromatográfico.....	15
4.6. Produção do sabonete de <i>S. auriculata</i>	18
4.7. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do sabonete.....	18
4.8. Atividade antimicrobiana <i>in vivo</i> do sabonete.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1. Monitoramento da atividade antimicrobiana de extratos da planta <i>S. auriculata</i>	20
5.2. Identificação de compostos.....	23
5.2.1. Substância 41 – Stigmasterol.....	24
5.2.2. Substância 25 - Friedelan-3 β -ol (3 β -Friedelinol).....	25
5.3. Monitoramento da atividade antimicrobiana de composto(s) isolado(s) da planta <i>S. auriculata</i>	26
5.4. Formulação do sabonete de <i>S. auriculata</i>	27
6. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
ANEXOS.....	38

RESUMO

LIMA, Sâmia, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. ***Salvinia auriculata*: uma alternativa para o tratamento da mastite bovina.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Andréa de Oliveira Barros Ribon e Gaspar Diaz Muñoz.

No Brasil, a produção de leite é uma atividade cada vez mais competitiva. Portanto, é importante quantificar e qualificar os fatores que podem influenciar nesta produção, buscando maior ganho, na tentativa de suprir a demanda nacional. A mastite bovina é uma infecção intramamária causada principalmente por bactérias e que causa grande prejuízo econômico para o produtor. O tratamento da doença é baseado em uso de antibióticos, porém estudos têm buscado novas alternativas de combate, devido ao aumento da incidência de resistência aos medicamentos empregados. Medicamentos de origem vegetal têm sido cada vez mais reconhecidos como uma alternativa para antibióticos produzidos industrialmente. Plantas aquáticas, em especial, têm atraído o interesse de pesquisadores por mostrarem resultados promissores como agentes antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana da planta *Salvinia auriculata* e do sabonete de ervas formulado com o extrato desta planta. A macrófita foi coletada em Viçosa, no campus da Universidade. As raízes foram secas e submetidas a extração com o solvente hexano. O extrato obtido foi submetido a uma coluna cromatográfica e dois compostos foram isolados (stigmasterol e 3 β -Friedelinol), pertencentes à classe de terpenos. As estruturas moleculares foram determinadas por meio dos respectivos dados espectrais (RMN ^1H e ^{13}C). Neste estudo, o sabonete de ervas demonstrou bons resultados *in vitro* assim como *in vivo*, através da lavagem das mãos de um ordenhador. Logo, o sabonete demonstra ser um bom antisséptico podendo ser usado na lavagem das mãos do ordenhador e no local da ordenha, a fim de manter a higiene e reduzir os agentes causadores da doença, pois a falta de higiene expõe as superfícies do úbere da vaca às infecções ocasionando a mastite bovina.

ABSTRACT

LIMA, Sâmia, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. ***Salvinia auriculata*: an alternative for the treatment of bovine mastitis**. Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Andréa de Oliveira Barros Ribon and Gaspar Diaz Muñoz.

In Brazil, production of milk is an increasingly more competitive. Therefore it is important to quantify and qualify the factors that can influence this production, seeking greater profit, in an attempt to meet the national demand. Bovine Mastitis is a intramammary infection caused mainly by bacterias and causes great economic loss to farmers. The treatment of disease is based on antibiotics, but new studies have sought alternative treatment because of the increased incidence of resistance to the drugs traditionally used. Medicinal plant drugs have been increasingly recognized by the scientific community as an alternative to antibiotics produced industrially. Aquatic plants, in particular, have attracted the interest of researchers for showing promising results as antimicrobial agents. The aim of this study, was evaluated the antimicrobial potency of the plant *Salvinia auriculata* and a herbal soap formulated with hexanic extract of this plant. The macrophyte was collected in Viçosa, in the University campus. The roots were dried and subjected to extraction with hexane. The extract was submitted to a chromatographic column and two compounds were isolated (stigmasterol and 3- β Friedelinol) belonging to the class of terpenes. The molecular structures were determined by means of their spectral data (^1H and ^{13}C NMR). In this study, the herbal soap demonstrated good results *in vitro* as well as *in vivo*. The herbal soap formulated with *Salvinia* demonstrated high potency against skin flora and indicates the potential of the plant as excipient in the production of antiseptic soaps for combating skin infections especially in the tropics. These findings have high economic, industrial and medical significance.

1. INTRODUÇÃO

RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

No Brasil, a produção de leite é uma atividade cada vez mais competitiva. Portanto é importante quantificar e qualificar os fatores que influenciam nesta produção, buscando maior ganho, na tentativa de suprir a demanda nacional (Coldebella et al., 2004).

O fator que mais contribui para as perdas econômicas da 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 sérios problemas para a pecuária leiteira ocasionando graves prejuízos, quer seja pela diminuição da produção de leite, quer seja pela perda dos rebanhos afetados. A elevada ocorrência dos casos de mastite bovina e as perdas econômicas decorrente principalmente da diminuição da produção láctea fazem com que esta enfermidade seja considerada a mais dispendiosa nas propriedades leiteiras (Silva et al., 2009).

O impacto da mastite vai com o leite além dos portões da fazenda. Mudanças na composição do leite (redução em cálcio, fósforo, proteína e gordura, e aumento em sódio e cloro) reduzem sua qualidade. Além disso, os antibióticos usados para tratar mastite é uma preocupação importante para a indústria e para a saúde pública. A presença de resíduo de antibiótico no leite interfere com o processo de manufatura de muitos produtos lácteos (queijo e outros produtos fermentáveis). Sabores indesejáveis reduzem o valor dos produtos lácteos e a presença de antibióticos mesmo sendo de níveis baixos pode causar problemas de saúde nos consumidores (Tozzetti et al., 2008).

O tratamento de infecções intramamárias bovinas é baseado em uso de antibióticos, porém alguns patógenos tornaram-se resistentes à maioria desses, o que limitou as opções de tratamento. Isso reforça a necessidade de encontrar novos antimicrobianos para o tratamento da mastite bovina (Lacasse et al., 2008). Medicamentos de origem vegetal têm sido cada vez mais reconhecidos pela comunidade científica como uma alternativa, e em especial plantas aquáticas têm se mostrado como fontes promissoras de agentes antimicrobianos (Özbay et al., 2009).

Salvinia auriculata é uma planta aquática livre e flutuante muito comum em água doce, nativa da América do Sul e que se propaga vegetativamente por brotações (Kissmann, 1997; Lorenzi, 2000; Peixoto et al., 2005). Em estudos preliminares

realizados com o extrato hexânico das raízes observou-se halos de inibição de 22 mm com concentração inibitória mínima de 0,3 mg/mL e diminuição da viabilidade de no mínimo 90% para células de *S. aureus* (Rossi et al., 2011).

Em face do que foi exposto acima, o presente trabalho pretendeu avaliar o estudo fitoquímico do extrato hexânico de folhas e raízes coletadas na lagoa do campus UFV ao longo do ano de *S. auriculata* e a possibilidade de uso do extrato como cosmecêutico para tratamento de mastite bovina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância do leite

A cadeia produtiva do leite é uma das mais importantes da agroindústria brasileira. No Brasil, a produção de leite gira em torno de 28.700 milhões de litros por ano. De acordo com dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), 21.900 milhões de vacas foram ordenhadas, em 2009, ação que resultou numa produtividade na ordem de 1.307 litros por animal neste período.

Com base nos dados da Embrapa (2009), Rondônia é líder em produtividade no setor agropecuário leiteiro nacional. O estado é responsável pela produção anual de 747 milhões de litros de leite, o que resulta em uma média de 487 litros da bebida por habitante por ano.

Apesar de ser o sexto maior produtor mundial de leite, a participação do Brasil no volume total comercializado mundialmente gira, apenas, em torno de 5%, com grande parte dessa produção sendo consumida no mercado interno (Secex, 2010). No contexto mundial, o Brasil era considerado um país importador de produtos lácteos. Essa realidade começou a mudar a partir do ano de 2004, quando a balança comercial do setor passou a ser superavitária. Porém, devido à crise econômica mundial e à valorização do Real, a balança comercial do setor lácteo fechou o ano de 2009 em déficit (Secex, 2010), ao mesmo tempo em que o principal importador de leite em pó brasileiro, a Venezuela, reduziu a compra deste produto (Ceapa – Esalq/USP, 2010).

Segundo dados da Embrapa (2010), mais de 50% da área total do Cerrado brasileiro está ocupada por pastagens e os estados com as maiores áreas são respectivamente: Minas Gerais, Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Bahia. No total dessa área de Cerrado, encontram-se 35% do rebanho bovino nacional. Para a pecuária de leite, além do grande potencial produtivo, as principais indústrias de laticínios do país têm unidades nesta região.

Existe um aumento na demanda global para a produção de leite de alta 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. Uma das causas 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), podendo ser diagnosticada através de métodos como *California Mastitis Test* (CMT). 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 lactose (Kitchen, 1981; 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 e havendo perda de 15% de leite por vaca (Oliveira et al., 2011).

2.2. Mastite bovina

Mastite é uma inflamação 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). A principal forma de manifestação desta enfermidade é causada por bactérias, mas outros micro-organismos ou até mesmo choques e lesões podem causar esta inflamação (Tozzetti et al., 2008). Em estudo realizado por Holanda Júnior e colaboradores (2005), foi feito um levantamento de perdas ocasionado pela mastite em rebanhos da região de Araxá, Minas Gerais. Os pesquisadores constataram que o custo fora de aproximadamente U\$126,00/vaca/ano, na qual 75% desse total fora decorrente da redução da produção provocada pela mastite.

O impacto da mastite vai com o leite além dos portões da fazenda. Mudanças na composição do leite (redução em cálcio, fósforo, proteína e gordura, e aumento em sódio e cloro) reduzem 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 com o processo de manufatura de muitos produtos lácteos (queijo e outros produtos fermentáveis), além disso, sabores indesejáveis reduzem o valor dos produtos lácteos e a presença

de antibióticos mesmo sendo de níveis baixos pode causar problemas de saúde nos consumidores (Tozzeti et al., 2008).

Com relação ao diagnóstico, as infecções da glândula mamária podem apresentar-se sob duas formas, a clínica e a subclínica. A mastite clínica é reconhecida por perceptíveis anomalias no leite, como presença de grumos, e no úbere, como vermelhidão e inchaço. A doença é usualmente local, mas pode se tornar sistêmica em animais imunossuprimidos (Hillerton e Berry, 2005). Na forma subclínica não se observam alterações macroscópicas e sim alterações na composição do leite; portanto, não apresenta sinais visíveis de inflamação do úbere (Ribeiro *et al.*, 2003). A forma subclínica é normalmente a mais prevalente, sendo responsável por aproximadamente 70% das perdas, podendo reduzir a secreção de leite em até 45% (Müller, 2002).

Quanto às bactérias isoladas de animais com mastite contagiosa na forma clínica e subclínica, a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* é uma das principais, com taxas de isolamento variáveis, sendo responsável por produzir uma gama de fatores de virulência que contribui para a patogênese. *S. aureus* está comumente associada a infecções crônicas, possivelmente devido à capacidade da bactéria em viver intracelularmente (Hebert *et al.*, 2000). Estudos mostram que variam também em decorrente da forma clínica (44%) ou subclínica (26%) (Martins *et al.*, 2010). Contudo, outras bactérias gram-positivas (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*) também foram isoladas em animais infectados (Hillerton e Berry, 2005).

Muitas infecções crônicas são associadas com o crescimento bacteriano na forma de colônias aderentes envolvidas por uma grande matriz de exopolissacarídeos, constituindo um biofilme (Cucarella et al., 2004). Devido à sua forma agregada, biofilmes não são suscetíveis à fagocitose por macrófagos e tornam-se resistentes a alguns antibióticos (Monzon et al., 2001; Monzon et al., 2002). Vários relatos mostram que a formação de biofilmes é um fator chave no estabelecimento e persistência de infecções causadas por *S. aureus*, *E. coli* e *S. agalactiae* em humanos e animais. Estudos comprovaram que a colonização e a formação de biofilme durante o curso da mastite bovina podem aumentar a dificuldade em se combater a infecção (Brouillette et al., 2005).

O tratamento da mastite bovina é através da administração de antibióticos e 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).

Os antibióticos do grupo dos β -lactâmicos, como a penicilina G, as cefalosporinas e a ampicilina, são os mais utilizados para tratamento de doenças em rebanhos leiteiros, sendo assim os mais frequentemente detectados no leite (Philpot e Nickerson, 2000). Outros como a gentamicina, as tetraciclina e os macrolídeos são citados por Quinn e sua equipe (2005) como antibióticos comumente usados contra patógenos causadores de mastite bovina.

Além disso, os antibióticos também são utilizados como forma de prevenção (Barkema et al., 2006). Contudo, seu uso tem selecionado cepas resistentes. Estudos mostraram que 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 analisar cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados de vários rebanhos enfermos 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%).

O rápido desenvolvimento de resistência na terapia antibacteriana e antifúngica tem motivado a pesquisa de novos fármacos capazes de combater de forma eficaz e segura estes patógenos (Machado et al., 2010). Assim, a busca de substâncias com atividades antimicrobianas tem direcionado a atenção sobre produtos naturais e as plantas têm sido valorizadas como terapias alternativas importantes (Mukherjee et al., 2005).

Em estudo recente, foi mostrado que extratos obtidos das espécies *Senna macranthera*, *Artemisia absinthium*, *Cymbopogon nardus* e *Baccharis dracunculifolia* apresentaram eficácia contra *S. aureus*, principal agente da mastite bovina (Diaz et al., 2010).

2.3. Produtos Naturais

Produtos naturais, também denominados de metabólitos secundários, são compostos orgânicos produzidos por diversos organismos, mas de distribuição restrita a um organismo ou comum a um pequeno número de organismos próximos na sua filogenia.

Apesar de não serem compostos essenciais para a sobrevivência do organismo, esses apresentam um papel importante na adaptação do mesmo, uma vez que são frutos da resposta do indivíduo a pressões do ambiente. Como consequência prática, esses compostos podem ser utilizados em estudos de quimiossistemática, bem como na busca de moléculas bioativas (Leite, 2009).

Em comparação com moléculas sintéticas, os produtos naturais apresentam características bastante favoráveis ao desenvolvimento de novas substâncias com interesse farmacêutico, devido a sua elevada diversidade estrutural e especificidade bioquímica (Clardy e Walsh, 2004; Monneret, 2010). Outras premissas importantes para o uso de produtos naturais são que grande parte de importantes fármacos são oriundos de produtos naturais ou por protótipos desses; muitos produtos naturais apresentam mecanismos de ação já identificados; a grande diversidade de estruturas moleculares que podem ser determinadas e que apresentam alta complexidade e, portanto, dificuldade de obtenção através de síntese (Cragg e Newmann, 2007).

As primeiras evidências do uso de plantas com fins terapêuticos datam de 460 a.C. No entanto, as primeiras informações sobre o uso sistemático de plantas como medicamentos datam da Índia Antiga, através do sistema de medicina vigente naquela época (Carvalho et al., 2002)

A história do Brasil está intimamente ligada ao comércio de produtos naturais (as especiarias), os quais determinaram as várias disputas de posse da nova terra. Do pau-brasil (*Cesalpinia echinata*) era obtido um corante de cor vermelha, muito utilizado para tingimento de roupas e como tinta de escrever, que já era conhecido e utilizado nas Índias Orientais desde a Idade Média. Do lenho do pau-brasil era extraído a brazilina, um derivado catecólico que facilmente oxidava à brasileína, um fenoldienônico identificado como corante (Barreiro et al.; 2006).

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).

Sabe-se que, das primeiras drogas descobertas, mais de 80% dessas eram produtos naturais ou derivados dos mesmos (Harvey, 2008). Além disso, nos dias atuais essa afirmação continua sendo verdadeira: uma comparação entre fontes de novas drogas entre 1981 e 2007 mostra que, desde 1994, cerca da metade destas são oriundas de produtos naturais. Entretanto, no período de 2005 a 2007, treze novas drogas foram aprovadas em todo mundo, cinco foram classificados como produtos naturais, seis produtos naturais semi sintéticos e dois derivados (Cragg e Newman, 2007; Butler 2008).

Outro dado relevante é o uso de drogas utilizadas no combate ao câncer: dos 175 compostos usados como quimioterápicos, 14% são de origem natural e 28% são produtos naturais modificados (Butler e Newman, 2008).

Mais de 100 compostos derivados de produtos naturais estão em estudos clínicos e cerca da mesma quantidade estão em estudos pré-clínicos (Tabela 1), sendo que a maioria desses produtos naturais e seus derivados apresentam fontes vegetais ou microbiológicas, tendo como alvo terapêutico, principalmente, diversos tipos de câncer e doenças infecciosas (Harvey, 2008).

Tabela 1- Drogas derivadas de produtos naturais em diferentes estágios de desenvolvimento

Estágio de desenvolvimento	Fontes dos produtos naturais					
	Plantas	Bactérias	Fungos	Animais	Semi-sintetico	Total
Pré-clínico	46	12	7	7	27	99
Fase 1	14	5	0	3	8	30
Fase 2	41	4	0	10	11	66
Fase 3	5	4	0	4	13	26
Pré-registro	2	0	0	0	2	4
Total	108	25	7	24	61	225

Fonte: Harvey, 2008, adaptada de (Pharmaprojects database, 2008)

Nos dias atuais, 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).

2.3.1. Produtos Naturais Provenientes de Plantas

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).

O uso de extratos de vegetais no tratamento de patologias é um hábito difundido no Brasil, o que pode ser explicado, ao menos em parte, pelo baixo custo e pela crença de que tais produtos não promovem efeitos tóxicos. Contudo, a prevenção às doenças tem sido aceita como a maneira mais promissora de se controlar patologias. Um exemplo é o consumo de frutas e vegetais, que auxilia na prevenção de processos degenerativos diminuindo a incidência e a taxa de mortalidade por câncer ou doenças cardiovasculares devido à presença de substâncias que promovem esse auxílio como os anti-oxidantes (Velloso et al., 2007).

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 com propriedades antimicrobianas extraídas de plantas são terpenóides e óleos essenciais, alcalóides, flavonóides, taninos e cumarinas (Pereira et al.; 2009a).

Nos últimos anos, óleos essenciais obtidos de plantas têm sido considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas. Os óleos essenciais obtidos, por exemplo, de *Mentha pulegium* e *M. spicata* são muito eficazes como inseticidas inclusive no controle da transmissão da Dengue (Kuster et al., 2004).

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 alcalóides 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 (Fraga 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).

Plantas que levam uma vida séssil 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). Da mesma forma, plantas que sobrevivem em ambiente com alta densidade bacteriana devem apresentar mecanismos que as protejam de infecções bacterianas. Embora não se saiba ainda o mecanismo de proteção, acredita-se que muitas plantas passaram a usar inibidores de sinais bacterianos para evitar a formação de biofilmes em sua superfície (Hu et al., 2006). Por essas razões, plantas aquáticas têm atraído o interesse de pesquisadores e se mostrado como fontes promissoras de agentes antimicrobianos (Özbay et al., 2009).

2.4. *Salvinia auriculata*

Salvinia auriculata, conhecida popularmente como orelha-de-onça ou salvínia, é uma planta 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).

Nativa da América do Sul, é uma erva aquática anual ou perene, que possui folhas ovaladas, de 2,5 por 2 centímetros, cheias de pêlos que repelem a água. As raízes (na verdade folhas modificadas) saem de uma estrutura em formato de âncora, abaixo das folhas, que se comportam como esponja segurando água e sedimentos. Entre as raízes há esporocarpos com pedúnculo de cerca de um centímetro, onde ficam os esporos (Martins et al., 2004). A *Salvinia* sp., sob condições favoráveis, é rapidamente disseminada por propagação vegetativa. Vários estudos têm mostrado que a macrófita tem sido utilizada em vários programas de monitoramento em corpos d'água passíveis de eutrofização, sendo considerada uma planta bioindicadora. Contudo, sabe-se que a salvínia também apresenta um potencial fitorremediador,

acumulando em seus tecidos concentrações consideráveis de poluentes, sem que a planta seja danificada (Wolff et al., 2009).

O gênero *Salvinia* sp. é também conhecido como absorvente para a contenção de derramamento de óleo. Em um trabalho realizado por Foletto e colaboradores (2009), foi observado que para ambos os óleos utilizados para análise, a salvinia sp. foi o material que apresentou capacidade de absorção superior aos demais materiais, superando significativamente a do absorvente comercial. A presença de ceras nos pêlos das folhas da salvinia sp. conferem ao vegetal um comportamento hidrofóbico, que repele a água e permite a absorção de óleos.

Rossi e colaboradores (2011) mostraram recentemente o potencial antimicrobiano de *S. auriculata* e *Hydrocleys nymphoides* contra bactérias gram-positivas isoladas de vacas contaminadas de mastite bovina. No entanto, não há estudos que mostrem qual(is) substância(s) ativa(s) proveniente(s) do metabolismo secundário é responsável pela atividade antimicrobiana.



Figura 1- Fotos retiradas de *Salvinia auriculata* crescida em lagoa. Raízes em evidência (esquerda).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de extratos vegetais obtidos da planta aquática *Salvinia auriculata* ao longo do ano de 2011 sobre bactérias causadoras de mastite bovina e o fracionamento do extrato hexânico de raízes visando o isolamento do composto(s) responsável(is) pelo efeito.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos ao longo do ano sobre cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina;
- Fracionamento, purificação, isolamento e identificação do(s) composto(s) responsável(is) pela atividade antibacteriana do extrato bruto das raízes;
- Formulação do sabonete com extrato bruto e avaliação do seu potencial através de testes *in vitro* e *in vivo*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Bionat, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Viçosa.

Os solventes utilizados foram das marcas Vetec Química Fina Ltda e LabSynth Produtos para Laboratório Ltda, em graus P.A. e cromatográficos.

As cromatografias em camada planar foram feitas com Sílica gel 60 G-F₂₅₄ da Vetec[®] e cromatofolhas de alumínio sílica gel 60 G-F₂₅₄ da Merck. Para a cromatografia em coluna foi utilizado Sílica gel 60 (70-230 Mesh) da Vetec[®].

Para a revelação dos resultados cromatográficos foi utilizados ácido fosfomolíbico P.A ACS da Vetec[®] diluído em etanol comercial 93,6% com concentração de 1% m/v e câmara escura de luz UV (254 e 366 nm) modelo MA-544 da Marconi[®].

Para os testes antibacterianos foram utilizadas bactérias isoladas de animais com manifestação de mastite, fornecidas pela Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, pertencentes ao laboratório de Biotecnologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV e meio de cultura utilizados foram Müller-Hinton e Müller-Hinton-Ágar da marca DifcoTM e preparados de acordo com as especificações do fabricante.

O espectro de RMN de ¹H e ¹³C e bidimensionais foram obtidos em espectrômetros Mercury-300. O solvente utilizado para a ressonância foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃) usando-se como referência interna tetrametilsilano (TMS).

4.1. Material vegetal

A planta aquática *S. auriculata* foi coletada no período de Dezembro de 2010 a Novembro de 2011, nas lagoas localizadas no Recanto das Cigarras (VIC 32.122) e em frente ao Supermercado Escola, campus UFRV, e transportada para o laboratório para processamento. As plantas foram lavadas exaustivamente em água corrente para retirada de resíduos. Raízes e folhas foram separadas. O material foi seco a 40°C em estufa com circulação de ar por quatro dias.

4.2. Preparo dos extratos vegetais

As raízes secas foram maceradas e remaceradas em aproximadamente 2L de *n*-hexano. Este solvente foi usado neste trabalho por ter exibido, em trabalhos anteriores, bons resultados como solvente extrator com extratos de raízes de *S. auriculata* (Rossi et al, 2009). A cada vinte dias, os extratos eram filtrados e submetidos à evaporação em rota evaporador. Os extratos obtidos foram secos à temperatura ambiente e posteriormente mantidos a 4°C para uso posterior de acordo com esquema abaixo.

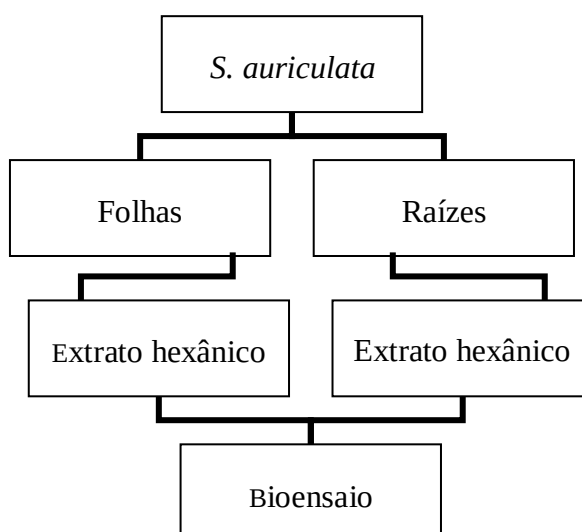


Figura 2 - Fluxograma de extração das raízes de *S. auriculata*

4.3. Micro-organismos e meios de cultivo

Nos bioensaios foram utilizadas bactérias isoladas de animais com manifestação de mastite, fornecidas pela Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Os isolados de *S. aureus* usados foram catalogados com a numeração 3828, 4075, 4125 e 4182. Para todos os testes, os micro-organismos foram crescidos previamente em tubos de ensaio contendo 3 mL de caldo infusão cérebro-coração (BHI; Himedia[®]) por 16h a 37 °C.

4.4. Atividade antimicrobiana de extratos e composto(s) isolado(s)

A investigação da atividade antimicrobiana foi feita pela técnica de difusão em ágar pelo método *hole plate*. Para isso, 100 µL de uma suspensão contendo 10⁶ UFC/mL foram espalhados com alça de Drigalsky em placas contendo ágar Mueller Hinton (Himedia[®]). Furos de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos no ágar e preenchidos com 10 µL dos extratos na concentração de 50 mg/mL e 10 µL de composto isolado na concentração de 5 mg/mL. Controles foram realizados com 10 µL de DMSO e *Ciclopirox olamina* (Uci-Farma[®]) a 5 mg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e os halos de inibição foram medidos em milímetros.

4.5. Fracionamento cromatográfico dos extratos vegetais

Após a evaporação do solvente, o extrato hexânico de raízes de *S. auriculata* (1.750 g) foi cromatografado em coluna de sílica-gel de 70-230 mesh (240 g) a pressão ambiente, coletando-se 14 frações de 20 mL, utilizando-se como eluente hexano e clorofórmio conforme mostrado no Quadro 1.

Quadro 1 - Relação entre Fração Eluída/Concentração do Eluente do Extrato de *S. auriculata*.

Frações	Eluentes
1 a 50	Hexano (100,0% v/v)
51 a 100	Hexano/Clorofórmio (95,0 : 5,0 v/v)
101 a 110	Hexano/Clorofórmio (90,0 : 10,0 v/v)
111 a 169	Hexano/Clorofórmio (85,0 : 15,0 v/v)
170 a 361	Hexano/Clorofórmio (80,0 : 20,0 v/v)
362 a 461	Hexano/Clorofórmio (75,0 : 25,0 v/v)
462 a 664	Hexano/Clorofórmio (70,0 : 30,0 v/v)
665 a 773	Hexano/Clorofórmio (65,0 : 35,0 v/v)
774 a 871	Hexano/Clorofórmio (60,0 : 40,0 v/v)
872 a 926	Hexano/Clorofórmio (55,0 : 45,0 v/v)
927 a 954	Hexano/Clorofórmio (50,0 : 50,0 v/v)
955 a 968	Hexano/Clorofórmio (45,0 : 55,0 v/v)
969 a 996	Hexano/Clorofórmio (40,0 : 60,0 v/v)
997 a 1025	Hexano/Clorofórmio (30,0 : 70,0 v/v)

As frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica e reunidas em 58 grupos (Quadro 2), sendo prioritariamente elaboradas de acordo com a quantidade de material contido e complexidade da mistura (Quadro 3).

Quadro 2 - Relação entre Grupo/Fração coletada do extrato de *S. auriculata*.

Grupos	Frações	Grupos	Frações	Grupos	Frações
1	1 a 13	21	182 a 191	41	472 a 501
2	14 a 20	22	192 a 194	42	502 a 531
3	21 a 30	23	195 a 201	43	532 a 621
4	31 a 38	24	202 a 221	44	622 a 664
5	39 a 40	25	222 a 231	45	665 a 773
6	41 a 50	26	232 a 251	46	774 a 801
7	51 a 57	27	252 a 261	47	802 a 815
8	58 a 60	28	262 a 281	48	816 a 829
9	61 a 70	29	282 a 301	49	830 a 871
10	71 a 90	30	302 a 321	50	872 a 885
11	91 a 100	31	322 a 331	51	886 a 912
12	101 a 110	32	332 a 361	52	913 a 926
13	110 a 120	33	362 a 371	53	927 a 940
14	121 a 130	34	372 a 391	54	941 a 968
15	131 a 137	35	392 a 401	55	969 a 982
16	138 a 140	36	402 a 411	56	983 a 996
17	141 a 150	37	412 a 421	57	997 a 1011
18	151 a 160	38	422 a 441	58	1012 a 1025
19	161 a 169	39	442 a 461		
20	170 a 181	40	462 a 471		

Quadro 3 - Relação entre Grupo (fração) /Substância isolada de *S. auriculata*

Grupo	Fração	Substâncias	Quantidade (mg)	Classe
25	222 a 231	Friedelan-3 β -ol	5,6	Terpeno
41	472 a 501	Estigmasterol	27,0	Terpeno
26+27	232 a 261	Não identificada	5,4	Não identificada
57	997 a 1011	Não identificada	6,5	Não identificada

4.6. Produção do sabonete sólido contendo extrato de *S. auriculata*

O sabonete foi confeccionado a partir da patente “*Processo de fabricação e formulação de sabonete para fins cosmeceúticos contendo óleo de semente de Macaúba (Acronomia aculeata) e o produto obtido*” protocolo 014100004472 de 22/12/2010 utilizando-se o extrato hexânico como princípio ativo. Foram confeccionados quatro sabonetes e a concentração de extrato total usada foi de 250 mg.

4.7. Atividade antimicrobiana *in vitro* do sabonete de *S. auriculata*

A avaliação da atividade do sabonete contendo o extrato bruto de *S. auriculata* foi feita pela diluição em ágar, de acordo com o protocolo estabelecido por Esimone e colaboradores (2008). O sabonete (1 g) foi dissolvido em 50 mL de água destilada para se obter uma suspensão de 2%. Essa suspensão foi agitada vigorosamente até a dissolução do sabão, dispersão da espuma e homogeneidade. Após uma alíquota de 1,0 mL da solução de sabão foi adicionado a 20 mL de meio de cultura estéril (Mueller Hinton) e vertido em placa de Petri. Após solidificação, 100 μ L de uma suspensão contendo 10^6 UFC/mL de *S. aureus* foram espalhados com auxílio de uma alça de Drigalsky em placas contendo Ágar-Mueller Hinton mais o sabonete. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após este período foram observadas a presença ou ausência de crescimento microbiano. O branco foi feito com sabonete sem a presença da planta.

4.8. Atividade antimicrobiana *in vivo* do sabonete de *S. auriculata*

O efeito do sabão nas superfícies da pele humana foi avaliado nas palmas das mãos de um voluntário saudável que trabalha como ordenhador no setor de bovinocultura da UFV. Após manipular um animal doente com mastite, a pele da palma da mão foi esfregada com suabe contendo soro fisiológico estéril, e acondicionada em frascos antes de lavar com o sabonete. Após a lavagem da mão com o sabonete, outro suabe contendo soro fisiológico estéril foi novamente esfregado na palma da mão. Após este procedimento aliquotas de 100 mL do soro fisiológico contendo os respectivos tratamentos foram espalhados com auxílio de alça de Drigalsky em placas contendo ágar Mueller Hinton. As placas que foram incubadas a 37°C por 24h. Após este período foram observadas a presença ou ausência de crescimento microbiano. A taxa de mortalidade foi então determinada pela contagem de micro-organismos viáveis na placa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Monitoramento da atividade antimicrobiana da planta *S. auriculata*

A atividade antimicrobiana das folhas e raízes da planta aquática foi monitorada ao longo de um ano (dezembro de 2010 a novembro de 2011), a fim de se verificar a variação desta atividade neste período e checar qual a época mais favorável para sua coleta e processamento. Foram usados quatro isolados de *S. aureus* para checar esta atividade. Os resultados obtidos de raízes e folhas estão mostrados nas tabelas 2 e 3, respectivamente:

Tabela 2 - Média dos halos de inibição (em milímetros) dos extratos de raízes de *S. auriculata*

Meses das coletas de Raízes	Cepas de <i>S. aureus</i> / Controle positivo (C)							
	3828	C*	4075	C	4125	C	4182	C
1 - Dez	3,7	18,0	3,7	16,0	4,0	16,0	3,0	14,7
2 - Jan	2,0	18,0	4,0	16,0	3,3	16,0	3,3	14,7
3- Fev	4,3	20,0	3,7	16,0	1,3	15,0	3,3	16,0
4- Mar	0	20,0	1,7	16,0	1,7	15,0	1,0	16,0
5 - Abr	0	20,0	0	16,0	0	15,0	0	16,0
6- Mai	0	20,0	0	16,0	0	15,0	0	16,0
7- Jun	1,3	20,0	4,0	16,0	1,7	15,0	0	16,0
8 - Jul	0	20,0	0	16,0	0	15,0	0	16,0
9- Ago	0	17,3	0	16,7	1,33	16,3	0	16,7
10 - Set	0	17,3	0	16,7	0	16,3	0	16,7
11- Out	0	16,7	0	16,0	0	16,0	0	15,0
12- Nov	0	16,7	0	16,0	0	16,0	0	15,0

* *Ciclopirox olamina*

Tabela 3 – Média dos halos de inibição (mm) de extratos de folhas de *S. auriculata*

Meses das coletas de Folhas	Cepas de <i>S. aureus</i> / Controle positivo (C)							
	3828	C*	4075	C	4125	C	4182	C
2- Fev	1,3	20,0	4,0	16,0	2,0	15,0	3,3	16,0
3- Mar	1,3	20,0	2,0	16,0	2,7	15,0	3,3	16,0
4- Abr	0	20,0	0	16,0	0	15,0	0	16,0
5- Mai	0	20,0	0	16,0	0	15,0	0	16,0
6- Jun	3,3	20,0	6,0	16,0	6,0	15,0	3,3	16,0
7 - Jul	0	20,0	0	16,0	4,0	15,0	0	16,0
8- Ago	0	17,3	3,0	16,7	1,3	16,3	1,7	16,7
9 - Set	1,3	17,3	3,0	16,7	2,0	16,3	1,7	16,7
10- Out	0	16,7	0	16,0	0	16,0	0	15,0
11- Nov	0	16,7	0	16,0	0	16,0	0	15,0

* *Ciclopirox olamina*

Com base nas tabelas 2 e 3, pode-se observar que os extratos de raízes testados dos meses de Dezembro, Janeiro e Fevereiro foram os que apresentaram atividade antibacteriana frente às quatro cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina. Para os extratos de folhas, as coletas de Fevereiro, Março, Junho e Setembro foram as que apresentaram melhores resultados contra as bactérias. Já os extratos obtidos de raízes dos meses de Abril, Maio, Julho, Setembro, Outubro e Novembro não mostraram atividade antibacteriana. Para os extratos de folhas, as coletas de Abril, Maio, Outubro e Novembro não apresentam atividade.

A cepa 4125 de *S. aureus* apresentou-se como a mais sensível para os dois tipos de extratos, ou seja, os extratos foram capazes de combater as bactérias formando assim bons halos de inibição. Entretanto, a cepa 4182 mostrou ser a mais resistente para os extratos de folhas e a cepa 3828 a mais resistente para os extratos de raízes. Portanto, para essas cepas, foram formados pequenos halos de inibição.

Nota-se nas tabelas acima que, um dos períodos mais quentes do ano como o mês de Fevereiro, os halos de inibição produzidos por extratos de folhas e raízes

contra as bactérias foram os maiores, se comparado com outros meses. No verão, a disponibilidade de nutrientes é elevada. Assim, o metabolismo secundário poder ser direcionado a produção de compostos que protejam a planta de micro-organismos que estejam neste ambiente rico em matéria orgânica.

Rossi (2009), em seu estudo, realizou a análise bacteriológica da água da lagoa localizada no Recanto das Cigarras, onde coletou *S. auriculata* no período de Novembro a Fevereiro. O valor máximo de bactérias heterotróficas presentes em ambiente aquático permitido, segundo Portaria 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde, não deve exceder 500 UFC/mL. A análise da água da lagoa apontou contagem de bactérias heterotróficas acima do permitido ($4,5 \times 10^3$ UFC/mL), o que indica que a água não estava potável, reforçando a possibilidade das plantas estarem produzindo substâncias de defesa, como sugerido por Hu et al (2006).

Em um estudo feito por Lolis e Thomaz (2011), foi observada a frequência temporal de *S. auriculata* no reservatório de Lajeado (Rio Tocantins) e verificou-se a diminuição de aproximadamente 10% em sua frequência, considerando o período de amostragem (março/2005 a janeiro/2006). Essa diminuição provavelmente estava relacionada à redução das concentrações de nutrientes ao longo do tempo. Porém, Rubim e Camargo (2001) avaliaram o crescimento de *Salvinia molesta* em um braço do rio Preto, em Itanhaém (SP), e observaram que mesmo em baixas concentrações de nutrientes essa espécie prolifera rapidamente. Esses autores concluíram que a temperatura elevada e constante favoreceu o crescimento dessa espécie.

De acordo com os resultados observados na tabela 2, constata-se que os meses de Dezembro, Janeiro e Fevereiro de 2010 apresentaram atividade antibacteriana, embora com halos de inibição menor que o observado para Dezembro-Janeiro de 2009 (Rossi et al., 2011). Essa diferença no tamanho dos halos pode ser justificada pela quantidade de bactérias encontradas no local da coleta. Acredita-se que no ano 2010, a presença de bactérias heterotróficas presentes na água da lagoa seja menor, ou seja, a lagoa está menos poluída.

Observando-se a figura 3 relativa à placa de cromatografia em camada fina, verifica-se que nos meses de Dezembro, Janeiro e Fevereiro, há a presença de compostos do metabolismo secundário que não foram observados nos outros meses.

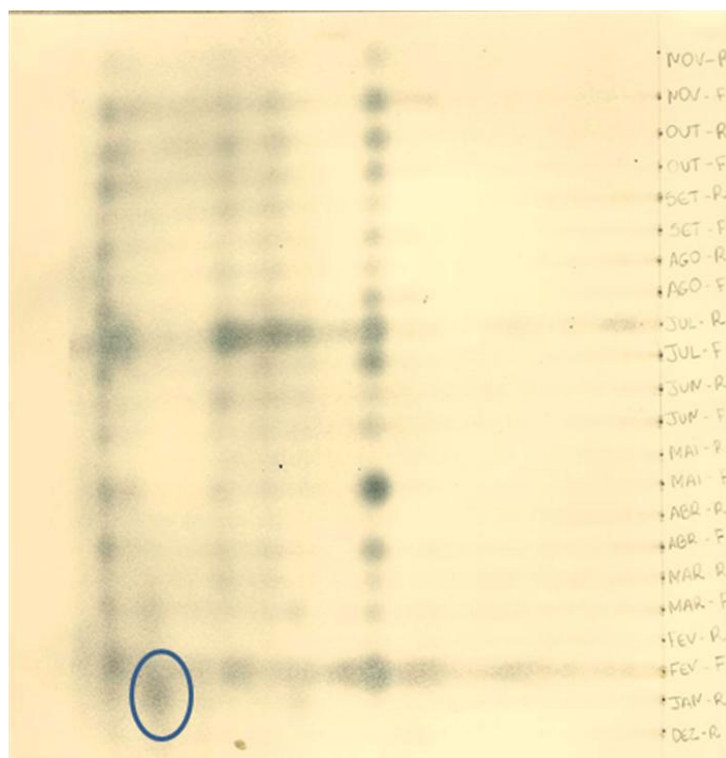


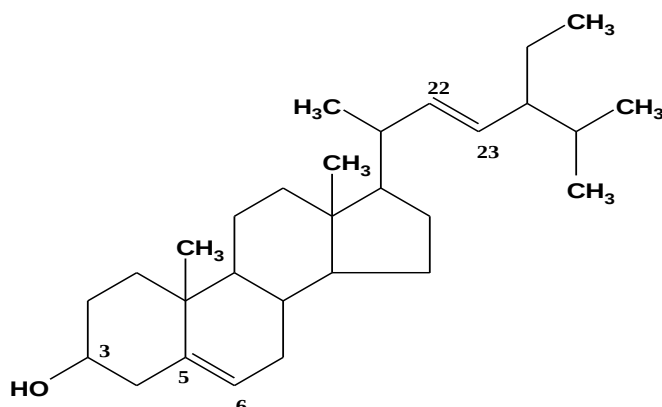
Figura 3 - Cromatografia em camada fina das amostras coletadas entre Dezembro de 2010 e Novembro de 2011 de folhas e raízes.

5.2. Identificação dos compostos

A partir do extrato hexânico das raízes de *S. auriculata*, foram isolados até o presente momento quatro compostos: dois já previamente identificados (Estigmasterol e 3β -Friedelinol) e dois ainda não identificados (Amostras 26 + 27 e 57).

As respectivas estruturas moleculares foram determinadas pelos dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C . As características espectrais dos terpenos já estão bem documentadas na literatura. Alguns estudos apontam que substâncias como terpenos (sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos) apresentam importantes atividades biológicas, principalmente, citotóxica e antibacteriana (Machado et al., 2010).

5.2.1. Substância 41 - Estigmasterol



A estrutura da molécula foi elucidada pela análise espectral de RMN de ^1H (anexos 1 e 2), confirmando a presença de hidrogênios ligados a carbono sp^2 , pelos sinais em δ 5,34 (d, J 5,1 Hz, H-6), δ 5,03 (dd, H-22) e δ 5,12 (dd, H-23) ppm, mostrando tratar-se de duas ligações duplas. O multiplete em δ 3,45-3,60, com integração para um hidrogênio sugere a presença de hidrogênio ligado a carbono carbinólico atribuído ao H-3. Singletos em δ 0,66-1,40 sugerem a presença de grupos CH_3 ligados a carbono quartenário. Infelizmente não se pode obter os espectros de RMN ^{13}C , IV e massas, pois não houve material suficiente para as análises.

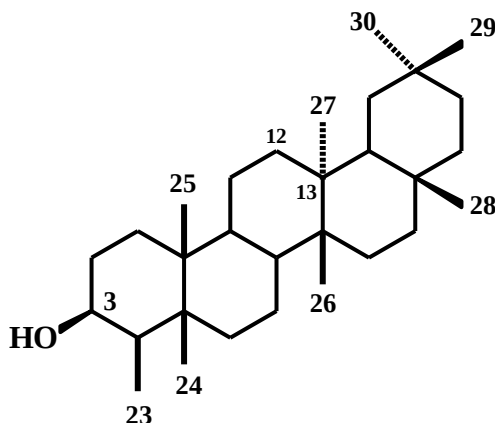
A tabela abaixo contém alguns deslocamentos químicos relativos à substância 41:

Tabela 4 - Deslocamento químico (δ) de ^1H para substância 41

Hidrogênio	Deslocamento	
	Substância 41	Estigmasterol*
3	3,45-3,60	3,47-3,55
6	5,34	5,34
22	5,03	5,07
23	5,12	5,14
Hidrogênios metílicos	0,60-1,40	0,66-1,00

*INOUE et al., (2010).

5.2.2. Substância 25 – Friedelan-3 β -ol (3 β -Friedelinol)



A estrutura da molécula foi elucidada pelas análises espectral de RMN de ^1H e de ^{13}C (anexos 3 e 4) e comparadas com dados da literatura (Carvalho et al., (1998), por se tratar de um composto já conhecido. No espectro de RMN de ^1H (figuras 4, 5, 6 e 7 do anexo) observaram-se a presença de oitos singletos em δ 0,74, 0,76, 0,81, 0,84, 0,94, 1,16, 1,20 e 1,26 que sugerem a presença de grupos CH_3 ligados à carbono quartenário. No espectro de RMN ^{13}C (anexo 4), observa-se a presença de um sinal em δ 74,0 atribuído a presença de carbono carbinólico em C-3 e os sinais em δ 16,63 (C-24), δ 18,60 (C-25 e C-26), δ 20,81 (C-27), δ 32,80 (C-28), δ 35,90 (C-29) e δ 31,40 (C-30) atribuídos aos carbonos do grupo metila.

Vale ressaltar que embora não tenha sido observado o sinal relativo ao carbono carbinólico no espectro de hidrogênio, este aparece como um sinal característico no espectro de carbono, corroborando com a proposta de estrutura sugerida para esta molécula. Observa-se também a ausência de duplas ligações.

A tabela 5 contem alguns deslocamentos químicos relativos à substância 25:

Tabela 5 - Deslocamento químico (δ) de ^{13}C para a substância 25

Carbono	Deslocamento químico	
	Substância 25	3 β -Friedelinol *
3	74,00	72,10
12	30,76	29,80
13	37,29	38,00
24	16,63	16,10
25	18,60	17,90
27	20,81	19,70
28	32,80	31,70
29	35,90	34,70
30	31,40	31,40

*CARVALHO et al., (1998).

5.3. Monitoramento da atividade antimicrobiana de compostos isolados da planta *S. auriculata*

Os compostos isolados das amostras 26+27, 41(estigmasterol) e 57 foram submetidos a um teste de atividade antibacteriana contra a cepa 4125 de *S. aureus*. Apenas a amostra 57 apresentou atividade com halo de 6 mm de diâmetro (figura 4). O controle positivo apresentou 17 mm de halo.

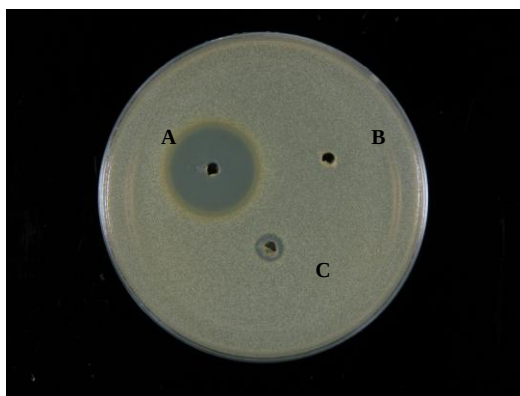


Figura 4 – Teste de Atividade Antibacteriana referente à amostra 57. **A-** Controle positivo (*Ciclopirox olamina*), **B-** Controle Negativo, **C-** Amostra 57

5.4. Formulação do sabonete de *S. auriculata*

O sabonete a base de extrato bruto de *S. auriculata* (Figura 5) foi formulado a partir do desenvolvimento de uma formulação que se encontra sob pedido de patente.



Figura 5 - Sabonetes formulados. **A-** Sabonete com extrato de *S. auriculata*. **B-** Sabonete sem o extrato de *S. auriculata*

O sabonete a base do extrato bruto de *S. auriculata* foi testado *in vivo* e *in vitro* quanto a sua eficácia antibacteriana. O teste para atividade *in vitro* seguiu o protocolo estabelecido por Esimone e colaboradores (2008). Foi usada a cepa 4075 de *S. aureus* como referência por ter exibido pouca inibição do extrato de salvinia e o teste foi feito em triplicata. Para o branco, foi feito um sabonete com a mesma formulação do sabonete de referência, mas sem o extrato de *S. auriculata*. Os resultados do teste *in vitro* são mostrados na figura 6.

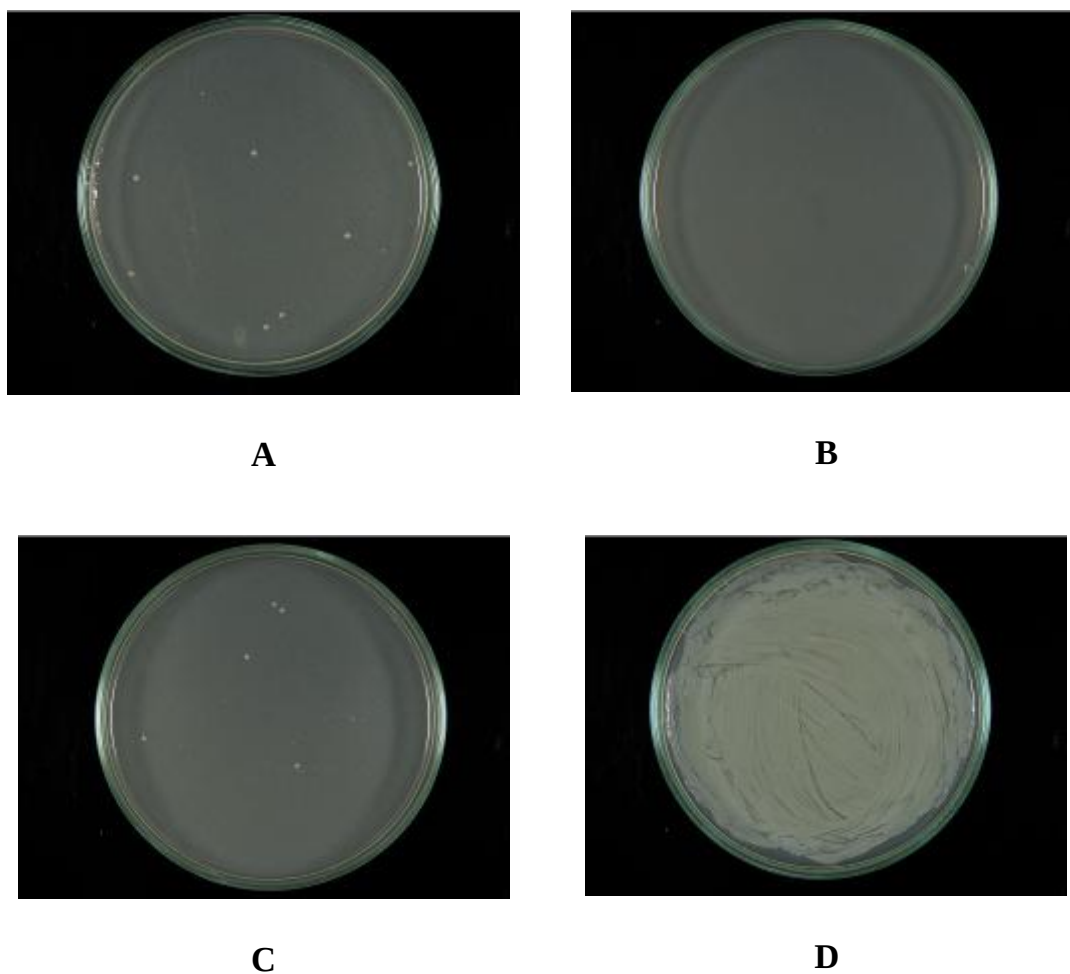
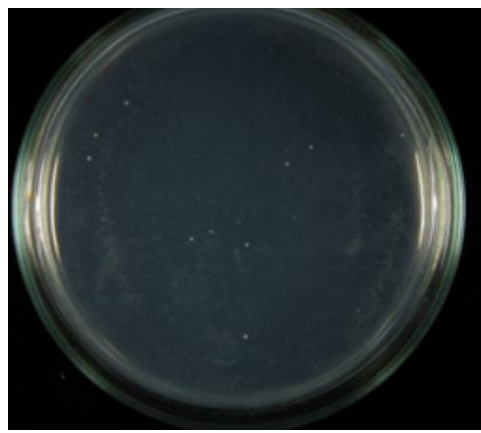


Figura 6 - Avaliação *in vitro* do sabonete de *S. auriculata*. **A**, **B** e **C**- Placas contendo sabonete formulado com extrato bruto de *S. auriculata*. **D**- Branco (sabonete sem o extrato bruto de *S. auriculata*).

Os resultados para a atividade *in vivo* com o sabonete de *S. auriculata* são observados na figura abaixo.



A- Micro-organismo contidos na mão antes da lavagem com sabonete.



B- Resultado após lavagem com sabonete.



C- Micro-organismos contidos na mão após a lavagem com sabonete controle sem o extrato da planta.

Figura 7 - Avaliação *in vivo* do sabonete de *S. auriculata*

A partir do resultado observado tanto no teste *in vitro* quanto no *in vivo* verifica-se que o sabonete formulado a partir do extrato de *S. auriculata* apresentou atividade antimicrobiana bastante significativa, reduzindo a quantidade de micro-organismo presente na placa.

De acordo com o teste *in vitro*, houve pouco ou nenhum crescimento bacteriano nas placas contendo o sabonete com extrato de salvínia. Cresceram apenas nove e cinco UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) nas placas A e C, respectivamente. Na placa B, não houve crescimento de colônia. Já no branco

(sabonete formulado sem o extrato bruto de *S. auriculata*), houve crescimento exacerbado de bactéria, sendo inviável a contagem de colônias.

No teste *in vivo*, houve também a redução do crescimento bacteriano, apresentando apenas nove UFCs, se comparado com a placa controle, em que houve o aparecimento tanto de bactérias mesófilas quanto de fungos. Outros trabalhos também mostraram a eficiência de sabonetes contendo outros extratos de plantas contra *S. aureus*. Esimone e colaboradores (2008) realizaram um teste *in vivo* de um sabonete contendo extrato etanólico de *Cassia alata* na palma das mãos de voluntários e observou que o sabonete apresentou uma excelente atividade antimicrobiana contra a flora bacteriana presente nas mãos, principalmente *S. aureus*. Logo, nestes testes feitos acima, o sabonete formulado com extrato bruto de raízes de *S. auriculata* demonstrou bons resultados contra a flora bacteriana presente na palma das mãos, podendo ser utilizado como um importante cosmecêutico na redução de bactérias causadoras da mastite bovina.

6. CONCLUSÃO

- ✓ Pode-se concluir que os extratos obtidos de folhas e raízes ao longo do ano de *S. auriculata* foram avaliados com relação à atividade antibacteriana contra as cepas de *S. aureus*. Os extratos de folhas e raízes obtidos no mês de Fevereiro obtiveram bons resultados.
- ✓ O fracionamento permitiu o isolamento de quatro substâncias. A substância 25 corresponde ao Friedelan-3 β -ol, a substância 41 corresponde ao Estigmasterol e as substâncias 26+27 e 57 que ainda não foram identificadas. Com relação à atividade antibacteriana dos compostos isolados, apenas a amostra 57 apresentou atividade antibacteriana.
- ✓ O sabonete foi formulado com o extrato bruto de raízes de *S. auriculata* e foi avaliada sua atividade antibacteriana em testes *in vitro* e *in vivo*. Em ambos os testes, o sabonete apresentou bons resultados contra cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina.
- ✓ O sabonete foi submetido a patente: “*Processo de fabricação e formulação de sabonete para fins cosmeceúticos contendo óleo de semente de Macaúba (Acronomia aculeata) e o produto obtido*” protocolo 014100004472 de 22/12/2010 utilizando-se o extrato hexânico como princípio ativo.

REFERÊNCIAS

- BARKEMA, H. W., Y. H. SCHUKKEN, AND R. N. ZADOKS. 2006. **The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis.** Journal of Dairy Science. v.89, p.1877-1895.
- BARREIRO E. J.; VIEGAS JR C.; BOLZANI. V. S.; 2006. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** Revista Quim. Nova, Vol. 29, No. 2, 326-337.
- BROUILLETTE, E.; HYODO, M.; HAYAKAWA, Y.; KRAOLIS, D.K.R.; MALOUIN, R. 2005. **3,5-cyclic diguanylic acid reduces the virulence of biofilm-forming *staphylococcus aureus* strains in a mouse model of mastitis infection.** Antim. Agents. Chemoth. 5: 3109–3113.
- BUTLER, M.S.; NEWMAN, D.J. 2008. **Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholestemics and anticancer drug discovery.** Progress in Drug Research. v.65:p.3-44.
- CARVALHO, M.G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, L. F.; BEZERRA, F. B. **Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes miers* (lecythidaceae).** Química Nova, 21(6) (1998).
- CARVALHO, A. A. T.; SAMPAIO, M. C. C., SAMPAIO, F. C.; MELO, A. F. M., SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A. A.; HIGINO, J. M. **Atividade Antimicrobiana *in vitro* de Extratos Hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre Bactérias Gram-Negativas.** Acta Farmacêutica Bonaerense- vol.21 nº4, 2002.
- CEPEA/ESALQ-USP - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em: www.cepea.esalq.usp.br/leite/. Acesso em: mar. 2011.
- CLARDY, J. E WALSH, C. 2004. **Lessons from natural molecules.** *Nature*, v.432, p.829-837
- COLDEBELLA, A.; MACHADO, P. F.; DEMÉTRIO, C. G. B.; JÚNIOR, P. J. R.; MEYER, P. M.; CORASSIN, C. H.; CASSOLI, L. D.; 2004. **Contagem de Células Somáticas e Produção de Leite em Vacas Holandesas Confinadas.** R. Bras. Zootec., v.33, n.3, p.623-634, 2004.
- CRAGG, G. M. E NEWMAN, D. J. 2007. **Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de fármacos.** In: R. A. Yunes e V. C. Filho (Ed.). Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia. Itajaí: Univali, p.49-79
- CUCARELLA, C.; ANGELES TORMO, M.; UBEDA, C.; TROTONDA, M.P.; MONZON, M. PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADE, J.R. 2004. **Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*.** Infec. Immun. 5: 2177–2185

DANTAS, J.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.

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

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

DÜRR, J.W. 2004. **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.

EMBRAPA. **Principais Indicadores Leite e Derivados: boletim eletrônico mensal.** Coordenadores: Glauco Rodrigues Carvalho e Alziro Vasconcelos Carneiro. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, v. 3, n. 19, 07 jan. 2010. Disponível em: www.cileite.com.br/publicacoes/arquivos/2010_01_Indicadores_leite.pdf. Acesso em: mar.. 2011.

EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa Gado de Leite. Pasta do produtor.** Disponível em: www.cnp.gl.embrapa.br. Acesso em: mar. 2011.

ESIMONE, C. O.; NWORU, C. S. ; EKONG, U. S.; OKEREKE, B. C. **Evaluation of the antiseptic properties of *Cassia alata*-based herbal soap .** *The Internet Journal of Alternative Medicine*. Vol. 6 Number 1, 2008.

FOLETTTO, E.L., DAROS, S., CARDESSO, F., JAHN, S.L. **Uso da biomassa como absorvente para a contenção de derramamento de óleo.** Acta Ambiental Catarinense. V.6, n.1, Junho de 2009.

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

HARVEY, A.L. 2008. **Natural products in drug Discovery.** Drug Discovery Today. v. 13, n. 19/20. p. 894-901

HEBERT, A.; SAYASITH, K. ; SENECHAL, S. ; DUBREUIL, P.; LAGACE, J. 2000. **Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk.** *Microbiol. Lett.* 193: 57-62.

HILLERTON, J.E.; BERRY, E.A. 2005. **Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism.** Journal of Applied Microbiology. v. 98, p. 1250-1255.

HOLANDA JÚNIOR, E.V.; MADALENA, F. E., HOLANDA, E.D.; MIRANDA, W.M., SOUZA, M.R. 2005. **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.

HU, J.F.; GARO, E.; GOERING, M.G.; PASMORE, M.; YOO, H.D.; ESSER, T.; SESTRICH, J.; CREMIN, P.A.; HOUGH, G.H.; PERRONE, P.; LEE, Y.S.L.; LE, N.T.; O'NEIL-JOHNSON, M.; COSTERTON, J.W.; ELDRIDGE, G.R. 2006. **Bacterial biofilm inhibitors from *Diospyros dendo*.** J. Nat. Prod. 69: 118–120.

IBGE - Censo Agropecuário - 2006. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/ca/default.asp?o=2&i=P>. Acesso em mar. 2011.

INOUE, M.H., SANTANA, D.C., VILHENA, K.S.S., SOUZA FILHO, A.P.S., GUILHON, G.M.S.P., POSSAMAI, A.C.S., SILVA, L.E.; DALLACORT, R. **Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*).** Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 28, n. 4, p. 735-741, 2010

KITCHEN, B. J. 1981. **Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests.** J. Dairy Res. 48: 167.

KISSMANN, K. G. 1997. **Plantas infestantes e nocivas.** Ed. Basf, São Paulo Tomo I. 824 p.

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

KUSTER, R. M.; SIMAS N. K.; LIMA E. C.; CONCEIÇÃO S. R.; FILHO A. M. O.; 2004. **Produtos Naturais Para o Controle da Transmissão da Dengue-Atividade Larvicida *Demyroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de Terpenóides e Fenilpropanóides.** Revista Quim. Nova, Vol. 27, No. 1, 46-49.

LACASSE P, LAUZON K, DIARRA MS, PETITCLERC D. 2008. **Utilization of lactoferrin to fight antibiotic-resistant mammary gland pathogens.** Journal of Animal Science.;v.83, p.66-71.

LEITE, J.P.V. 2009. **Química de produtos naturais: uma abordagem biossintética.** Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas. São Paulo: Atheneu. Cap. 3, p 48-94.

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

LORENZI, H. 2000. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas parasitas e tóxicas.** Ed. Nova Odessa

MACHADO, T.R.O.; CORREA, M.G. E MARIN, J.M. 2008. **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.

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, Julho 2010.

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

MONARDES, H. 2004. **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.

MONNERET, C. 2010. **Impact actuel des produits naturels sur la découverte de nouveaux médicaments anticancéreux.** Annales Pharmaceutiques Françaises. v. 68, p. 218-232.

MONZON, M., C. OTEIZA, J. LEIVA, AND B. AMORENA. 2001. **Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of *Staphylococcus epidermidis*.** J. Antimicrob. Chemother. 48: 793–801.

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

MUKHERJEE, R., DASH, P.K.; RAM, G.C. **Immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* L. in bovine subclinical mastitis.** Research in Veterinary Science,79 (2005): 37-43.

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

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

OLIVEIRA, C.M.C., SOUSA M.G.S., SILVA N.S., MENDONÇA C.L., SILVEIRA J.A.S., OAIGEN R.P., ANDRADE S.J.T. & BARBOSA J.D. 2011. **Prevalência e etiologia da mastite bovina em rebanhos leiteiros na região de Rondon do Pará, estado do Pará.** Pesquisa Veterinária Brasileira 31(2):104-110.

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*.** 2011. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2011.

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

PEIXOTO, P.H.P.; PIMENTA, D.S.; Antunes, F. 2005. **Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *Salvinia auriculata*.** *Pesq. Agropec. Bras.* 40: 727-734.

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

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. **Winning the fight against mastitis.** Naperville, IL: Westfalia-Surge, 2000, 188p

QUINN, P.J., MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas.** 1ed, Porto Alegre. Artmed, 2005. 512p

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

ROSSI, C. C. **Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos obtidos de plantas aquáticas sobre bactérias de origem bovina.** Monografia do Estágio Supervisionado em Bioquímica. Universidade Federal de Viçosa, MG. 2009.

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, 3 August, 2011.

RUBIM, M. A. L.; CAMARGO, A. F. M. **Taxa de crescimento específico da macrófita aquática *Salvinia molesta* Mitchell em um braço do Rio Preto, Itanhaém, São Paulo.** *Acta Limnol. Bras.*, n. 13,, p. 75-83, 2001.

SEAPA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: www.agricultura.mg.gov.br/. Acesso em: mar. 2011.

SECEX - **Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior.** Disponível: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>. Acesso em: mar. 2011.

SILVA, V. A.; FREITAS, A. F. R.; PEREIRA, M. S. V.; PEREIRA, A. V. 2009. **Avaliação da atividade antimicrobiana “*in vitro*” da *Lippia sidoides* cham sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina.** *ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido*, v.05, 52-56, 2009.

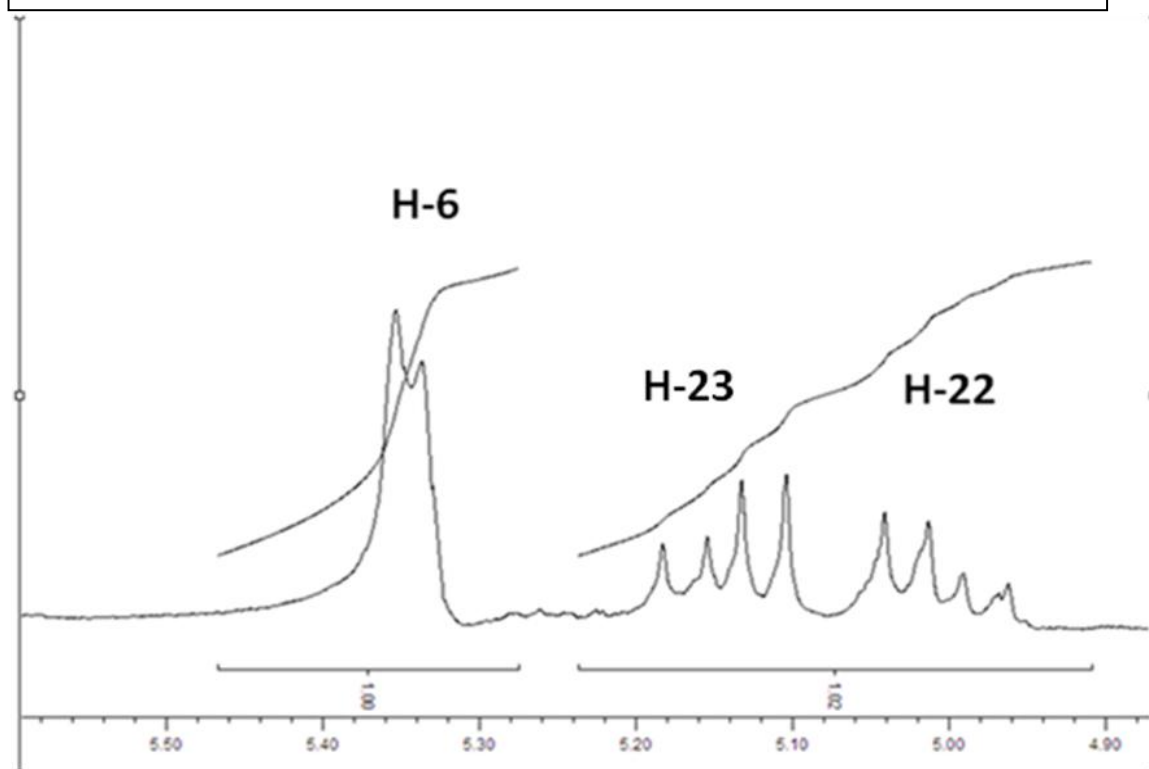
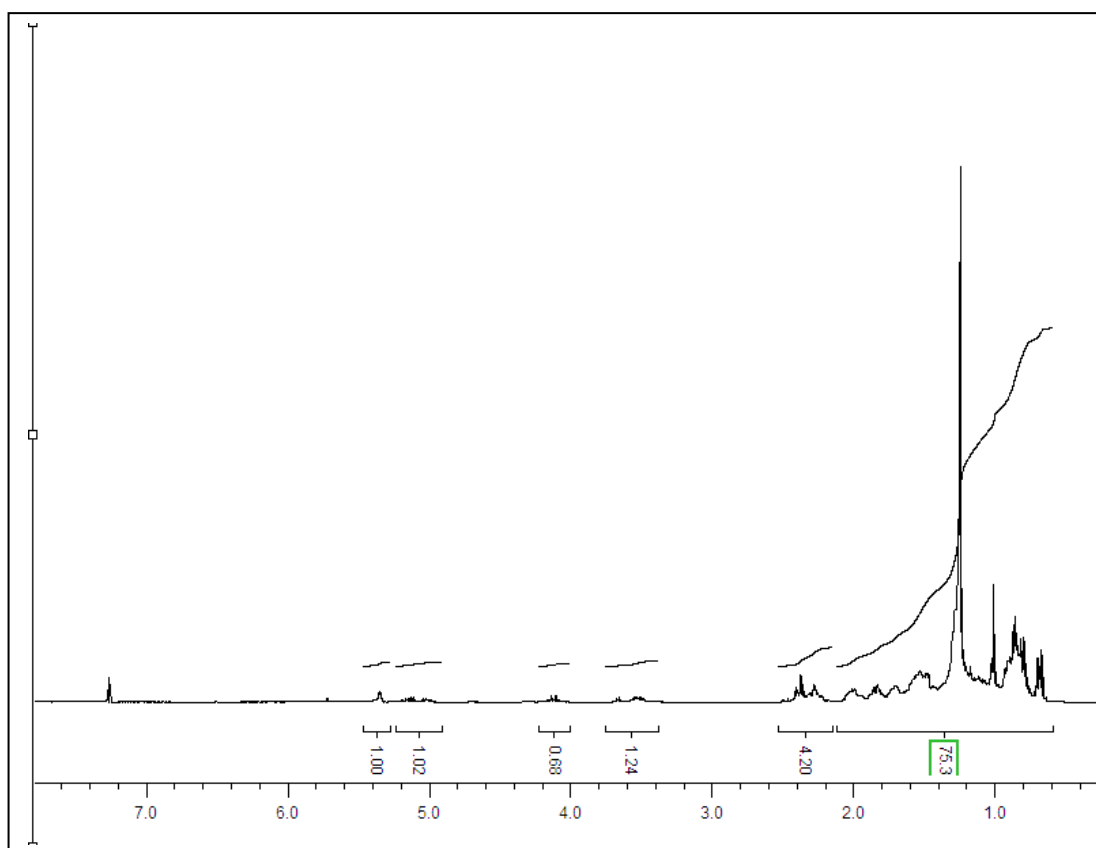
TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. 2008. **Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas.** Revista científica eletrônica de medicina veterinária – ISSN: 1679-7353. Ano VI – Número 10 – Janeiro de 2008.

VELLOSA, J. C. R., BARBOSA V. F. ; OLIVEIRA O. M. M. F.; 2007. **Natural products research: plants and free radicals.** Revista Eletrônica de Farmácia. REF - ISSN 1808-0804 Vol. IV (2), 119-130. Acesso em: mar. 2011.

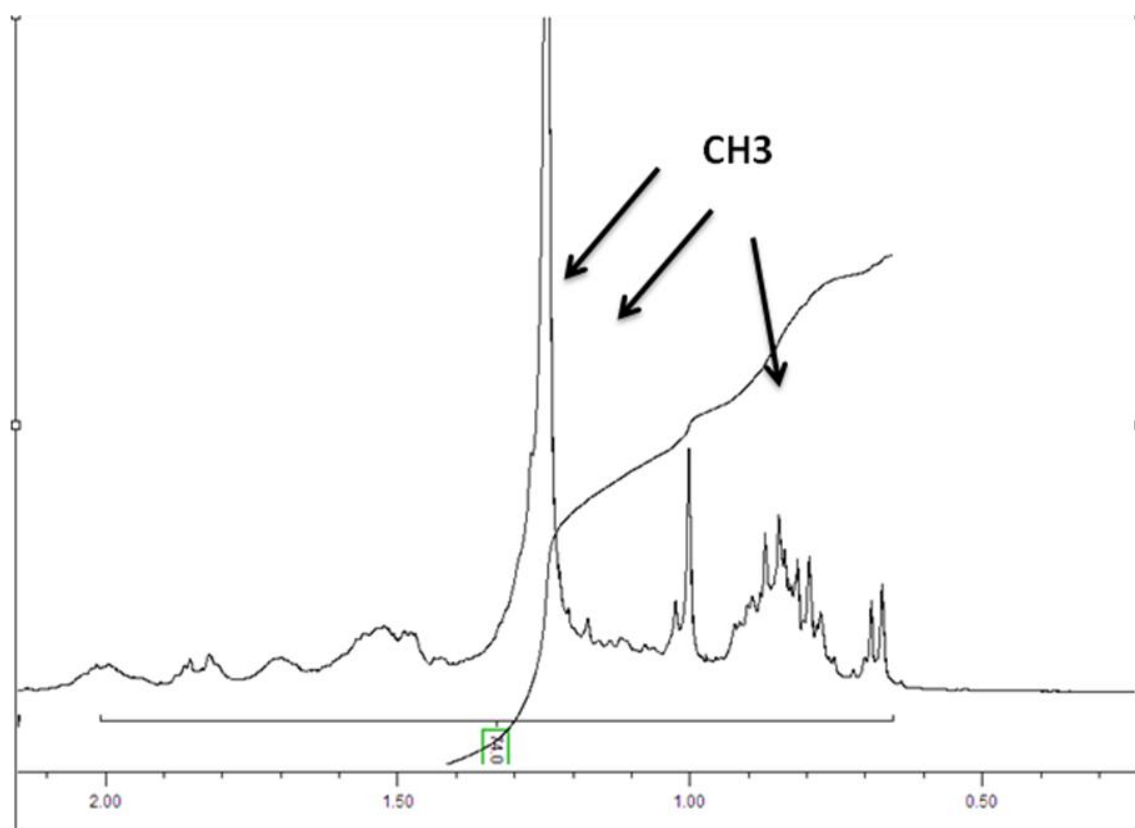
WOLFF, G.; ASSIS, L.R.; PEREIRA, G.C.; CARVALHO, J.G.; CASTRO, E.M. 2008. **Effects of zinc toxicity on leaves of *Salvinia auriculata* cultivated in nutrient solution.** *Planta Daninha*. 26: 315-325.

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

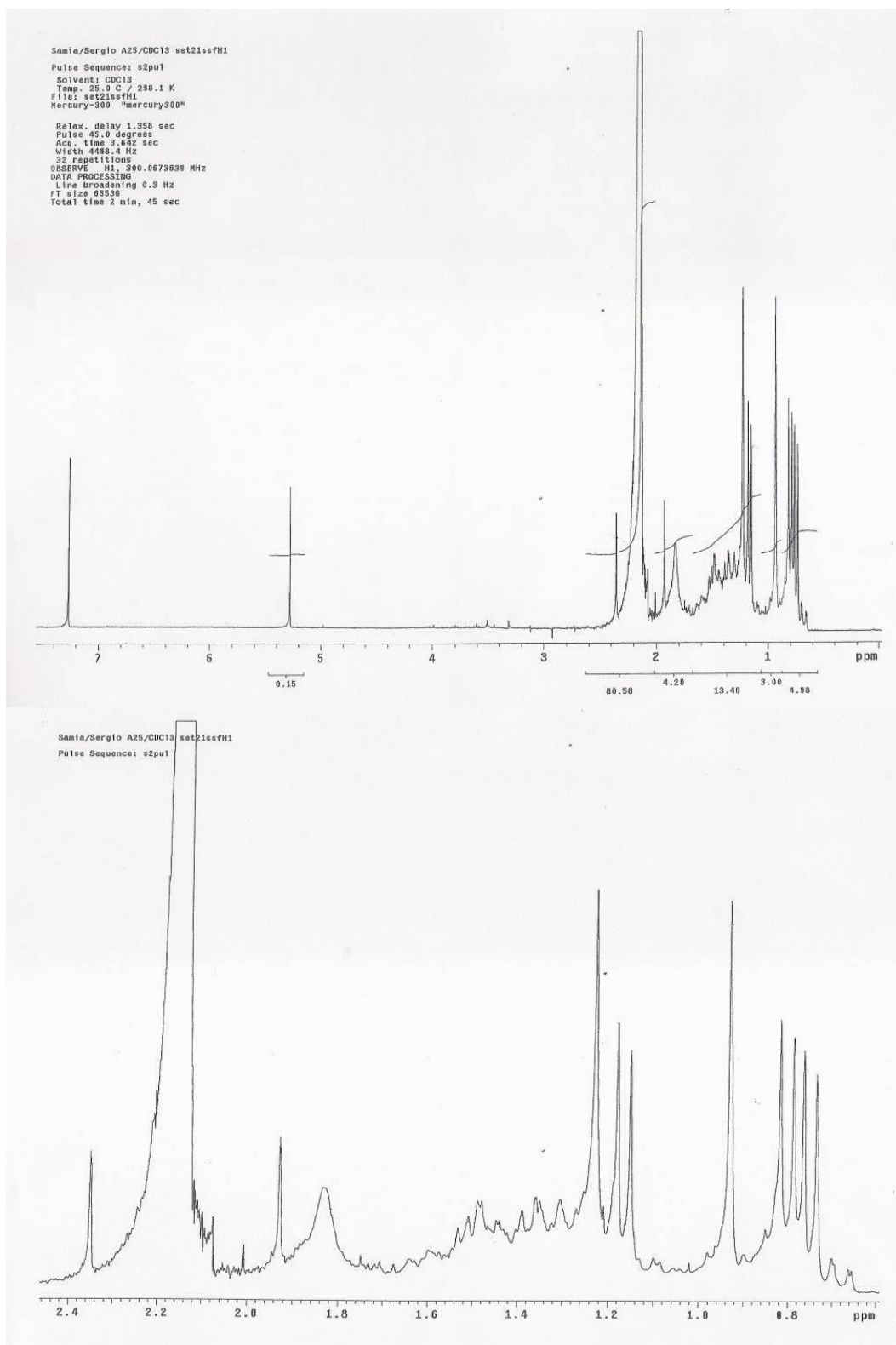
ANEXOS



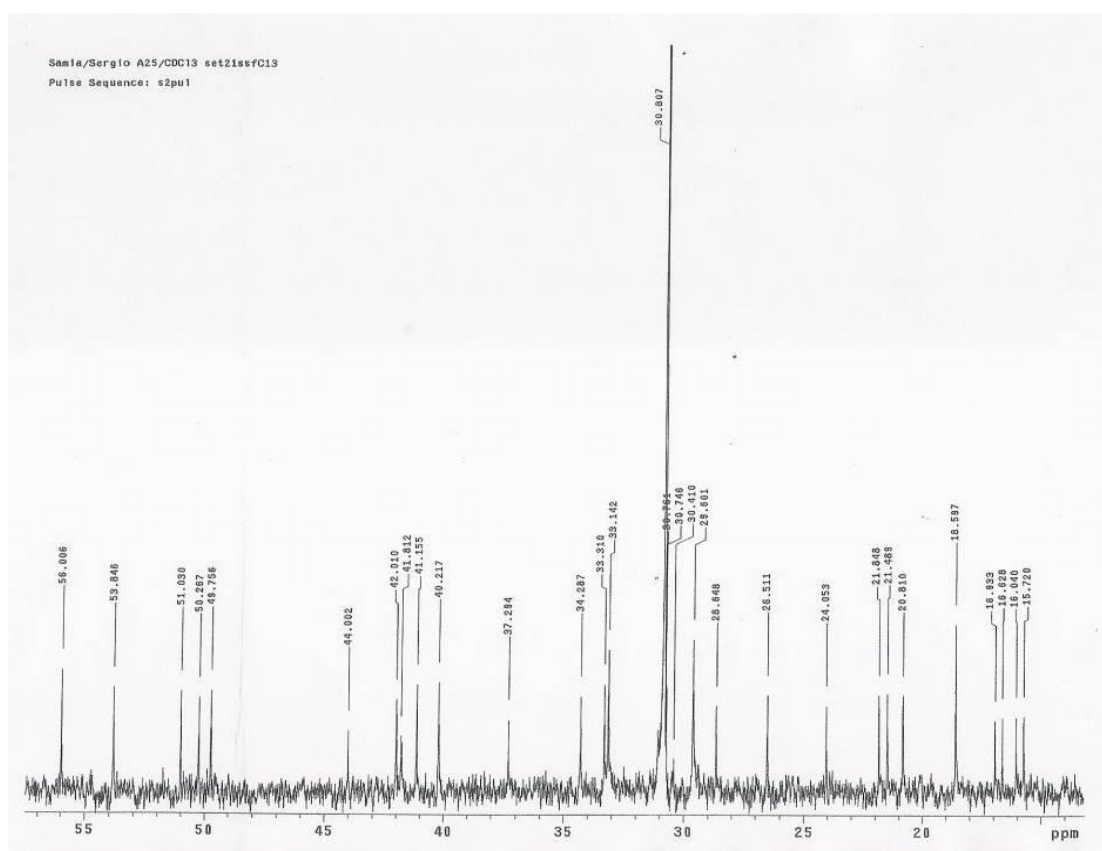
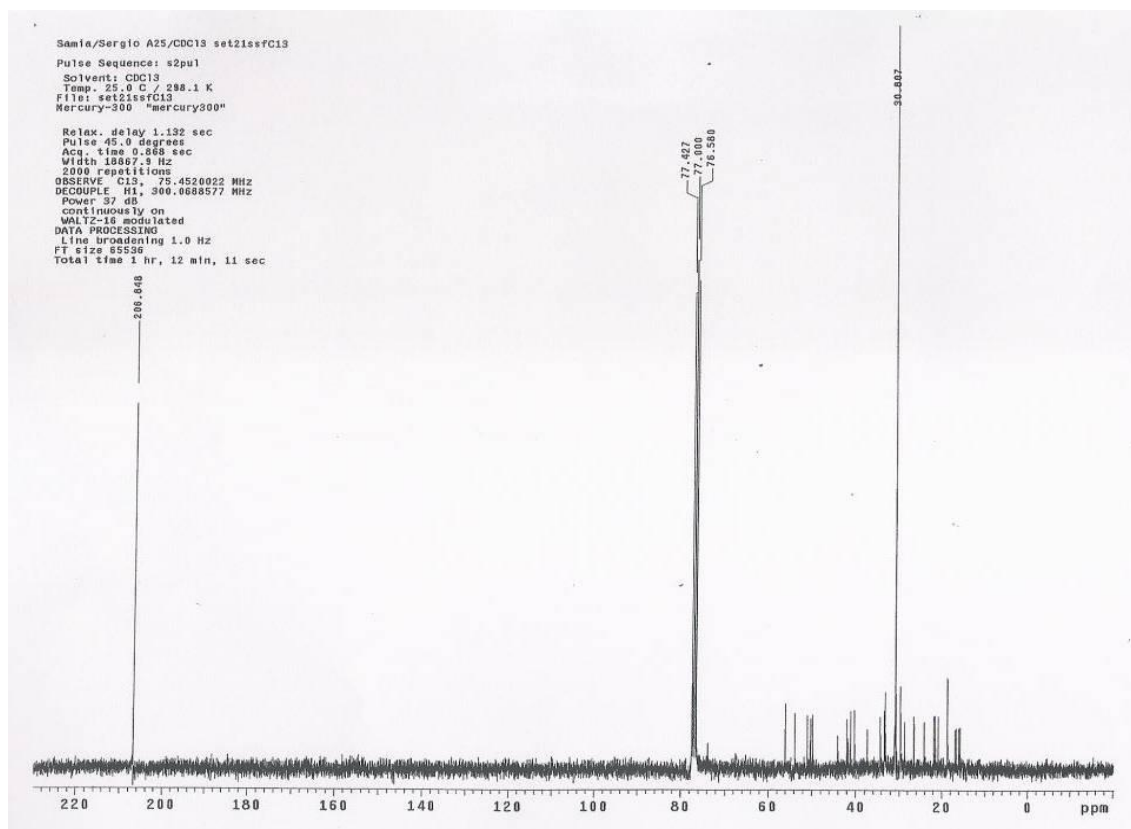
Anexo 1 - Espectros de hidrogênio da substância 41 – Estigmaterol. Espectros de RMN de ^1H mostrando a expansão relativa aos hidrogênios H-6, H-22 e 23.



Anexo 2 - Espectro de hidrogênio da substancia 41 - Estigmaterol, mostrando a expansão relativo as metoxilas.



Anexo 3 - Espectros de hidrogênio da substância 25 - 3 β -Friedelenol, mostrando as expansões relativas as metoxilas.



Anexo 4 - Espectros de ^{13}C da substância 25 - 3β -Friedelinol.