

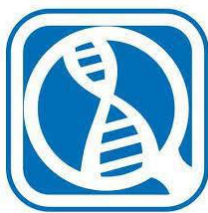
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
RENORBIO**

**Atividade antibacteriana, sinérgica e antibiofilme de extrato etanólico de
Mimosa tenuiflora (Fabaceae) frente a *Staphylococcus aureus* de leite bovino**

**Marielly Bastos Cavalcante
Discente**

**Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Orientador**

**RECIFE – PE
2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
RENORBIO**

Marielly Bastos Cavalcante

**Atividade antibacteriana, sinérgica e antibiofilme de extrato etanólico de
Mimosa tenuiflora (Fabaceae) frente a *Staphylococcus aureus* de leite bovino**

Trabalho apresentado à Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

**RECIFE – PE
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C376a Cavalcante, Marielly Bastos.
Atividade antibacteriana, sinérgica e antibiofilme de extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora* (*Fabaceae*) frente a *Staphylococcus aureus* de leite bovino / Marielly Bastos Cavalcante. - Recife, 2019. 108 f.: il.

Orientador(a): Mateus Matiuzzi da Costa.
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, Recife, BR-PE, 2019. Ponto focal em Pernambuco – Universidade Federal Rural de Pernambuco.
Inclui referências e anexo(s).

1. Biofilme 2. *Staphylococcus aureus* 3. Leite bovino
4. Atividade antimicrobiana 5. Sinergismo 6. Jurema preta I. Costa, Mateus Matiuzzi da, orient. II. Título

CDD 620.8

TERMO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
RENORBIO

TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:

MARIELLY BASTOS CAVALCANTE

Atividade antibacteriana, sinérgica e antibiofilme de extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae) frente a *Staphylococcus aureus* de leite bovino

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 31 de janeiro de 2019

Orientador:

Prof. Dr. *Mateus Matiuzzi da Costa*
Colegiado de Zootecnia - UNIVASF

Examinadores:

Prof. Dr. *Mário Adriano Ávila Queiroz*
Colegiado de Zootecnia - UNIVASF

Prof. Dr. *Rodolfo de Moraes Peixoto*
Colegiado de Zootecnia – IF-SERTÃO/PE

Profª. Dra. *Maria Helena Tavares de Matos*
Colegiado de Medicina Veterinária - UNIVASF

Prof. Dr. *Rafael Torres de Souza Rodrigues*
Colegiado de Zootecnia - UNIVASF

**Aos meus familiares, amigos e a
todos que contribuíram para a concretização
desse trabalho.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente em minha vida, dando-me forças para superar todas as adversidades e obstáculos em meu caminho.

Aos meus pais, que sempre me dão apoio no que eu precisar. São eles que me dão força para continuar a minha batalha.

À minha irmã, Noelly, pelo exemplo de perseverança e humildade e por estar sempre ao meu lado quando eu precisei.

Ao professor Mateus Matiuzzi da Costa, pelos anos de orientação e por ser o responsável pelo meu crescimento durante todo esse tempo. Agradeço por toda a confiança que depositou em mim durante o desenvolvimento das atividades.

A todos os meus colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, pelo companheirismo.

A todos aqueles que me ajudaram diretamente durante o doutorado, em especial Noelly, Danillo, Renata, Ruan, Wilton e Chirles.

Aos simpáticos criadores de bovinos por nos ceder, gentilmente, amostras para o desenvolvimento de parte da pesquisa.

E, finalmente, a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“A ciência é a experiência, e a experiência é um manto que se tece ao longo de vários séculos; quanto mais o manto se estende, mais a ciência é completa e segura.”

Carlo Bini.

Resumo

Os *Staphylococcus* spp. com habilidade para formar biofilmes são cada vez mais conhecidos por causar infecções intramamárias persistentes e a busca por alternativas para inibir o desenvolvimento de biofilmes é fundamental, principalmente quando se utiliza plantas com potencial terapêutico. Desta forma, os objetivos desse estudo foram avaliar o efeito antimicrobiano, sinérgico e antibiofilme do extrato etanólico bruto de *Mimosa tenuiflora* (EEBMT) frente a *Staphylococcus aureus* produtores de biofilme, além de verificar a presença de bomba de efluxo como mecanismo de resistência dessas bactérias. Para a caracterização química dos compostos presentes no EEBMT, foram realizadas triagem fitoquímica e cromatografia líquida de ultra performance (UPLC). Testes fenotípicos foram utilizados para analisar a produção de biofilme, atividade antimicrobiana (com extrato etanólico e oxacilina) e antibiofilme, além do sinergismo (técnica de *checkerboard*) e presença de bomba de efluxo. A partir da análise do extrato foi possível identificar a presença de compostos fenólicos, antocianinas, derivados antracênicos e taninos hidrolisáveis. No teste fenotípico em microplacas, todos os isolados produziram biofilme. A atividade antimicrobiana do extrato vegetal e da oxacilina foi observada em 100% dos isolados. Com relação à formação de biofilme, o EEBMT foi eficaz durante a sua formação, porém não conseguiu reverter o biofilme quando o mesmo já estava consolidado. No *checkerboard*, foi possível observar que a associação do extrato com a oxacilina conseguiu reduzir a concentração bactericida mínima do antibiótico, mostrando que houve interação sinérgica entre ambos. Com relação à presença de bomba de efluxo, nenhum isolado foi positivo para o teste. Conclui-se que todos os *Staphylococcus aureus* utilizados nesse estudo apresentaram capacidade para produzir o biofilme, porém não apresentam bomba de efluxo. O extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana sobre todos os isolados e também mostrou ação contra biofilme em formação, não sendo eficaz contra biofilme já consolidado. A associação do EEBMT com oxacilina apresentou importante resultado sinérgico, sendo que a combinação das duas substâncias se mostrou mais eficaz quando comparado ao seu uso de forma isolada. A partir desses resultados, é possível considerar o extrato etanólico de *M. tenuiflora* como uma importante alternativa terapêutica, sendo promissora no combate a *S. aureus* formadores de biofilme.

Palavras-chave: biofilme, *Staphylococcus aureus*, leite bovino, atividade antimicrobiana, sinergismo, jurema preta.

Abstract

Staphylococcus spp. with ability to form biofilms are increasingly known to cause persistent intramammary infections and the search for alternatives to inhibit the development of biofilms is critical, especially when using plants with therapeutic potential. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial, synergistic and antibiofilm effect of the crude ethanolic extract of *Mimosa tenuiflora* (CEEMT) against *Staphylococcus aureus* biofilm producers, in addition to verify the presence of efflux pump as mechanism of resistance of these bacteria. For the chemical characterization of the compounds present in CEEMT, phytochemical screening and ultra-performance liquid chromatography (UPLC) were performed. Phenotypic tests were used to analyze biofilm production, antimicrobial activity (with ethanolic extract and oxacillin) and antibiofilm, as well as synergism (*checkerboard* technique) and presence of efflux pump. From the analysis of the extract it was possible to identify the presence of phenolic compounds, anthocyanins, anthracene derivatives and hydrolysable tannins. In the phenotypic test in microplates, all the isolates produced biofilm. The antimicrobial activity of the plant extract and oxacillin was observed in 100% of the isolates. Regarding biofilm formation, CEEMT was effective during its formation, but it was not able to revert the biofilm when it was already consolidated. In the *checkerboard*, it was possible to observe that the association of the extract with oxacillin was able to reduce the minimum bactericidal concentration of the antibiotic, showing that there was synergic interaction between both. Regarding the presence of efflux pump, no isolates were positive for the test. It is concluded that all the *Staphylococcus aureus* used in this study had the capacity to produce the biofilm, but did not present efflux pump. The ethanolic extract presented antimicrobial activity on all the isolates and also showed action against biofilm in formation, not being effective against already consolidated biofilm. Regarding the presence of efflux pump, no isolates were positive for the test. It is concluded that all the *Staphylococcus aureus* used in this study had the capacity to produce the biofilm, but did not present efflux pump. The association of EEBMT with oxacillin presented an important synergetic result, and the combination of the two substances proved to be more effective when compared to its use in isolation. From these results, it is possible to consider the ethanolic extract of *M. tenuiflora* as an important therapeutic alternative, being promising in the fight against *S. aureus* biofilm forming agents.

Keywords: biofilm, *Staphylococcus aureus*, bovine milk, antimicrobial activity, synergism, black jurema.

Lista de Ilustrações

Figura 1.	Etapas da formação do biofilme.....	21
Figura 2.	<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir. – Jurema preta.....	30

Lista de ilustrações - Capítulo I

Figura 1.	Esquema da metodologia <i>checkerboard</i>	44
Figura 2.	UPLC-DAD (290 nm) do extrato de <i>Mimosa tenuiflora</i> (A). Cromatograma de íons base (B) obtido por UPLC-qTOF -MS ^E em modo negativo.....	47
Figura 3.	Valores de Concentração Bactericida Mínima do extrato etanólico de <i>Mimosa tenuiflora</i> frente a isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Figura 4.	Valores de Concentração Bactericida Mínima da oxacilina frente a isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	49

Lista de ilustrações - Capítulo II

Figura 1.	Reclassificação dos isolados após tratamento com extrato de <i>M. tenuiflora</i> sobre o biofilme em formação.....	72
Figura 2.	Teste fenotípico para Bomba de Efluxo com uso de Brometo de Etídio....	74

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1.	Resultado da análise da triagem fitoquímica do Extrato Etanólico Bruto (EEB) de <i>Mimosa tenuiflora</i> (jurema preta).....	46
Tabela 2.	Constituintes químicos identificados por UPLC-DAD a partir da análise do extrato etanólico bruto de <i>M. tenuiflora</i>	46
Tabela 3.	Efeito sinérgico do EEBMT com a oxacilina sobre <i>Staphylococcus aureus</i> de leite bovino.....	49

Capítulo II

Tabela 1.	Classificação de <i>Staphylococcus aureus</i> de acordo com a produção de biofilme.....	71
Tabela 2.	Valores de Densidade Óptica de biofilme consolidado de <i>S. aureus</i> antes (0 h) e após (24 h) o tratamento com o EEBMT.....	73

Lista de abreviaturas e siglas

μL	Microlitro
μM	Micromolar
CBM	Concentração bactericida mínima
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade ótica
EEBMT	Extrato Etanólico Bruto de <i>Mimosa tenuiflora</i>
g	Grama
IFI	Índice da fração inibitória
MH	Mueller hinton
mL	Mililitro
MRS	<i>Staphylococcus</i> spp. resistente à meticilina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MS	Espectrometria de Massas
nm	Nanômetro
PIA	Polissacarídeo intercelular adesina
pH	Potencial hidrogeniônico
PNAG	N-acetilglicosamina polimérica
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidade formadora de colônia

Sumário

1. Introdução	12
2. Revisão de literatura.....	14
2.1. Bovinocultura no Brasil.....	14
2.2. Aspectos gerais da mastite.....	15
2.3. Impacto da mastite na bovinocultura e na saúde pública.....	17
2.4. Principais agentes etiológicos da mastite.....	19
2.5. Biofilme bacteriano.....	21
2.6. <i>Staphylococcus</i> formadores de biofilme.....	24
2.7. Resistência aos antimicrobianos.....	26
2.8. Alternativas para a terapia da mastite.....	28
2.9. <i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poiret.....	29
2.10. Agentes antibiofilme.....	32
2.10. Sinergismo de drogas antimicrobianas com fitoterápicos.....	34
Capítulo I.....	36
Capítulo II.....	64
Conclusão Geral.....	85
Referências bibliográficas.....	86
Anexos.....	104

1. Introdução

A bovinocultura tem papel determinante na alimentação da população brasileira, porém, a mastite continua sendo uma das doenças mais dispendiosas na produção leiteira, prejudicando a saúde e o bem-estar animal, além de ser acompanhada pela diminuição na produção de leite, elevação nos custos de saúde, resíduos de drogas, bem como aumento das taxas de abate e mortalidade desses animais. A mastite, em especial a forma subclínica, é considerada uma doença multifatorial (ANAYA-LOPEZ et al., 2006) e de grande importância para a pecuária de leite, podendo causar sérios prejuízos econômicos, além de impactar negativamente na saúde pública (RIBEIRO, 2014).

O principal agente etiológico da mastite é o *Staphylococcus aureus*. Essas bactérias podem apresentar diferentes mecanismos de resistência que contribuem para que esses microrganismos contaminantes do leite persistam na infecção; dentre eles é possível citar formação de importantes estruturas denominadas biofilmes. Estas estruturas contribuem para a persistência da mastite, uma vez que facilitam a aderência e colonização bacteriana no epitélio da glândula mamária, contribuindo para a evasão da defesa imunológica e a dificuldade de erradicação do patógeno. Além disso, protegem as bactérias da ação de antibióticos e permitem a atuação mais demorada desses microrganismos na glândula mamária (WU et al., 2011). Em função disto, pesquisas sobre alternativas para inibição do desenvolvimento dos biofilmes são fundamentais, pois podem contribuir na busca de soluções que visem combater essa estrutura de resistência, auxiliando no tratamento da mastite. É importante destacar que estudos sobre o potencial antibacteriano de diversos tipos de plantas já vêm sendo realizados (MIRANDA et al., 2015; PEIXOTO et al., 2016).

Dentre as variadas espécies de plantas, *Mimosa tenuiflora*, endêmica do bioma Caatinga, tem grande potencial antimicrobiano (BORGES et al., 2013), porém, ainda há poucos estudos com relação ao seu potencial contra a formação do biofilme bacteriano. Nesse

sentido, é fundamental a realização de pesquisas que visem à utilização de plantas com potencial antibiofilme, pois a partir daí será possível eliminar a formação dessas estruturas em diferentes superfícies (MILLEZI et al., 2013).

Portanto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito antimicrobiano, sinérgico e antibiofilme do extrato etanólico bruto de *Mimosa tenuiflora* (EEBMT) frente a *Staphylococcus aureus* produtores de biofilme, além de verificar a presença de bomba de efluxo como mecanismo de resistência dessas bactérias.

2. Revisão de literatura

2.1. Bovinocultura no Brasil

A agropecuária tem papel essencial no desenvolvimento da economia de um país. No caso do Brasil, sua importância aumenta consideravelmente, em especial nos setores como a bovinocultura leiteira, que estão sempre em ascensão (SILVA et al., 2017).

A bovinocultura vem se destacando cada vez mais no agronegócio brasileiro e, de acordo com dados do IBGE, o Brasil possui pouco mais de 200 milhões de cabeças, sendo considerado o maior rebanho bovino comercial do mundo (IBGE, 2016). Vale ressaltar que a pecuária bovina vem impulsionando o crescimento do Produto Interno Bruto (PIB) do país, representando quase 24% do PIB Nacional em 2016 (ABIEC, 2017).

O rebanho bovino brasileiro proporciona a lucratividade a partir de dois segmentos: as cadeias produtivas de carne e leite. A presença dessa atividade em todos os estados brasileiros, além do valor produtivo desses dois segmentos - que pode chegar a R\$ 67 bilhões - demonstra a importância econômica e social da bovinocultura no país (MAPA, 2015). Em 2017, por exemplo, o valor bruto da produção de leite foi de R\$ 37,1 bilhões e contribuiu para movimentar a economia das pequenas e médias cidades brasileiras (IBGE, 2018).

O avanço do índice de produtividade dos rebanhos brasileiros está ligado a diferentes fatores, principalmente no que concerne à adoção de tecnologias que visem melhorar a eficiência e o uso dos fatores de produção. As técnicas de manejo relacionadas à nutrição e à sanidade do rebanho exercem papel essencial no aumento da produtividade do leite (BRASIL, 2016; SILVA et al., 2017). A crescente preocupação dos consumidores - em relação à qualidade dos produtos em geral - tem levado as indústrias alimentícias a buscarem adequações que satisfaçam às exigências do mercado (BRASIL, 2016).

Entretanto, nem todos os parâmetros de melhoria no manejo são adotados, ocasionando, conseqüentemente, redução na produção. A aquisição de rebanhos não especializados, alimentação deficiente quantitativa e qualitativamente, manejo inadequado ou incorreto, falta de controle zootécnico, condições gerais de higiene insatisfatórias, infraestrutura de produção escassa, ausência de práticas administrativas indispensáveis, mão-de-obra não especializada, práticas sanitárias inadequadas e falta de assistência técnica qualificada são alguns dos fatores que contribuem para uma baixa produtividade no setor leiteiro. Aliados a estes, outros fatores tais como deficiências nos sistemas de transporte, armazenamento, comercialização do produto e insumos, crédito rural e falta de associativismo dos produtores podem, do mesmo modo, estar relacionados a essa baixa produtividade (SILVA et al., 2017).

Além desses fatores, a presença de algumas doenças, entre elas a mastite, também contribui para essa redução, gerando prejuízos diretos à pecuária leiteira em função da diminuição da quantidade e qualidade do leite produzido, ou até mesmo pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária ocasionando, muitas vezes, o descarte dos animais (COSER et al., 2012; RIBEIRO et al., 2014).

2.2. Aspectos gerais da mastite

Mastite é a denominação do processo inflamatório da glândula mamária, sendo classificada quanto à forma de apresentação em dois tipos: clínica e subclínica. A mastite clínica pode ser identificada através de observações das alterações do leite bem como sinais clínicos característicos da enfermidade, como rubor, aumento da sensibilidade ao tato, presença de grumos no leite e endurecimento do úbere. Já a mastite subclínica é caracterizada por alterações na composição do leite - como diminuição das proteínas, lactose e sólidos não gordurosos (REIS et al., 2013), além do aumento no número de células somáticas,

necessitando de testes de campo como o *California Mastitis Test* (CMT) ou de laboratório, como a contagem direta ou eletrônica de células somáticas (CCS) para seu diagnóstico (PANTOJA et al., 2009). Do mesmo modo, técnicas microbiológicas como lactocultura e provas bioquímicas para a identificação dos agentes biológicos que causam tal enfermidade são frequentemente usadas (EBRAHIMI et al., 2014), além das técnicas moleculares que estão sendo cada vez mais empregadas e são aplicadas para o diagnóstico desses agentes (ROVAI et al., 2014; ZADOKS et al., 2014).

A doença basicamente acontece pela entrada do microrganismo no canal do teto e o desenvolvimento clínico da mesma dependerá da capacidade do microrganismo em colonizar e multiplicar-se no úbere, do grau de virulência da cepa e da capacidade de resposta do hospedeiro. A multiplicação dos microrganismos juntamente com a produção de toxinas compromete o tecido secretor glandular, ocasionando traumatismo físico e irritação química (KULKARNI; KALIWAL, 2013).

Inúmeros microrganismos patogênicos podem ser responsáveis por este tipo de alteração na glândula mamária. Todavia, o principal agente patológico da mastite bovina é o *Staphylococcus aureus*. A longa duração de infecções causadas por este microrganismo pode levar o curso da doença à cronicidade, o que torna difícil o tratamento, diminuindo consideravelmente a produção de leite, constituindo-se como uma das mais graves patologias no mercado leiteiro (BANDOCH et al., 2011).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* podem produzir uma série de fatores de virulência que contribuem para a invasão bacteriana, facilitando a sua aderência às células epiteliais e, conseqüentemente, a colonização no tecido, favorecendo a sua persistência extracelular e garantindo assim êxito em sua instalação e manutenção nos tecidos do hospedeiro (COELHO et al., 2011).

A persistência bacteriana no local da infecção, muitas vezes, depende da capacidade que as comunidades microbianas têm de estabelecer multicamadas aderentes em superfícies naturais ou artificiais. Estas estruturas, denominadas biofilmes, podem ser definidas como uma comunidade de microrganismos que são irreversivelmente ligados a superfícies bióticas ou abióticas, fechados em uma matriz extracelular composta de produtos exopoliméricos (FLEMMING; WINGENDER, 2010) e têm papel fundamental nas infecções bacterianas, sendo que a cronicidade e a resistência a agentes antimicrobianos de determinadas infecções estão intimamente ligadas à presença de biofilmes (JAIN; AGARWAL, 2009).

2.3. Impacto da mastite na bovinocultura e na saúde pública

A mastite bovina é mundialmente reconhecida como a enfermidade mais comum e onerosa que afeta os rebanhos leiteiros (MUSHTAQ et al. 2018) sendo considerada a doença mais amplamente difundida na indústria leiteira com prevalência na espécie bovina, que varia entre 15,4 e 28,6% (FONTANA et al., 2010; KREWER et al., 2013). Tal enfermidade ocasiona perdas econômicas por diversos fatores, dentre eles a redução da produção e da qualidade do leite, aumento dos custos com mão-de-obra e medicamentos veterinários, além do descarte precoce dos animais, gerando grandes transtornos ao produtor (COSER et al., 2012; RIBEIRO et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014).

Sabe-se que tal enfermidade pode causar impactos negativos na bovinocultura, podendo afetar desde o início da criação até o produto final. Souza et al. (2010) comprovaram esse fato ao estimarem em 4,6 bilhões de litros de leite as perdas ocasionadas pela mastite subclínica em propriedades brasileiras, o que representaria aproximadamente 2,3 bilhões de reais, levando-se em conta os dados de produção e os preços pagos aos produtores no ano de 2009, no Brasil. Outros dados mostram que as perdas econômicas anuais devido à mastite na Índia, Estados Unidos, Reino Unido e no mundo foram estimadas em US\$ 1,1 bilhão (MIR et

al. 2014), US\$ 2 bilhões (RASZEK et al. 2016), US\$ 371 milhões (VIGUIER et al. 2009) e US\$ 35 bilhões (HUANG et al. 2015), respectivamente.

Estudo realizado por Lopes et al. (2011) simulou o impacto econômico anual da mastite adotando, como referência, uma vaca em lactação proveniente de rebanhos que apresentaram contagem de células somáticas de leite de tanques (CCSt) de 250.000 e 1.000.000 de células por mL de leite, considerando perdas na produção de 0%, 6%, 12% e 18%, respectivamente, para CCSt de 200.000; 500.000; 750.000 e 1.000.000, devido à presença de mastite subclínica e menor preço pago pela indústria. Os resultados mostraram perdas que variaram de R\$ 1.333,90 a R\$ 2.145,89 e de R\$ 0,2146 a R\$ 0,4311/kg de leite, para CCSt de 250.000 e 1.000.000 de células por mL de leite, respectivamente.

É importante lembrar que não existe apenas o impacto econômico gerando prejuízos ao produtor; as mastites bovinas também ocasionam a veiculação de agentes potencialmente patogênicos para o consumidor e, eventualmente, a presença de resíduos de antimicrobianos utilizados na terapia da doença (CADES et al., 2017). Além disso, o contato de seres humanos com animais pode favorecer a transmissão do patógeno entre as espécies. De acordo com Silva et al. (2018), a possibilidade dessa forma de transmissão do patógeno surge como um fator a ser considerado na epidemiologia das mastites causadas por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS). Ainda segundo os autores, além da possibilidade de transmissão entre seres humanos e animais, o ambiente também pode ser uma das fontes de infecção de MRS para os animais já que os mesmos podem sobreviver durante meses no ambiente, desde que existam condições favoráveis à sua manutenção, como temperatura e umidade.

Lim et al. (2013), mostrou que é possível isolar cepas de MRS de teteiras, piso, cercas de proteção e do sistema de ventilação. Dessa forma, os resultados do estudo comprovam que existe a necessidade da adoção de medidas preventivas quanto à transmissão de MRS entre

humanos, animais e ambiente das fazendas. Caso o problema não seja erradicado, o tratamento pode tornar-se mais difícil, podendo levar ao descarte dos animais gerando ainda mais prejuízos ao produtor.

Vale ressaltar ainda a importância da mastite em relação à saúde pública, uma vez que o envolvimento de bactérias patogênicas pode colocar em risco os seres humanos (COSER et al., 2012; RIBEIRO et al., 2014). Além disso, a cada dia o mercado vem exigindo padrões de qualidade cada vez mais rigorosos, levando os produtores de leite à utilização de variados produtos antimicrobianos em seu rebanho. Tal comportamento favorece a seleção de patógenos resistentes aos mais diversos fármacos, tornando-se também um grave problema de saúde pública (TEIXEIRA et al., 2014).

2.4. Principais agentes etiológicos da mastite

Diversos microrganismos têm sido reportados à mastite bovina, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A incidência de infecções virais, micoplasmas e fungos relacionados a mastite, também são descritos em diferentes estudos, porém com menores incidências. Na literatura, afirma-se que esta enfermidade pode ser causada por aproximadamente 137 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros, sendo a bactéria com maior prevalência (KEEFE, 2012; CAPURRO et al., 2010).

Dentre os microrganismos encontrados, as bactérias são responsáveis por 80 a 90% dos casos de mastite, sendo que 95% das infecções são originadas por *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*. O restante dos microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium* spp, *Nocardia* spp e *Bacillus* spp. representam 5% das infecções (SCHVARZ e SANTOS, 2012). Zimermann e Araújo (2017), com objetivo de determinar os principais agentes causadores de mastite bovina isolados a partir de amostras de leite no

Paraná, constataram a presença de *Staphylococcus* ssp. em 58,97% das amostras, *Streptococcus* spp. (33,33%), *Enterococcus* ssp. (12,82%), *Bacillus* ssp. (10,25%), *Corynebacterium* ssp. (10,25%), *Escherichia coli* (5,12%), *Yersinia* ssp. (2,56%), e *Klebsiella* ssp. (2,56%), demonstrando a grande diversidade de agentes envolvidos em casos de mastite bovina.

Dentre as principais bactérias causadoras dessa enfermidade, encontram-se as do gênero *Staphylococcus* (HASSAN et al., 2016). Dentre as espécies de estafilococos, *Staphylococcus aureus* é considerado um importante patógeno transmitido por alimentos e causador de doenças transmitidas entre seres humanos e animais, incluindo infecções da glândula mamária (LEE et al. 2012).

Staphylococcus aureus é um dos principais agentes das mastites consideradas contagiosas, apresentando elevada incidência na maioria dos rebanhos leiteiros em vários países. Dentre as características que tornam esse microrganismo um dos principais agentes causadores de mastite, destaca-se a alta capacidade de invasão, que permite a infecção de regiões mais profundas da glândula mamária. Adicionalmente, ocorre formação de tecido fibroso no foco da infecção, formando "bolsões" de bactérias que dificultam a ação dos antibióticos ao local da infecção (SALIMENA, 2014).

Um dos principais problemas relacionados à infecção bacteriana, é sua maior capacidade de resistência. A propagação de cepas resistentes às drogas de "primeira linha", levando a consequências graves, pois as infecções causadas por cepas resistentes não respondem aos tratamentos, podendo ocasionar prolongamento da doença, maior risco de descarte e morte do animal, além de causar insucesso nos tratamentos e expor todo o rebanho ao risco de se infectar com uma estirpe resistente (ALEKISH, et al., 2013).

Os *S. aureus* possuem capacidade de produzir um grande número de fatores de virulência, o que pode estar relacionado com a capacidade de adaptação da bactéria a

diferentes hospedeiros e a diferentes locais no corpo deste hospedeiro (MARQUES et al., 2013). Um dos principais mecanismos de resistência é a formação de biofilmes. O desenvolvimento dessa estrutura permite que as comunidades microbianas sejam menos susceptíveis aos antibióticos, facilitando a permanência bacteriana no úbere, tornando a infecção ainda mais difícil de ser tratada (MELO et al., 2012).

2.5. Biofilme bacteriano

A definição de biofilme geralmente aceita é que este é uma comunidade estruturada de células bacterianas fechadas em uma matriz polimérica organizada em multicamadas, autoproduzida, que está ligada a uma superfície biótica ou abiótica (FLEMMING e WINGENDER, 2010; BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016). A formação do biofilme é um processo dinâmico e envolve as seguintes etapas: (1) adesão inicial reversível, (2) adesão irreversível com início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme, (3) maturação, (4) dispersão (Figura 1).

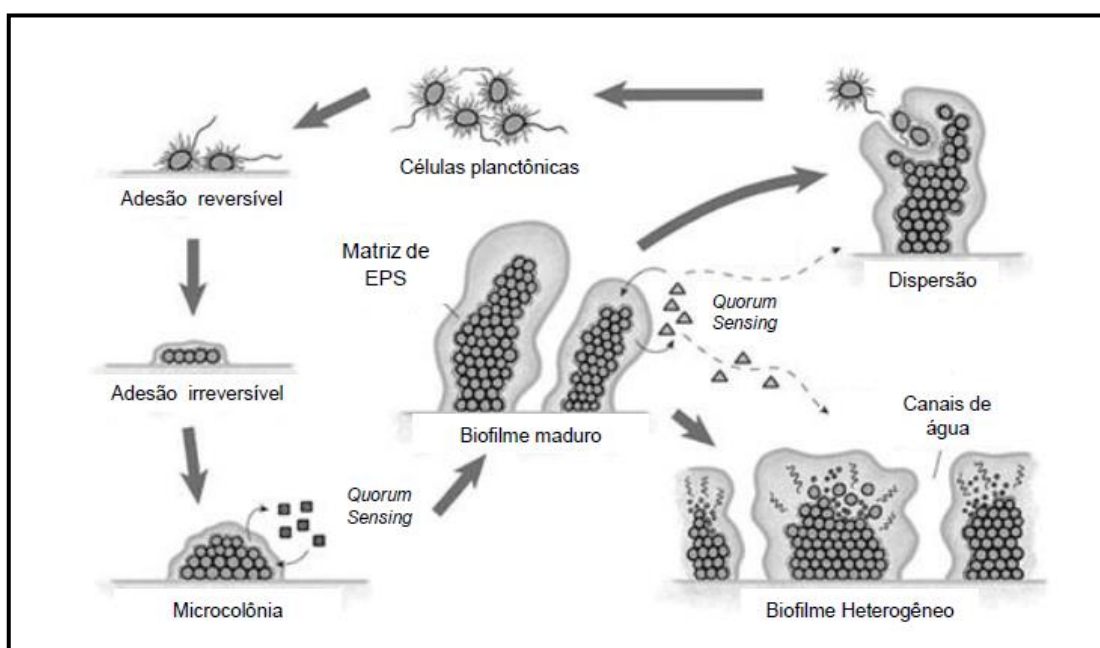


Figura 1. Etapas da formação do biofilme. (Adaptado de: <http://www.becscreen.com/about/about-biofilms>).

Apesar do biofilme ser, na maioria das vezes, formado por bactérias (Gram positivas e/ou Gram negativas), ele ainda pode conter fungos, algas e protozoários. Dentre as espécies bacterianas mais estudadas nessas estruturas, encontram-se: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (SCHIESARI JUNIOR et al., 2015).

No que diz respeito às bactérias, todas podem crescer como biofilmes e estes podem ser encontrados em todos os ecossistemas. O crescimento como biofilme é considerado um modo de proteção que permite a sobrevivência em ambientes hostis. Através de interações intercelulares, o modo de vida do biofilme é claramente distinto das células bacterianas livres. Assim, as comunidades de biofilme têm propriedades emergentes, ou seja, novas propriedades que passam a existir no biofilme que não são previsíveis a partir do estudo de células bacterianas de vida livre (KONOPKA, 2009; JACQUES et al., 2010). Embora o biofilme seja composto de indivíduos sésseis, as comunidades de biofilme podem dar origem a células não sésseis (ou planctônicas) que podem rapidamente multiplicar-se, dispersar e iniciar um novo biofilme (JACQUES et al., 2010).

A estrutura de um biofilme altera o microambiente de seus próprios habitantes fazendo com que os mesmos sofram diferenciação - desencadeada por condições locais - gerando um impacto sobre a expressão gênica em função da transferência horizontal de genes entre as células, onde estas, localizadas em diferentes zonas do biofilme, irão exibir diferentes padrões de expressão de genes (MADSEN et al., 2012). Portanto, pode-se afirmar que os biofilmes são um ambiente ideal para a transferência de material genético, principalmente por contar com grande quantidade de elementos genéticos móveis que podem intercambiar de uma bactéria à outra, por troca de plasmídeos, conjugação ou transposons. Vale lembrar que a proximidade física das células dentro da colônia favorece esse mecanismo (RIBEIRO et al., 2012).

É importante ressaltar que a alta densidade celular, a acumulação de elementos genéticos móveis e um ambiente físico estável é bastante favorável para o contato célula a célula, que é necessário para alguns mecanismos de transferência de genes. Assim, a captação de determinados genes de virulência através da transferência horizontal facilita, por exemplo, a aquisição de resistência aos antimicrobianos pelas células em biofilme (MADSEN et al., 2012). Essas propriedades emergentes, que incluem a formação de interações físicas e sociais, troca gênica e uma maior tolerância aos antimicrobianos, são papéis fundamentais da matriz que envolve as células do biofilme (FLEMMING e WINGENDER, 2010; SINGER et al., 2010).

As bactérias em biofilmes podem ser vistas como formadores de *habitat* biogênico em uma microescala. Ao gerar uma matriz, as bactérias criam um *habitat* fisicamente distinto que proporciona abrigo, promove a acumulação de nutrientes e altera fundamentalmente o ambiente físico-químico do biofilme e as interações entre os organismos ali existentes (FLEMMING et al., 2016).

Sabe-se que, para as bactérias iniciarem o processo de formação do biofilme, é necessário que haja a aderência dessas células em uma determinada superfície para que as mesmas se proliferem. Isso ocorre pela produção do polissacarídeo capsular adesina (PS/A), um antígeno capsular que faz com que a bactéria tenha aderência na superfície. A síntese do polissacarídeo capsular-PS/A, por sua vez, é mediada por um operon *ica* que, ao ser ativado, um polissacarídeo de adesão intercelular-PIA é sintetizado (O’GARA, 2007).

Compreende-se que o reconhecimento da existência do biofilme é de grande relevância, assim como seu mecanismo de formação e manutenção. A partir daí, novos métodos diagnósticos podem ser desenvolvidos, permitindo aplicar tratamentos mais específicos e com maior eficácia (SCHIESARI JUNIOR et al., 2015).

2.6. *Staphylococcus* formadores de biofilme

O biofilme é considerado um fator de virulência muito importante, principalmente por estar associado à troca de material genético (facilitando a conservação do genótipo), patogenicidade e resistência aos antimicrobianos (JAIN e AGARWAL, 2009; HOIBY et al., 2010). Tem sido proposto que os biofilmes de *Staphylococcus* spp. são as principais causas de mastite recorrente e crônica no gado leiteiro (MELCHIOR et al., 2007) e existe um consenso de que o biofilme contribua para a persistência e disseminação dos *Staphylococcus* em sítios infecciosos, contribuindo para o desenvolvimento de doenças crônicas, uma vez que dificulta a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (HOIBY et al., 2010).

Pesquisas mostram que bactérias produtoras de biofilme são mais resistentes ao tratamento antimicrobiano em casos de mastite. Santos et al. (2018) avaliaram o perfil de resistência antimicrobiana e a capacidade de formar biofilme de *Staphylococcus* coagulase positiva e observaram que todos foram sensíveis aos nove antibióticos testados, sendo que nenhum isolado bacteriano foi capaz de produzir biofilme.

Hassan et al (2011) também avaliaram o perfil de resistência bacteriano em isolados produtores e não produtores de biofilme. Os autores observaram que houve maior resistência aos antibióticos em bactérias produtoras de biofilme quando comparadas às não produtoras. Do mesmo modo, Costa et al (2014) estudaram o perfil de sensibilidade de *E. coli* isolados de leite de vacas com mastite a seis antimicrobianos, e concluíram que as cepas classificadas como moderadas e fortes produtoras de biofilme foram mais resistentes aos antibióticos em relação àquelas com baixa ou nenhuma formação de biofilme.

Essas pesquisas confirmam que células bacterianas organizadas em biofilmes são mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos quando comparadas com as células planctônicas dos mesmos isolados (ANTUNES et al., 2011). Dessa forma, faz-se necessário a escolha da terapêutica antimicrobiana correta para o tratamento de infecções intramamárias

em bovinos, relacionadas com a produção de biofilmes, a fim de obter eficácia no tratamento dessa enfermidade (COSTA et al., 2014).

Algumas hipóteses sobre mecanismos que justifiquem um aumento da resistência de *Staphylococcus* spp. formadores de biofilme têm sido levantadas: baixa penetração do antimicrobiano, lenta taxa de crescimento bacteriano na maturação do biofilme pela limitação de nutrientes ou como resposta ao estresse iniciado com a formação do biofilme e, finalmente, alteração da composição da membrana proteica além da indução de um fenótipo caracterizado por bomba de efluxo (ANTUNES et al., 2007).

As bombas de efluxo são um conjunto de proteínas integradas a membrana celular e têm a função proteger as células de efeitos tóxicos, facilitando a saída de moléculas nocivas para o espaço extracelular (COSTA et al., 2013). Contribuem não somente para o efluxo dos antibióticos, mas para a extrusão de compostos químicos, sugerindo que estas contribuem para a sobrevivência da bactéria no seu nicho ecológico (LIN et al., 2015).

A resistência aos antibióticos mediada por efluxo pode ser considerada um importante mecanismo de virulência em bactérias (XING et al., 2014; COSTA et al., 2013). Existe a possibilidade das bombas de efluxo possuírem uma variada especificidade de substratos, sendo que aquelas de largo espectro têm a capacidade de expulsar mais de uma classe de antibióticos ou outros compostos antimicrobianos (COSTA et al., 2013, MARTINS et al., 2013).

Sistemas de efluxo bacterianos podem ser tanto específicos, expulsando somente um antimicrobiano ou uma classe de antimicrobianos, quanto bomba de efluxo multirresistentes. Essas bombas são classificadas em cinco famílias de acordo com seu requerimento energético e estrutura: ABC (*ATP-binding cassettes*), MATE (*Multidrug and Toxic compound efflux*), RND (*resistancenodulation cell division*), SMR: (*small multidrug resistance family*), MEPF (*multiantimicrobial extrusion protein Family*) e MET (*multidrug endosomal transporters*). As

primeiras 5 famílias são encontradas em microrganismos enquanto que a família MET é restrita a eucariotos (KOURTESI et al., 2013).

A sobreexpressão e a expressão constitutiva dessas proteínas de membrana podem representar o primeiro passo na aquisição de resistência bacteriana aos antibióticos que, aliados à formação de biofilme, contribuem para sua sobrevivência e persistência em ambiente infectado (COYNE et al., 2011; BLAIR et al., 2015a; LI et al., 2015).

Desta forma, o conhecimento sobre a formação de biofilme além de outros mecanismos de resistência bacterianos, é fundamental para adequação de estratégias de tratamento de doenças como a mastite pois, conhecendo as suas propriedades e o modo como se organizam, é possível controlar o desenvolvimento desses microrganismos de forma a prevenir o seu crescimento e, conseqüentemente, chegar a um tratamento eficaz (MELO et al., 2012).

2.7. Resistência aos antimicrobianos

O surgimento dos antibióticos revolucionou o tratamento de doenças infecciosas, proporcionando uma redução mundial das taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções causadas por bactérias (COSTA et al., 2017). A terapia antimicrobiana tem por finalidade fazer com que o princípio ativo chegue até o local da infecção e mantenha concentrações adequadas por tempo satisfatório para auxiliar a defesa do sistema imunológico (COSTA, 2011).

Entretanto, o mau uso desses fármacos acelera o processo natural de resistência bacteriana, favorecendo a seleção de patógenos resistentes no meio ambiente, além de contribuir para o surgimento de doenças de difícil tratamento dentro das comunidades (ORÚS et al., 2015). O acesso facilitado aos medicamentos na medicina veterinária tem feito com que

os mesmos sejam escolhidos de maneira errônea, podendo resultar em seleção de cepas resistentes interferindo na eficiência do tratamento (SHI et al., 2010).

A resistência é um fenômeno natural explicado por diferentes mecanismos e regida pelo princípio da evolução e adaptação genética. O surgimento da mesma é mais acentuado quando a população de bactérias fica exposta de forma constante a antibióticos. Mesmo com a indicação e utilização correta desses medicamentos, existe a possibilidade de se verificar o desenvolvimento de mecanismos de resistência (SAMPAIO et al., 2018), isso porque os microrganismos portadores de resistência intrínseca ou de genes de resistência, podem apresentar maior adaptação e tolerância a pressão seletiva que os antibióticos impõem ao meio, devido às capacidades bioquímicas que tais microrganismos podem expressar (KUMAR e VARELA, 2013).

Vários podem ser os mecanismos de resistência aos antibióticos. Dentre eles, pode-se citar: (1) modificação do alvo do antibiótico: mudanças estruturais do alvo impedem a ligação efetiva entre ele e o antibiótico (BLAIR et al., 2015b); (2) diminuição da permeabilidade da membrana celular: a penetração do fármaco nas bactérias depende de características físico-químicas dos antibióticos como a polaridade e o tamanho das moléculas (DRAWZ e BONOMO, 2010); (3) sistemas de bombas de efluxo: proteínas membranares que exportam os antibióticos para o meio extracelular, mantendo as concentrações intracelulares em baixos níveis (DRAWZ e BONOMO, 2010); (4) inativação enzimática do antibiótico: o mecanismo de resistência ocorre devido a inativação do fármaco a partir da produção de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico. O exemplo clássico deste mecanismo de resistência é a produção de β -lactamase que hidrolisa o anel β -lactâmico dos antibióticos (VAN HOEK et al., 2011); (5) formação de biofilmes: ocorre a adesão primária das células a uma superfície seguida da formação de microcolônias que se acumulam agrupadas em multicamadas celulares. Por meio de comunicação química via *quorum sensing* entre as células bacterianas,

ocorre a formação de um agregado de células embutidas em uma matriz de exopolissacarídeos que constitui o biofilme maduro (VERT et al., 2012).

O fenômeno da resistência bacteriana a diversos antibióticos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública (COSTA e SILVA JUNIOR, 2017). Isso acontece principalmente pelo fato de que a produção de barreiras de proteção, como o biofilme, contribui para o aumento dessa resistência, tornando ainda mais difícil o tratamento da enfermidade.

Dessa forma, medidas para evitar a resistência bacteriana, como o uso racional dos antibióticos, prevenção de infecções bacterianas, controle e prevenção da disseminação de microrganismos resistentes são essenciais. Além disso, a busca por novos metabólitos ativos, contra diferentes microrganismos patogênicos, deve ser ativa e contínua (GUIMARÃES et al., 2010).

2.8. Alternativas para a terapia da mastite

Devido ao aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, há uma busca por alternativas que reduzam a seleção de patógenos resistentes, tais como o *Staphylococcus aureus*. Vários antimicrobianos podem ser utilizados no tratamento da mastite, porém, é importante destacar que o uso indiscriminado do produto pode, dentre outras coisas, contribuir para o aumento da resistência bacteriana. Assim, uma alternativa bastante viável seria o uso de fitoterápicos para o tratamento da enfermidade (KLOCKE et al., 2010).

As propriedades terapêuticas dos produtos fitoterápicos estão ganhando cada vez mais espaço no tratamento de doenças envolvendo microrganismos em razão das muitas vantagens que oferecem, dentre elas a possível diminuição nas reações adversas durante o tratamento, diminuição da seleção de microrganismos resistentes, redução de custos, além de evitar a eliminação de resíduos no leite (OLIVEIRA et al., 2010; SCHIAVON et al., 2011).

Várias regiões do Brasil apresentam plantas com potencial fitoterápico. A vegetação da Caatinga, por exemplo, por conta de suas características peculiares, apresenta um enorme potencial. Entretanto, ainda são necessários mais estudos acerca do potencial terapêutico dos seus vegetais. Dentre as espécies desse bioma, a jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) é abundante e bastante utilizada como forrageira, sendo apreciada como alimento por caprinos, ovinos e bovinos, principalmente na estação seca, quando não há pastagens para sua alimentação (BEZERRA et al., 2011; FREITAS et al., 2010).

A fitoterapia é considerada uma alternativa interessante para o tratamento da mastite, onde estudos *in vitro* visando à determinação do potencial antimicrobiano de plantas pertencentes à flora brasileira, já vêm demonstrando resultados satisfatórios (ALBUQUERQUE et al., 2007; BEZERRA et al., 2009; MOURA et al., 2013). Além disso, a atividade antibacteriana de extratos naturais de plantas e de alguns de seus compostos vem sendo demonstrada frente aos isolados obtidos de casos de mastite (SCHUCH et al., 2008; BASKARAN et al., 2009).

2.9. *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret

A região semiárida brasileira é uma importante ecorregião da Caatinga que fornece as condições bióticas e abióticas necessárias para que muitas espécies endêmicas habitem; permitindo a presença de alta diversidade de espécies quando comparado com outras regiões semiáridas do mundo (ALVES et al., 2009; SANTOS et al. 2011).

A *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret, popularmente conhecida no Brasil como “jurema-preta”, é uma planta típica das áreas semiáridas do Brasil, pertence à família Mimosaceae de grande importância no domínio da caatinga no semiárido nordestino, (SOUZA; RODAL, 2010). Cresce de 2,5 a 5,5m de altura, sendo considerada uma arvoreta de porte arbustivo. Possui caule ereto ou levemente inclinado, com ramificação abundante,

desprendendo-se em porções delgadas escamiformes e ramos castanho-avermelhados, esparsamente aculeados. As suas folhas são compostas, alternas, bipinadas, com folíolos muito pequenos com 5 a 7 pares de pinas e 18 a 36 pares de folíolos por pina (Figura 1) (QUEIROZ et al., 2009).

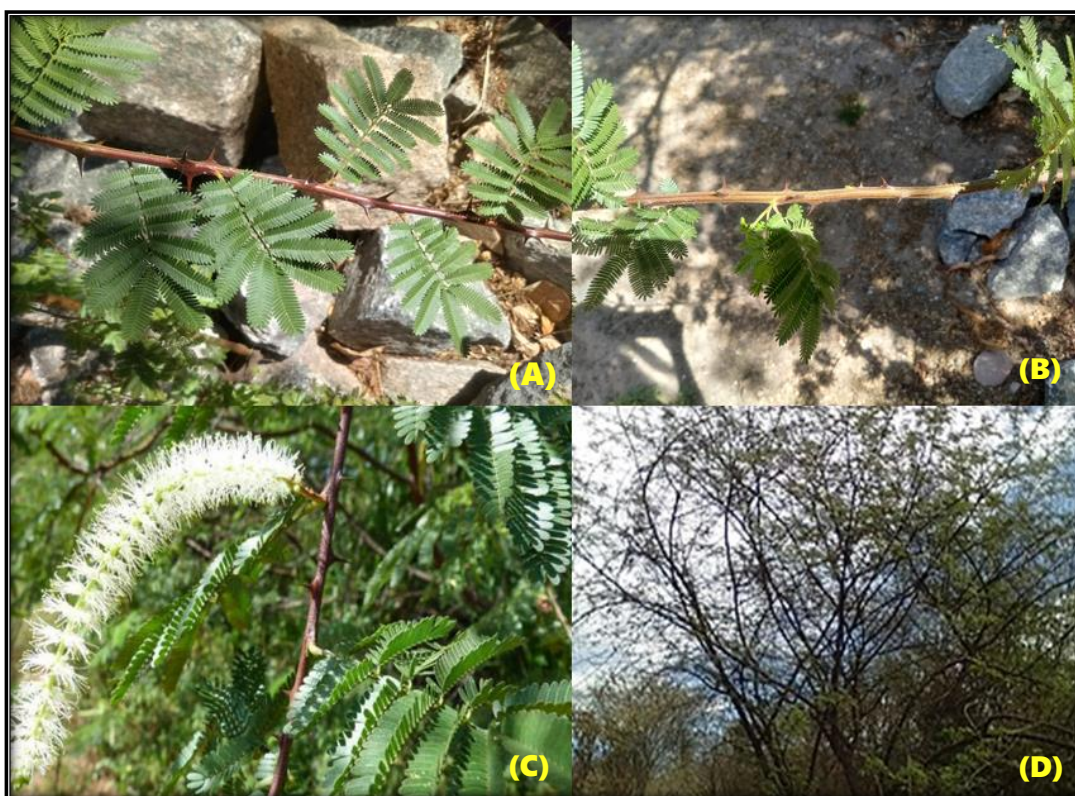


Figura 2. *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. – Jurema preta. (A): Folhas; (B): Espinhos; (C): Flor; (D): Planta inteira. (Foto: Autoria própria. 2017).

É uma espécie xerófita de hábito arbustivo-arbóreo, indicadora de estágio de sucessão secundária progressiva ou de recuperação, amplamente disseminada pelas diferentes fitofisionomias de caatinga do nordeste brasileiro, congregando inúmeras potencialidades (CALIXTO JUNIOR et al., 2011).

No Nordeste do Brasil, é uma árvore comum, rica em vários metabólitos secundários (fenóis, saponinas, taninos e flavonóides) que tem sido amplamente utilizada contra bronquite, tosse, febre, dor de cabeça e úlceras cutâneas (SILVA et al. 2012). Estudos

mostram que extratos aquosos e etanólicos da casca de jurema preta demonstraram atividade antimicrobiana contra uma série de patógenos (BORGES et al., 2013) além de apresentar atividade cicatrizante e anti-inflamatória (BEREITER et al., 2008; CRUZ et al., 2016) bem como potencial antioxidante e antinociceptivo (CARTAXO et al., 2010; PAIVA et al., 2013).

Mimosa tenuiflora, planta endêmica do bioma Caatinga, tem sido estudada como agente antimicrobiano em diversas pesquisas e apresentou resultados muito satisfatórios contra diferentes tipos de microrganismos (BEZERRA et al., 2009; PADILHA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013).

Estudos com plantas do bioma Caatinga, incluindo *M. tenuiflora*, têm demonstrado que alguns compostos fenólicos (como flavonoides e taninos) presentes nas mesmas, são responsáveis por importantes propriedades farmacológicas, tais como: atividade cicatrizante, anti-inflamatória, antifúngica, antioxidante, bactericida e bacteriostática (BEZERRA et al., 2011; BORGES et al., 2013).

RIVERA-ARCE et al., (2007) avaliaram as propriedades antimicrobianas da casca do caule de *M. tenuiflora* e demonstraram uma grande ação inibitória dos extratos etanólico e hidroalcoólico contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos dermatófitos. Outros estudos, também com a casca do caule, confirmaram suas propriedades farmacológicas e mostraram uma excepcional atividade antimicrobiana do extrato etanólico contra estirpes bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. (PEREIRA et al., 2009; PADILHA et al., 2010; BEZERRA et al., 2011). Sua composição química tem atraído um considerável interesse, principalmente devido à presença de alcaloides indólicos, taninos e flavonoides (SOUZA et al., 2008).

Apesar de a planta estar apresentando resultados satisfatórios quanto ao seu potencial antimicrobiano, os estudos sobre seu efeito na formação de biofilmes bacterianos são muito

escassos, sendo de grande relevância a realização de pesquisas sobre tal assunto, já que estratégias para controle de biofilmes podem contribuir com a produção de subsídios para sua aplicação na terapia dos animais (MILLEZI et al., 2013).

2.10. Agentes antibiofilme

Estratégias para controle de biofilmes podem interferir na formação dessas estruturas em superfícies, pois um dos maiores problemas é a ocorrência de multiplicação de cepas altamente virulentas e resistentes (MILLEZI et al., 2013).

Na forma de biofilme, as bactérias são mais resistentes a vários tratamentos antimicrobianos, podendo sobreviver a condições adversas e suportar o sistema imunológico do hospedeiro. Dessa forma, há necessidade de novas opções de tratamento de infecções associadas a biofilmes. No entanto, ainda há um grande desafio no desenvolvimento de agentes que combatam o biofilme e, até o momento, nenhuma substância antibiofilme foi registrada ou está em uso clínico, o que torna o tratamento de infecções relacionadas com biofilmes muito difícil (RABIN et al., 2015).

Vários mecanismos estão envolvidos na inibição ou erradicação de biofilmes. Dentre eles pode-se citar: (1) degradação de componentes da matriz polimérica pela ação de enzimas (como proteases, carbohidrases, nucleases específicas aos componentes da matriz); (2) moléculas anti-adesivas (capazes de alterar a interação das células com a superfície); (3) inibição das moléculas responsáveis pela regulação do *quorum-sensing*, (4) inibição de fatores de virulência ou de adesão como pili, flagelos, adesinas, entre outros (RENDUELES e GHIGO, 2012).

Pesquisas estão sendo desenvolvidas para lançamento de agentes antibiofilme que não apresentam toxicidade, pois acredita-se que os mesmos não induzirão resistência aos medicamentos. A maioria das moléculas antibiofilme que foram desenvolvidas têm sido

inspiradas em produtos naturais ou modificações de moléculas de sinalização que regulam a formação de biofilmes (RABIN et al., 2015). Os produtos naturais podem fornecer uma disposição diversa de estruturas químicas e possuir uma variedade larga de propriedades biológicas. Dessa forma, os mesmos são explorados mundialmente na busca de novos produtos farmacêuticos (BUOMMINO et al., 2014).

Pesquisas voltadas para a descoberta de novos compostos capazes de inibir biofilmes são de grande importância sendo que os produtos naturais continuam a despertar o interesse para o desenvolvimento de componentes com estruturas e atividade biológica interessantes (RABIN et al., 2015). Muitos compostos antibiofilme foram identificados a partir de diversas fontes naturais e esses produtos têm colaborado com o desenvolvimento de uma multiplicidade de agentes terapêuticos sintéticos (GARO et al., 2007; WU et al., 2011; LEE et al., 2011).

Estudo feito por Coenye et al. (2012) demonstrou que dos 119 extratos de plantas testados, apenas cinco (*Epimedium brevicornum*, *Malus pumila*, *Polygonum cuspidatum*, *Rhodiola crenulata*, e *Dolichos lablab*) mostraram uma potente atividade antibiofilme. Já Trentin et al. (2011) avaliaram 45 extratos aquosos de 24 espécies de plantas da Caatinga contra *Staphylococcus epidermidis* e concluíram que polifenóis, cumarinas, esteróides e terpenos podem atuar como possíveis compostos ativos envolvidos com os efeitos dos extratos, afirmando que estes podem ser considerados alternativas importantes para combater esse microrganismo.

Dessa forma, para tentar reduzir ou até mesmo eliminar a formação do biofilme e, conseqüentemente, reduzir a resistência aos antibióticos de bactérias causadoras de mastite, são necessários estudos para analisar quais possíveis substâncias podem atuar contra a formação do biofilme. Nesse sentido, o extrato de plantas medicinais surge como uma importante alternativa para controlar a formação do biofilme, reduzindo a resistência

bacteriana aos antimicrobianos tradicionais e possibilitando melhor tratamento da doença nos rebanhos (BRAMBILLA et al., 2017).

2.11. Sinergismo de drogas antimicrobianas com fitoterápicos

O aumento da resistência microbiana às drogas existentes é um problema sério e, portanto, existe a necessidade de buscar novas alternativas de substâncias antibacterianas, especialmente a partir de fontes naturais (PAREKH e CHANDA, 2007). Uma alternativa viável seria a utilização de extratos de plantas medicinais. Há muitas vantagens no uso de compostos antimicrobianos a partir dessas plantas, dentre elas: (i) menos reações adversas esperadas, (ii) melhor tolerância do animal, (iii) maior economia, (iv) melhor aceitação devido à longa história de uso e (v) ser renovável por estar disponível na natureza (OLIVEIRA et al., 2007; SILVA et al., 2007; PAREKH e CHANDA, 2007).

O uso de plantas medicinais pode ser bastante interessante do ponto de vista antimicrobiano. No entanto, em associação com agentes antimicrobianos, os resultados podem ser ainda melhores, pois é possível potencializar a capacidade de aumento da eficácia de antibióticos. A combinação de substâncias antimicrobianas tem sido empregada para diversos fins, principalmente para reduzir a toxicidade relacionada à dose do antibiótico em virtude do uso de doses reduzidas de cada substância ativa; na terapêutica de infecções por múltiplos patógenos; e também para prevenir ou retardar a emergência *in vivo* de subpopulações resistentes a antibióticos (MACEDO et al., 2013). Dessa forma, a interação mais desejada entre fármacos é a do tipo sinérgica, a qual consiste numa interação positiva onde o uso combinado de duas ou mais substâncias produz um efeito combinado maior do que aquele observado quando se utiliza cada antimicrobiano de modo separado (SEGATORE et al., 2012). O efeito sinérgico acontece, provavelmente, em função da formação de um determinado complexo que se torna mais eficaz na inibição de uma espécie particular de

microrganismo, seja inibindo a síntese da parede celular ou provocando sua lise (CHANDA e RAKHOLYA, 2011).

O efeito sinérgico contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos já foi comprovado, mostrando que a atividade antimicrobiana de drogas em combinação com fitoterápicos apresentou melhores resultados quando comparada ao teste somente com antimicrobianos, sugerindo que o sinergismo é uma boa opção contra determinados microrganismos se comparado com algumas drogas sintéticas (AHMED et al., 2010; FERNANDES et al., 2012).

Assim sendo, devido ao aumento da prevalência de microrganismos resistentes a múltiplas drogas, os testes de sinergismo empregando várias combinações de substâncias de origem natural com agentes antimicrobianos, podem ser uma importante ferramenta para que se faça uso de uma terapia antimicrobiana mais eficaz e menos tóxica (MACEDO et al., 2013), sendo que essa associação entre extratos de plantas e drogas também pode expandir o espectro antimicrobiano bem como evitar o aparecimento de resistência mutante (CHANDA; RAKHOLIYA, 2011).

Capítulo I

Submetido para publicação no periódico **Applied Microbiology and Biotechnology**

(Qualis Capes (Biotecnologia): A2 / Fator de impacto: 3,340)

Efeito sinérgico do extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora* frente a *Staphylococcus aureus* de leite bovino

Marielly Bastos Cavalcante^{1*}, Renata de Moraes Peixoto Araújo², Noelly Bastos Cavalcante¹,
Tania Maria Sarmento da Silva³, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida⁴, Mateus
Matiuzzi da Costa⁵.

*Autor para correspondência. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. Brasil. Email: mari.cavalcante@yahoo.com.br. Telephone number: +55 87 98826-8729

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Recife-PE. Brasil. Email: lys.cavalcante@hotmail.com

²Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, Campus Patos-PB. Brasil. Email: renatavet_peixoto@hotmail.com

³Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Recife-PE. Brasil. Departamento de Ciências Moleculares. Email: sarmentosilva@gmail.com

⁴Universidade Federal do Vale do São Francisco-UNIVASF, Petrolina-PE. Brasil. Colegiado de Ciências Farmacêuticas. Email: jackson.guedes@univasf.edu.br

⁵Universidade Federal do Vale do São Francisco-UNIVASF, Petrolina-PE. Brasil. Colegiado de Zootecnia. Email: mateus.costa@univasf.edu.br

Resumo

Atualmente, um número elevado de infecções por *Staphylococcus aureus* tem se tornado cada vez mais persistente e os variados tipos de antibióticos que têm sido usados no tratamento da mastite tornaram-se menos eficazes ou até mesmo ineficazes para esta bactéria resistente. Nesse sentido, o desenvolvimento de novas terapias, eficientes e de menor custo, é extremamente necessário. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito sinérgico e

antimicrobiano do extrato etanólico bruto (EEB) de *Mimosa tenuiflora* contra *S. aureus* de leite bovino. Foram utilizados 58 isolados bacterianos da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco. Testes fenotípicos foram realizados em microplacas para avaliar a concentração bactericida mínima (CBM), bem como o efeito da associação do extrato etanólico de *M. tenuiflora* com oxacilina contra *S. aureus*. No teste em microplacas, a atividade antimicrobiana do extrato foi observada em 100% dos isolados. Em combinação com a oxacilina, observou-se que a CBM para o extrato foi 32 vezes menor para todos os isolados, mostrando uma redução de 96,87% do valor do CBM. Para oxacilina, o valor médio de redução de CBM foi de 86%. A caracterização química do EEB revelou a presença de várias classes de metabólitos, com destaque para os compostos fenólicos. Foi possível identificar taninos hidrolisáveis e o flavonoide luteolina. Em conclusão, o EEB apresentou atividade antimicrobiana para todos os isolados de *S. aureus* testados. As concentrações de CBM do extrato e oxacilina apresentaram uma redução expressiva, mostrando um efeito sinérgico quando ambos foram testados em associação.

Palavras-chave: bactéria, resistência, produto natural, jurema preta, *Checkerboard*.

Introdução

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro e rico em endemismos, onde muitas de suas espécies vegetais apresentam potencial medicinal, e possuem em sua constituição química substâncias capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, o que vem despertando o interesse científico ao longo dos anos (MESQUITA et al., 2017). É crescente o interesse de diferentes áreas de estudo acerca dessas plantas, em busca de novas moléculas bioativas com atividades biológicas interessantes. Para Bezerra et al. (2011) isso se deve ao aumento de microrganismos resistentes às drogas antimicrobianas convencionais, o que vem desafiando a ciência e causando sérios riscos à saúde pública em todo o mundo.

Elevado número de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina/oxacilina (MRSA), tem se tornado cada vez mais persistente e muitos antibióticos que vêm sendo utilizados no tratamento da mastite tornaram-se menos eficazes ou até mesmo ineficazes para esta bactéria resistente (DeLEO et al., 2010). Dessa forma, o desenvolvimento de novas terapias, eficientes e de menor custo, é extremamente necessário.

Infelizmente, o desenvolvimento de novos antibióticos torna-se mais difícil, visto que as atuais terapias estão perdendo sua eficácia (BROOKS et al., 2014). Isto pode ser demonstrado pelas infecções causadas por MRSA, que costumam ser mais resistentes à diversas classes de antibióticos e responsável por várias enfermidades, dentre elas a mastite (BOUCHER et al., 2010; LIN et al., 2013).

Diante disso, uma alternativa mais segura e de menor custo seria intercalar um antimicrobiano, usado comumente no tratamento da enfermidade, com uma planta que possua propriedades medicinais visando obter efeito sinérgico, reduzindo as doses do antibiótico e, conseqüentemente, reduzindo custos. *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae), por exemplo, tem sido estudada como agente antimicrobiano em diversas pesquisas e apresentou resultados bastante significativos contra diferentes espécies de microrganismos (BEZERRA et al., 2009;

PADILHA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013). O uso dessa planta em associação com antibióticos poderia ser uma alternativa para combater a resistência que as bactérias apresentam aos antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite, por exemplo.

Diferentes estudos já comprovaram o efeito sinérgico contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, mostrando que a atividade antimicrobiana de drogas em combinação com fitoterápicos apresentou melhores resultados quando comparada ao teste somente com antimicrobianos, sugerindo que o sinergismo é uma boa opção contra determinados microrganismos se comparado com algumas drogas sintéticas (AHMED et al., 2010; FERNANDES et al., 2012).

Assim, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a atividade antimicrobiana e efeito sinérgico do extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora* e da oxacilina frente a isolados de *Staphylococcus aureus* oriundos de leite bovino.

Metodologia

Amostras bacterianas

Foram utilizadas 58 cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino em pesquisa anterior e que se encontravam armazenadas na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF – campus Ciências Agrárias. Todos esses isolados foram obtidos a partir de pesquisa realizada por Araújo et al. (2017).

Coleta, identificação e processamento do material botânico

Cascas do caule de *Mimosa tenuiflora* (550 g) foram coletadas em área de caatinga preservada nas dependências do Centro de Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD) – localizado na Univasf campus Ciências Agrárias (S 09°19'35,43" / W 040°32'53,106"), em

março de 2017, no município de Petrolina-PE. Galhos da planta (contendo folhas e flores) também foram coletados e levados ao Herbário Vale do São Francisco (HVASF), onde a identificação botânica se deu por comparação das amostras coletadas com uma exsicata da espécie, depositada sob número de tombo 21491.

Para o processamento do material vegetal, este foi levado ao Núcleo de Estudos e Pesquisas em Plantas Mediciniais (NEPLAME) – UNIVASF para processamento. Inicialmente, o material foi submetido à secagem em estufa com ar circulante à temperatura média de 45 °C durante 7 dias. Após essa etapa, obteve-se um rendimento de 350 g de material seco. Posteriormente, foi realizada a trituração do material com auxílio de moinho de facas, obtendo-se o material vegetal seco em pó, com rendimento de 298,6 g.

Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB)

O material vegetal seco e em pó (298,6 g) foi submetido à maceração exaustiva, utilizando como solvente etanol 95% em percolador de aço inoxidável, com renovação do solvente a cada 72 h. Sucessivas extrações foram realizadas, até seu máximo esgotamento. Após este processo, a solução extrativa passou por um processo de destilação do solvente em evaporador rotativo à pressão reduzida, à uma temperatura média de 50 °C, obtendo-se, ao final, 84,95 g do extrato etanólico bruto de *Mimosa tenuiflora* (EEBMT).

Triagem fitoquímica preliminar

A análise fitoquímica preliminar, também conhecida como *screening*, teve como objetivo detectar as principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico bruto de *M. tenuiflora*. As técnicas usadas para este fim são baseadas em reações químicas que exibem características universais para cada uma das diferentes classes de metabólitos secundários investigadas. As metodologias utilizadas foram baseadas em um

método proposto por Wagner e Bladt (1996), sendo realizadas em pequena escala e em tubos de ensaio, onde os resultados são observados através de reações das amostras com soluções de reagentes específicos para cada classe de metabólito, as quais promovem alterações de cor ou formação de precipitados. Para isso, foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) que possui, como ponto favorável, a possibilidade de comparação dos extratos e fases investigadas com padrões de metabólitos secundários disponíveis no mercado. Na CCDA, pequenas alíquotas do extrato (e fases), solubilizadas em solventes adequados, foram aplicadas com o auxílio de um capilar de vidro em placas de camada delgada com suporte de alumínio e com sílica gel como fase estacionária. Misturas de solventes em proporções adequadas para cada classe investigada foram usadas como fases móveis. Após a eluição, as placas foram reveladas com reagentes específicos e/ou analisadas em câmara de UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm (OLIVEIRA et al., 2010; SIMÕES et al., 2010; BRAZ et al., 2011).

Extração e análise do EEBMT por UPLC-DAD-QTOF-MS/MS

Para a análise por UPLC-DAD-QTOF-MS/MS, o EEBMT foi extraído em SPE C-18 (extração em fase sólida). O cartucho foi previamente ativado utilizando 10 mL de metanol e 10 mL de água ultrapura. Cerca de 300 mg do extrato foram solubilizados em 500 µL de água acidificada (pH=2 com HCl) e 500 µL de MeOH. Após a aplicação do extrato no cartucho, foram adicionados 10 mL de água ultrapura e logo em seguida a fração com os compostos orgânicos foi eluído com 10 mL de metanol. O solvente foi evaporado, obtendo-se a fração metanólica. Esta fração foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado a Espectrometria de Massas com analisador híbrido Quadrupolo-Tempo de Voo (UPLC-DAD-QTOF-MS/MS). Foi utilizado o espectrômetro de massas XEVO-G2XSQTOF (Waters, Manchester, UK) conectado ao Sistema ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA,

USA) com a interface ionização por eletrospray (ESI). A separação cromatográfica das substâncias foi realizada em UPLC com autoinjeter condicionado a 4 °C, usando uma coluna Acquity BEH C18 column (50 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 µm) (Waters, Milford, MA, USA). A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. A fase móvel consistiu de água 0,1% de ácido fórmico (solvente A), acetonitrila 0,1% de ácido fórmico (solvente B) e fluxo de 0,4 mL/min. O gradiente de eluição foi: 0-8 min, 10-50% B; 0.8-9 min, 50-95% B. Foram injetados 10 µL. O espectrômetro de massas XEVO-G2XSQTOF foi usado no modo negativo com scan de 50 a 1200 m/z para a aquisição dos dados em MSE, que permite obter os íons tanto do composto como dos precursores em uma mesma injeção. As condições para a aquisição foram: voltagem do capilar de 3.0 kV; temperatura do cone da amostra 100 °C, temperatura de desolvatação 250 °C, velocidade do fluxo de gás no cone 20Lh⁻¹ e velocidade do fluxo de gás (N₂) da desolvatação 600Lh⁻¹. Todas as análises foram feitas utilizando o lockspray. Leucina-encefalina (10 ngmL⁻¹) foi utilizada como composto de referência padrão para calibrar o espectrômetro de massas durante as análises e introduzidas no lockspray a 10 µLmin⁻¹ para a acurácia na aquisição dos dados. Todas as aquisições e análises dos dados foram controlados usando o software Waters MassLynx v 4.1.

Determinação da atividade antibacteriana do EEBMT

Para determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato, foram adotadas as descrições de Santurio et al. (2007). Para isso, as colônias bacterianas foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de solução salina até a obtenção de turvação. Esses tubos foram levados ao espectrofotômetro onde, através do comprimento de onda de 546 nm, foi feita a leitura dos mesmos. A turvação ideal foi aquela correspondente à densidade óptica (D.O) entre 0,300 e 0,400 (1,36x10⁸ UFC/mL). De cada tubo, foram retirados 100 µL da solução turvada e inoculados em tubos contendo 9,9 mL de caldo Mueller Hinton (MH). Por fim, 10

μL (1×10^4 UFC) dessa suspensão foram inoculados em cada poço da microplaca contendo a diluição do extrato, que iniciou na concentração de $5000 \mu\text{g/mL}$ até $39 \mu\text{g/mL}$. O material foi incubado a $37 \text{ }^\circ\text{C}/24 \text{ h}$ e, após esse tempo, com o auxílio de um replicador, as amostras bacterianas de cada uma das diluições foram inoculadas na superfície de placas contendo ágar MH e incubadas por 24 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Na sequência, foi determinada a concentração bactericida mínima (CBM) como a menor concentração do extrato vegetal capaz de causar a morte do inóculo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Determinação da atividade antibacteriana da oxacilina

Os isolados de *S. aureus* foram submetidos ao teste de suscetibilidade à oxacilina, utilizando-se a mesma metodologia (microdiluição em placas) descrita anteriormente para o EEBMT. Foram avaliadas oito diluições do antimicrobiano partindo da concentração de $15,625 \mu\text{g/mL}$ até $0,12 \mu\text{g/mL}$. A CBM foi considerada como sendo a menor concentração do antibiótico capaz de causar a morte do inóculo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Análise de sinergismo pela técnica *Checkerboard*

Para realizar esse teste, foram selecionadas as cepas com os maiores valores da CBM para a oxacilina, totalizando 15 amostras. Após a seleção, realizou-se uma suspensão bacteriana, em tubos contendo 5 mL de caldo MH, a partir dos isolados cultivados em placas contendo ágar MH. Os tubos foram colocados em estufa por 24 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Após esse tempo, foram retirados $300 \mu\text{L}$ de cada tubo sendo transferido para outros tubos contendo solução salina $0,85\%$ para atingir a turvação equivalente a escala $0,5$ de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Uma alíquota de $10 \mu\text{L}$ dessa nova suspensão foi adicionada em todos os poços da microplaca já contendo o meio MH e as diluições do extrato e do antibiótico.

As diluições foram realizadas da seguinte maneira: na coluna 6, adicionou-se 100 μL da oxacilina, na concentração de 4X o valor da CBM; para a realização da diluição seriada foram transferidos, sequencialmente, 100 μL do volume do poço, no sentido horizontal, até a coluna 1. Já a diluição do extrato foi realizada adicionando-se 100 μL na concentração de 2X o valor da CBM no primeiro poço da linha 'A' da microplaca. Após esta etapa, foram transferidos, sequencialmente, 100 μL do volume do poço no sentido vertical até a linha 'F' (Figura 1). Acrescentou-se em cada poço da placa de microdiluição 10 μL da suspensão bacteriana. Nos poços H1, H2 e H3 foram adicionados apenas os 10 μL da suspensão bacteriana, juntamente com 100 μL de meio MH e nos poços H4, H5 e H6 foram adicionados apenas 100 μL do meio MH, servindo como controle de esterilidade do processo. As microplacas foram incubadas por 24 h a 37 $^{\circ}\text{C}$.

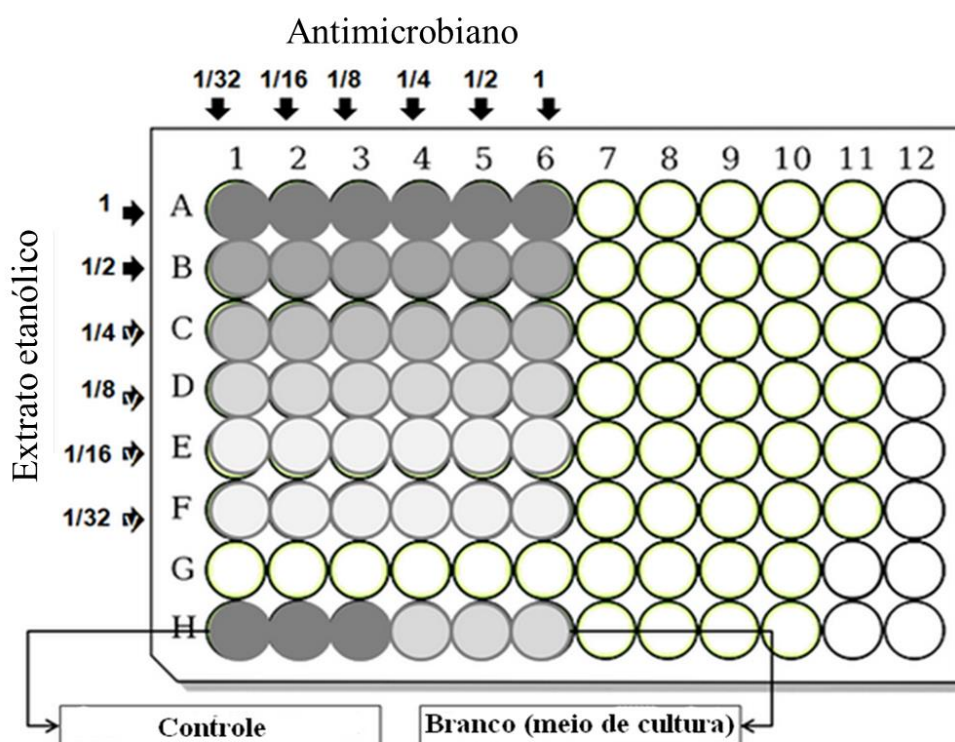


Figura 1. Esquema da metodologia *checkerboard*. Na coluna seis (6) é o início da diluição em série do antimicrobiano a partir de uma concentração de 4X o valor da CBM que obtém no final seis diluições referentes a 1x, 1/2x, 1/4x, 1/8x, 1/16x e 1/32x do valor da CBM até a coluna um (1). Na linha "A" é o início da diluição em série do produto natural, na concentração de 2X o valor da CBM até a linha F, obtendo no final os mesmos padrões de diluições referentes ao valor da CBM.

Em seguida, com auxílio de um replicador multicanal, o conteúdo de cada poço da microplaca foi transferido para placas contendo ágar MH, incubando-as novamente por mais 24 h a 37 °C. A interpretação do efeito sinérgico de cada antimicrobiano e das combinações foi determinada pelo cálculo do Índice da Fração Inibitória (IFI), por meio da seguinte fórmula:

$$\Sigma IFI = IFI \text{ PN} + IFI \text{ ATM}$$

Onde:

$$\text{IFI do produto natural (PN)} = \frac{\text{CBM combinado}}{\text{CBM do PN sozinho}}$$

$$\text{IFI do antimicrobiano (ATM)} = \frac{\text{(CBM combinado)}}{\text{CBM do ATM sozinho}}$$

A somatória dos IFIs foi utilizada para a classificação dos efeitos, de acordo com alguns critérios: Ação sinérgica ($IFI \leq 0,5$); Aditiva ($0,5 < IFI \leq 1$); Indiferente ($1 < IFI < 2$); Antagônico ($IFI \geq 2$) (LEE et al., 2012).

Resultados

Caracterização química do extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora*

Na tabela 1, encontram-se os resultados obtidos após a realização da triagem fitoquímica do extrato etanólico bruto de *M. tenuiflora*.

Tabela 1. Resultado da análise da triagem fitoquímica do Extrato Etanólico Bruto (EEB) de *Mimosa tenuiflora* (jurema preta).

Grupo químico	EEB <i>Mimosa tenuiflora</i>
Alcaloides	-
Antocianinas	+++
Antraquinonas	-
Compostos fenólicos	++
Cumarinas	-
Derivados antracênicos	+++
Lignana	+++
Mono, sesqui e diterpenos	-
Naftoquinonas	-
Saponinas	+++
Taninos condensados	-
Taninos hidrolisáveis	+++
Triterpenos/esteróis	+
Xantinas	+

(-): ausência do constituinte químico; (+) menor concentração; (++) concentração moderada; (+++) maior concentração.

Com relação às análises por cromatografia, os cromatogramas de UPLC-DAD (290 nm) e íon pico base (BPI) revelaram a presença de 14 compostos fenólicos, descritos na Tabela 2 e que podem ser observados na Figura 2.

Tabela 2: Constituintes químicos identificados por UPLC-DAD a partir da análise do extrato etanólico bruto de *M. tenuiflora*.

Pico	TR (min)	λ max (nm)	Composto
1	0,77	279	Digalato trímero de procianidina
2	0,90	279	Digalato trímero de procianidina
3	1,11	279	Digalato trímero de procianidina
4	1,50	279	Digalato trímero de procianidina
5	1,89	279	Digalato trímero de procianidina
6	2,22	279	Digalato trímero de procianidina
7	2,65	279	Digalato trímero de procianidina
8	2,71	279	Digalato trímero de procianidina
9	2,74	279	Digalato trímero de procianidina
10	2,90	279	Digalato trímero de procianidina
11	3,05	279	Digalato trímero de procianidina

12	3,12	279	Digalato trímico de procianidina
13	3,21	279	Trímico de procianidina
14	4,38	245	Luteolina

(TR): tempo de retenção; (λ máx.): Comprimento de onda de absorção máximo; (nm): nanometro

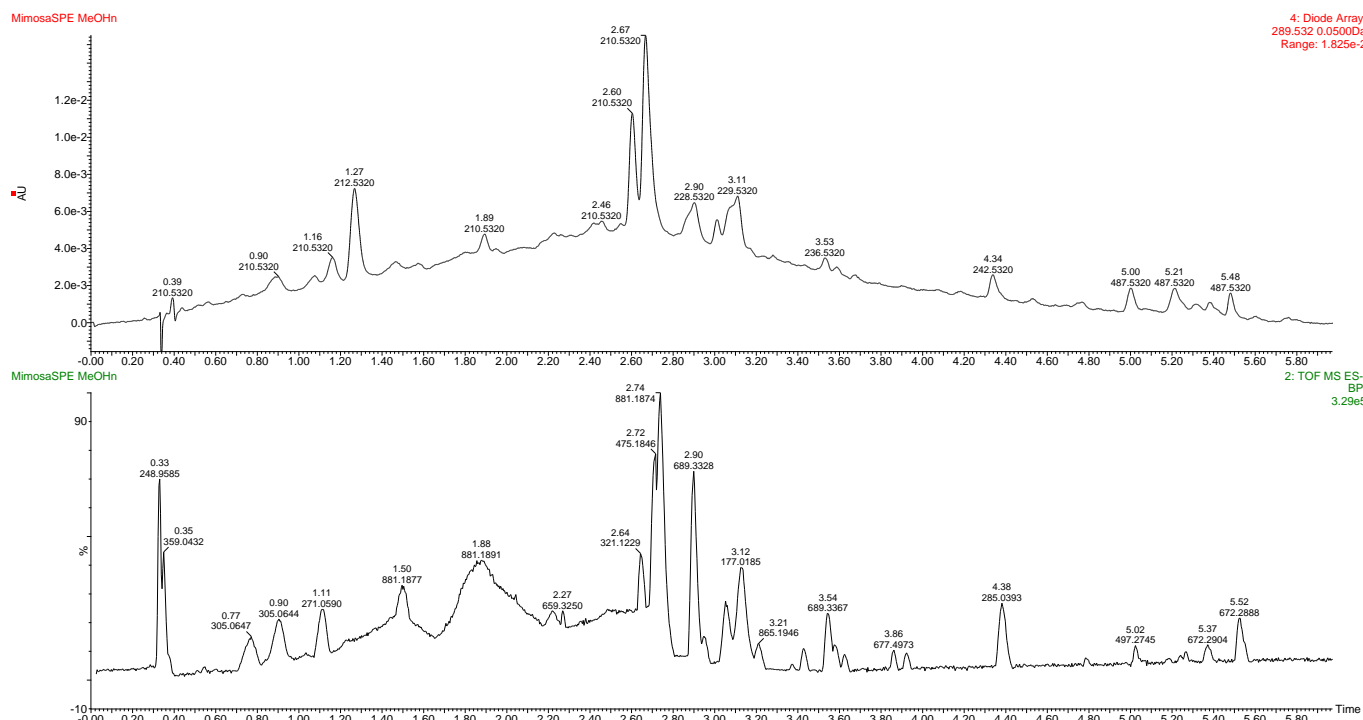


Figura 2. UPLC-DAD (290 nm) do extrato de *Mimosa tenuiflora* (A). Cromatograma de íons base (B) obtido por UPLC-qTOF-MS^E em modo negativo.

Os compostos foram identificados pelos dados obtidos através das absorções em UV máximo, picos dos íons pseudomoleculares e as fragmentações obtidas por MS/MS. Foram identificados 14 principais compostos, sendo 13 taninos condensados e um flavonóide. Os compostos 1 a 12 (tempos de retenção: 0,77; 0,90; 1,11; 1,50; 1,89; 2,22; 2,65; 2,71; 2,74; 2,90; 3,05 e 3,12) apresentaram os mesmos valores de UV máximo em 279 nm e íons pseudomoleculares em m/z 1169.2520 $[M-H]^-$, correspondendo à fórmula molecular $C_{59}H_{46}O_{26}$. Os principais fragmentos MS² mostrados foram: m/z 1017,2135 $[M-H-galoiil]^-$, 881,1890 $[M-H-procianidina]^-$, 593,1296 $[M-H-2procianidina]^-$ e 305,0663 $[M-H-$

3procianidina]⁻. Com base nos dados obtidos pelo padrão de fragmentação e comparação com os dados da literatura (ROCKENBACH et al., 2012), foi possível identificar os 12 isômeros como sendo digalatos trímeros de procianidina. O composto 13 (tempo de retenção 3,21) com UV máximo 279 nm e pico do íon pseudomolecular em m/z 865.1979 [M-H]⁻ foi identificado como trímero de procianidina (C₄₅H₃₈O₁₈). Este tanino apresentou os picos MS² em m/z 576,1252 [M-H-procianidina]⁻ e m/z 287,0558 [M-H-2procianidina]⁻. O flavonóide com tempo de retenção em 4,38 (14) foi identificado como sendo a luteolina baseado no espectro de UV com máximo de 245 nm e pico do íon pseudomolecular em m/z 285.0393.

Atividade antibacteriana do EEB de *Mimosa tenuiflora*

O extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana em 100% (n=58/58) dos *S. aureus*. Com relação aos resultados da CBM, os mesmos apresentaram resposta em quatro concentrações do extrato, sendo que a concentração de 312,5 µg/mL foi considerada a CBM para a maioria dos isolados (39/58) (Figura 3).

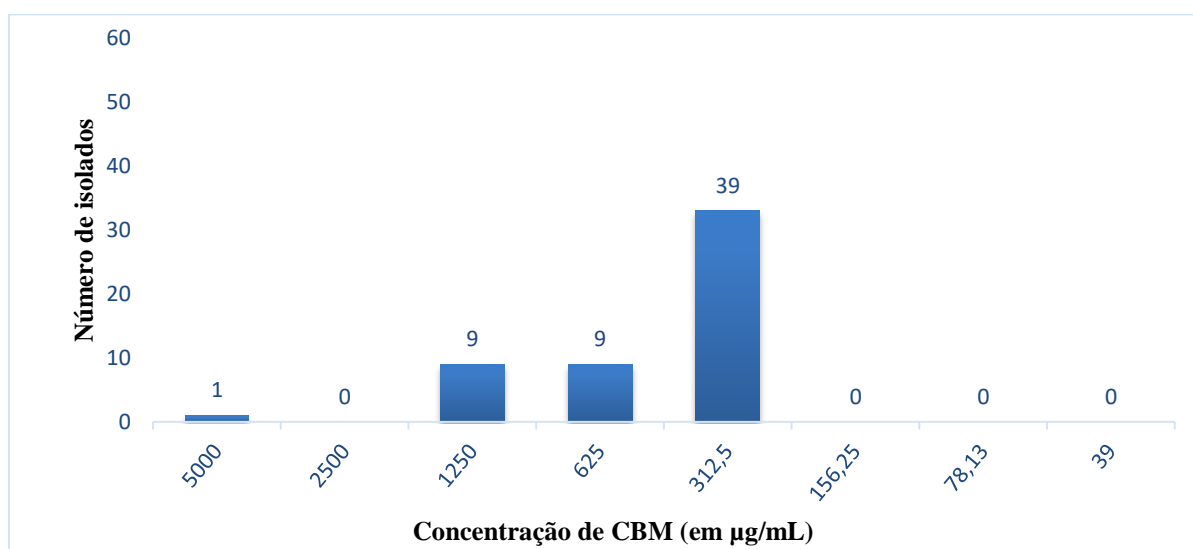


Figura 3. Valores de Concentração Bactericida Mínima do extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora* frente a isolados de *Staphylococcus aureus*.

Atividade antibacteriana da oxacilina

A oxacilina também apresentou atividade antimicrobiana em 100% (n=58/58) dos *S. aureus*. Com relação aos resultados da CBM, os mesmos apresentaram resposta em quatro concentrações, sendo que a concentração de 0,49 µg/mL foi considerada a CBM para a maioria dos isolados (29/58) (Figura 4).

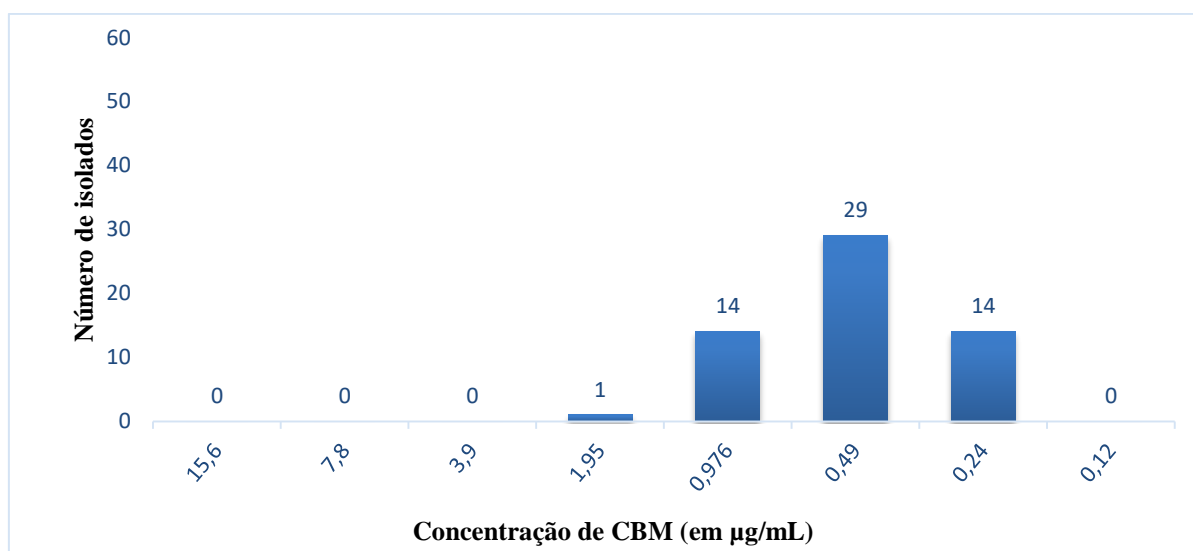


Figura 4. Valores de Concentração Bactericida Mínima da oxacilina frente a isolados de *Staphylococcus aureus*.

Análise de sinergismo pela técnica Checkerboard

A atividade antibacteriana e o efeito sinérgico do extrato e da oxacilina, isoladamente e em combinação, frente a cepas de *S. aureus* são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Efeito sinérgico do EEBMT com a oxacilina sobre *Staphylococcus aureus* de leite bovino.

Isolado (n° de referência)	Substância testada	CBM (µg/mL) Sozinho/combinado	IFI	∑IFI	Resultado
<i>S. aureus</i> (05)	EEB	312,5 / 9,76	0,0312	0,093	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,061	0,0625		
<i>S. aureus</i> (12)	EEB	312,5 / 9,76	0,0312	0,093	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,061	0,0625		

<i>S. aureus</i> (20)	EEB	312,5 / 9,76	0,0312	0,156	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,122	0,125		
<i>S. aureus</i> (22)	EEB	312,5 / 9,76	0,0312	0,156	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,122	0,125		
<i>S. aureus</i> (23)	EEB	312,5 / 9,76	0,0312	0,156	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,122	0,125		
<i>S. aureus</i> (24)	EEB	312,5 / 9,76	0,0312	0,156	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,122	0,125		
<i>S. aureus</i> (41)	EEB	312,5 / 9,76	0,0312	0,093	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,061	0,0625		
<i>S. aureus</i> (49)	EEB	312,5 / 9,76	0,0312	0,28	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,244	0,25		
<i>S. aureus</i> (50)	EEB	312,5 / 9,76	0,0312	0,28	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,244	0,25		
<i>S. aureus</i> (51)	EEB	312,5 / 9,76	0,062	0,31	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,244	0,25		
<i>S. aureus</i> (57)	EEB	312,5 / 9,76	0,0312	0,156	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,122	0,125		
<i>S. aureus</i> (61)	EEB	312,5 / 9,76	0,0312	0,156	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,122	0,125		
<i>S. aureus</i> (72)	EEB	625 / 19,53	0,0312	0,156	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,122	0,125		
<i>S. aureus</i> (73)	EEB	156,2 / 4,88	0,0312	0,154	Sinérgico
	OXA	1,95 / 0,24	0,123		
<i>S. aureus</i> (78)	EEB	312,5 / 9,76	0,0312	0,156	Sinérgico
	OXA	0,976 / 0,122	0,125		

IFI: Índice da fração inibitória; (EEB): Extrato etanólico bruto; (OXA): Oxacilina; (CBM): Concentração Bactericida Mínima.

Em combinação com a oxacilina, pode-se observar que concentração bactericida mínima para o EEB foi 32 vezes menor para todos os isolados, mostrando uma redução de 96,87% do valor da CBM do extrato frente aos isolados testados.

Com relação à oxacilina, sua associação com o extrato resultou em uma redução de 93,75% do valor da CBM para três isolados (números de referência: 05, 12 e 41); de 87,5% para oito isolados (números de referência: 20, 22, 23, 24, 57, 61, 72 e 78); 75% em outros três isolados (números de referência: 49, 50 e 51) e de 87,7% para um isolado (número de

referência: 73). Diante desses resultados, é possível afirmar que a CBM para a oxacilina foi de 4-16 vezes menor quando comparada ao valor testado sozinho.

Os valores mostrados na Tabela 3 se referem apenas àqueles relacionados à somatória dos IFIs que produziram os melhores efeitos sinérgicos, conforme definido pelo $IFI \leq 0,5$.

Discussão

Caracterização química do extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora*

São relativamente poucos os trabalhos na literatura que reportam de forma detalhada a composição e caracterização química de *M. tenuiflora*; e a grande maioria das pesquisas utilizou como objeto de estudo o extrato etanólico bruto obtido a partir das cascas do caule da planta. A presença de compostos fenólicos corrobora os estudos fitoquímicos já realizados com esta espécie, que relatam o isolamento e/ou identificação de flavonoides e taninos, considerados os principais metabólitos produzidos por *M. tenuiflora* (CRUZ et al., 2016, BAUTISTA et al., 2011; RIVERA-ARCE et al., 2007).

A partir da triagem fitoquímica, foi possível observar a presença de compostos fenólicos, antocianinas, derivados antracênicos, taninos hidrolisáveis e saponinas. Isso pode explicar os vários usos etnomedicinais da jurema preta visto que os mecanismos e modo de ações farmacológicas já foram confirmadas para esses compostos, sejam eles antioxidantes, antimicrobianos e/ou antitumorais (GAUTHIER, et al., 2011; NEGRI e TABACH, 2013; THAKUR e ARYA, 2014; CASTRO et al., 2015; SYTAR et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Silva et al. (2013), realizaram uma triagem fitoquímica utilizando o extrato etanólico bruto também obtido a partir das cascas do caule de *M. tenuiflora*, buscando detectar variadas classes de metabólitos secundários. Eles observaram a presença de saponinas, resinas,

compostos fenólicos, alcaloides, flavonoides e taninos pirogálicos. Assim como no nosso trabalho, notou-se a ausência de quinonas e cumarinas.

Com relação aos taninos condensados, a triagem fitoquímica preliminar não acusou a presença dos mesmos no EEBMT. No entanto, de acordo com Silva et al. (2012), o resultado negativo não exclui necessariamente a presença de determinada classe de compostos na amostra testada. Provavelmente a concentração destes constituintes dentro da amostra foi menor do que a mínima detectável pela técnica empregada na análise.

Dentre os 14 compostos identificados pela cromatografia líquida, um deles foi a luteolina. Na literatura atual, diversos trabalhos reportam atividades biológicas importantes atribuídas à luteolina, tais como atividade anti-inflamatória (YANG et al., 2018, AZIZ et al., 2018), anticâncer (IM et al., 2018), antiviral (FAN et al., 2016), antioxidante (CHOI et al., 2014), antibacteriana (SHEN et al., 2014) e cardioprotetora (YU et al., 2017).

Estudo realizado na Argentina por Bustos et al. (2018), a luteolina foi investigada com relação ao seu potencial antioxidante e atividade antibacteriana. Os autores observaram que o flavonoide apresentou maior inibição na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) do que a vitamina C (inibidor de referência) em células mononucleares. Além disso, observaram também que a associação da luteolina com a gentamicina sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, mostrou efeito sinérgico em *S. aureus* ATCC e efeito aditivo em *E. coli* ATCC. Os autores concluíram que a administração simultânea de luteolina e gentamicina pode representar uma boa opção terapêutica contra esses microrganismos patogênicos.

Na Índia, a luteolina foi estudada por Rungsung et al. (2018) quanto à sua capacidade de reduzir lesões pulmonares induzidas por sepse em camundongos. Os autores observaram que a luteolina foi capaz de atenuar a lesão pulmonar aguda induzida por sepse em camundongos, principalmente por conta da diminuição do dano oxidativo e atenuação da resposta inflamatória.

Nesse estudo, a luteolina não foi testada de forma isolada afim de confirmar seu potencial terapêutico. Porém, a presença desse flavonoide no EEBMT é de grande relevância, já que este pode ser um dos principais componentes que auxiliam no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*. Diante disso, é possível afirmar que *Mimosa tenuiflora* é uma planta bastante interessante do ponto de vista químico e biológico. Os estudos realizados com extratos desta espécie contribuem não apenas para o fornecimento de informações a respeito da sua composição química e do seu potencial farmacológico, mas também do gênero como um todo.

Atividade antibacteriana do EEBMT e da oxacilina

Todos os isolados testados foram sensíveis ao extrato, sendo que a maioria apresentou sensibilidade acentuada na concentração de 312,5 µg/mL. O efeito antimicrobiano do extrato pode estar diretamente relacionado à presença de taninos presentes no extrato, uma vez que estes apresentam amplo espectro de ação, podendo ser empregados na medicina tradicional para tratamento de diversas doenças (PEREIRA et al.; 2015).

O mecanismo de ação dos taninos pode ser explicado por sua capacidade de precipitar as proteínas das células superficiais dos tecidos e das mucosas, formando uma capa protetora, inibindo enzimas, causando uma ruptura da membrana plasmática e privação do substrato microbiano através da formação de um complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo, impedindo assim, o desenvolvimento de microrganismos (RODRIGUES et al. 2014). Plantas nativas da Caatinga ricas em taninos apresentam uma notável atividade antimicrobiana, onde estes podem atuar tanto sobre microrganismos Gram-positivos como Gram-negativos (AZIZ ABD et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Em outro estudo, realizado por Silva et al. (2013), os autores encontraram predominância de produtos como os taninos e os flavonoides. Várias pesquisas destacam o

potencial dos compostos fenólicos e dos flavonoides como possuidores de atividade antimicrobiana (DIMECH et al., 2013; OKORO et al., 2010; OKONKWO et al., 2016).

Os compostos de caráter fenólico nas plantas medicinais destacam-se com atividades que favorecem a saúde, demonstrando seu potencial medicinal (WANGENSTEEN et al., 2015). Dessa forma, o perfil de compostos encontrado reflete nos efeitos antimicrobianos relatados nesse trabalho.

Com relação à oxacilina, todos os isolados testados foram sensíveis ao antibiótico, sendo que a maioria apresentou sensibilidade acentuada na concentração de 0,49 µg/mL. Estudo realizado por Silva et al. (2012) mostrou que 99% dos isolados de *Staphylococcus aureus* de mastite bovina do agreste pernambucano foram sensíveis à oxacilina. Outros estudos realizados na China (PU et al., 2014) e na Índia (MISTRY et al., 2016) também avaliaram a atividade antimicrobiana da oxacilina frente a cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina e concluíram que 87,4% e 100% dos isolados, respectivamente, apresentaram sensibilidade a este antimicrobiano.

Esses resultados mostram que a oxacilina continua sendo eficaz contra as principais bactérias causadoras de mastite nos rebanhos leiteiros e, quando não é utilizado de forma indiscriminada, é possível ter sucesso no tratamento. No entanto, cepas resistentes à oxacilina, amplamente disseminadas, representam um considerável problema de saúde pública, pois além de multirresistentes, podem expressar importantes fatores de virulência (FITZGERALD, 2014; MONACO et al., 2016).

A resistência pode surgir como consequência do uso inadequado dos antibióticos, uma vez que isso impõe uma pressão seletiva sobre a bactéria, favorecendo sua evolução genética (DIAS et al., 2015). A expressão da resistência à oxacilina é principalmente associada à produção de uma proteína de ligação à penicilina (*penicillin-binding protein*, PBP) modificada e com baixa afinidade de ligação aos β-lactâmicos, conhecida como PBP2a,

permitindo que os *Staphylococcus* spp. mantenham sua biossíntese até em concentração consideradas inibitórias desses antimicrobianos. Essa proteína é codificada pelo gene *mecA*, e é por isso que esse gene é frequentemente usado como marcador molecular da resistência a este antibiótico (PATERSON et al., 2014).

Ainda que um microrganismo apresente sensibilidade a um determinado antimicrobiano, sua ampla utilização tem como consequência a geração de pequenos gradientes de concentrações, conhecidos como concentrações subinibitórias (sub-MICs), que podem ocorrer em ambientes diferentes (seja no organismo animal ou humano), durante a antibioticoterapia. Nessas pequenas quantidades, os antibióticos podem atuar como moléculas sinalizadoras, ocasionando a seleção de mutantes pré-existentes, induzindo a tolerância fenotípica aos mesmos e, conseqüentemente, influenciando nas taxas de mutação, na transferência horizontal de genes e na expressão de fatores de virulência, aumentando sua taxa de evolução adaptativa (ROMERO et al., 2011; LAURETI et al., 2013). Bactérias comensais e patogênicas são frequentemente expostas a sub-MICs de antibióticos, onde estas têm sido relacionadas a importantes efeitos na fisiologia bacteriana (ANDERSSON e HUGHES, 2014).

Em *S. aureus* sensíveis à oxacilina, o efeito de sub-MICs de β -lactâmicos sobre a expressão da resistência a esse antimicrobiano já foi observado *in vitro* (PENN et al, 2013; KONG et al., 2015; TENOVER e TICKLER, 2015; CHUNG et al., 2016; PROULX et al., 2016). Por isso, a existência de *S. aureus* suscetíveis a esse antibiótico não garante tratamento de sucesso por muito tempo. Dessa forma, é de extrema necessidade que os produtores sejam orientados quanto ao uso correto de medicamentos no tratamento de enfermidades no rebanho, pois a utilização apropriada do antibiótico contribui para redução da resistência bacteriana, com a diminuição de gastos além de evitar o descarte precoce dos animais.

Diante desses resultados, é possível considerar a oxacilina como sendo uma importante opção para o tratamento da mastite nos rebanhos e que, se usado de forma adequada, minimiza a seleção de cepas resistentes.

Efeito sinérgico entre o EEBMT e a Oxacilina

Com relação aos resultados do teste de sinergismo, observou-se que os valores de CBM do EEB reduziram mais de 96% e, para a oxacilina, a média de redução dos valores da CBM foi de 86%. Muitos extratos vegetais são conhecidos por possuírem atividades antimicrobianas que podem ser de grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos. Ao partir desse pressuposto, os resultados desse estudo mostraram que o extrato etanólico bruto de *Mimosa tenuiflora* (EEBMT), ao ser confrontado frente a isolados de *S. aureus*, apresentou efetividade para esse microrganismo.

Callou et al. (2012) observaram que o extrato acetato de etila de *Mimosa caesalpinifolia* Benth demonstrou atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A interação do extrato com a polimixina provocou sinergismo contra *P. aeruginosa*, aumentando o halo de inibição do antibiótico no teste de sensibilidade por disco difusão. Não houve interferência do extrato na ação da vancomicina sobre *S. aureus*.

Prompanya et al. (2014), avaliou o meroterpeno chevalona (E) quanto à sua atividade antimicrobiana frente a amostras de MRSA, apresentando CMI > 1024 µg/mL, valor este que não demonstra uma atividade antimicrobiana significativa. Porém, quando associado ao antibacteriano oxacilina, apresentou efeito sinérgico, com IFIC 0,188. Os autores afirmam que a chevalona (E) não possui os requisitos estruturais para a atividade antibacteriana significativa, porém, os resultados demonstraram efeito sinérgico com os antibióticos contra três isolados resistentes a múltiplas drogas.

Os resultados do presente estudo mostram que o EEBMT apresentou efeito antimicrobiano em todos os isolados de *S. aureus* e, além disso, quando associado com a oxacilina, apresentou sinergismo mostrando valores de CBM ainda melhores. De acordo com Chanda e Rakholya (2011) o efeito sinérgico de diferentes extratos com diversas classes de antibióticos acontece devido à formação do complexo certo que se torna mais eficaz na inibição de uma espécie particular de microrganismo, quer por inibição da síntese da parede da célula ou provocando a sua lise ou morte.

O efeito sinérgico observado nesse estudo permitiu reduzir a concentração do principal antibiótico utilizado no tratamento de mastite estafilocócica. Isso aconteceu, provavelmente, pela formação de um novo complexo estrutural que permitiu maior afinidade com componentes da estrutura celular bacteriana mesmo em uma concentração reduzida. Como consequência, dificultou-se a seleção de cepas resistentes aos antimicrobianos (comumente utilizados na prática clínica), reduzindo a pressão seletiva das mesmas (REUK-Ngam et al., 2014; RONDEVALDOVA et al., 2015). Esses resultados podem contribuir na busca de novas formulações para terapia de bactérias multirresistentes, visando tratamento mais eficaz contra microrganismos causadores de mastite.

Pesquisas com plantas medicinais não estão sendo avaliadas somente pela sua atividade antimicrobiana, mas também como agentes modificadores da resistência bacteriana devido à estratégia de combinação planta-antibiótico que podem atingir não somente um único alvo, e sim vários, onde os diferentes componentes podem atuar de forma sinérgica, indiferente ou antagônica a essa interação (MATIAS et al., 2012; TINTINO et al., 2013).

Portanto, estes resultados demonstram que o EEB de *Mimosa tenuiflora* pode se tornar um importante adjuvante das drogas antibacterianas já conhecidas, sendo a chave para ajudar a mitigar o surgimento de multirresistências e auxiliar no tratamento de doenças infecciosas.

Conclui-se que o extrato etanólico da casca de *Mimosa tenuiflora* mostrou atividade antimicrobiana em todos os isolados de *Staphylococcus aureus* e pode ser considerado uma importante alternativa terapêutica no combate a esses microrganismos. Além disso, todos os isolados bacterianos foram sensíveis à oxacilina, mostrando que esse antibiótico continua sendo uma das opções mais viáveis no tratamento de *S. aureus* causadores de doenças como a mastite. A associação do extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora* com a oxacilina apresentou efeito sinérgico em diferentes concentrações, além de proporcionar redução expressiva nos valores de CBM de ambos. Assim, os dados obtidos no nesse estudo apoiam o uso de combinações antimicrobianas com extratos vegetais, estabelecendo a capacidade deste extrato como provável base de compostos alternativos de resistência a antibióticos.

REFERÊNCIAS

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n.7, p. 465-478, 2014.

AHMED, Z.; KHAN, S.S.; KHAN, M.; TANVEER, A.; LONE, Z.A. Synergistic effect of *Salvadora persica* extracts, tetracycline and penicillin against *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Basic and Applied Sciences**, v.2, n.1-2, p.25-29, 2010.

ARAÚJO, R.M.P.; PEIXOTO, R.M.; PEIXOTO, L.J.S.; GOUVEIA, G.V.; COSTA, M.M. Virulence Factors in *Staphylococcus aureus* and Quality of Raw Milk from Dairy Cows in a Semiarid Region of Northeastern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, n.1491, p. 1-8, 2017.

AZIZ, N.; KIM, M.; CHO, J. Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.225, p.342-358, 2018.

BEZERRA, D. A. C.; PEREIRA, A.V.; LÔBO, K.M.S.; RODRIGUES, O.G.; ATHAYDE, A.C.R.; MOTA, R.A.; MEDEIROS, E.S.; RODRIGUES, S.C. Atividade biológica da jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.4, p.814-817, 2009.

BEZERRA, D. A. C.; RODRIGUES F. F. G.; COSTA, J.G.M.; PEREIRA, A. V.; SOUSA, E.O; RODRIGUES, O. G. Abordagem fitoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. **Acta Scientiarum Biological Sciences Maringá**, v. 33, n. 1, p. 99-106. 2011.

BOUCHER, H.; MILLER, L.G.; RAZONABLE, R.R. Serious Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**. v.51, n.2, p.183–197, 2010.

BRAZ R. et al. 2011. **Quality control and TLC profile data selected plant species commonly found in the Brazilian Market**. Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 22, n.5, p. 1111-1118.

BROOKS, B.D.; BROOKS, A.E. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.78, p.14–27, 2014.

BUSTOS P. S., DEZA-PONZIO R., PÁEZ P. L., CABRERA J. L., VIRGOLINI M. B., ORTEGA M. G. Flavonoids as protective agents against oxidative stress induced by gentamicin in systemic circulation. Potent protective activity and microbial synergism of luteolin. **Food and Chemical Toxicology**, v.118, p. 294-302, 2018.

CALLOU, M.J.A.; MIRANDA, R.C.M.; FEITOSA, T.R.; ARRUDA, V.F.V.; NASCIMENTO, M.S.; GUSMÃO, N.B. Avaliação da atividade antimicrobiana da casca de *Mimosa Caesalpinifolia* Benth (Sabiá). **Scientia Plena**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2012.

CASTRO, M. R.; VICTORIA, F.N.; OLIVEIRA, D.H.; JACOB, R.G.; SAVEGNAGO, L.; ALVES, D. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n.2, p.242-250, 2015.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. v.1, n.13, p.520-529, 2011.

CHUNG, M.; KIM, C.K.; CONCEIÇÃO, T.; AIRES-DE-SOUSA, M.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Heterogeneous oxacillin-resistant phenotypes and production of PBP2A by oxacillin-susceptible/mecA-positive MRSA strains from Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 10, p. 2804-2809, 2016.

DeLEO, F.R.; OTTO, M.; KREISWIRTH, B.N.; CHAMBERS, H.F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v.375, n.9725, p.1557–1568, 2010.

DIAS, A.P.M.; PINHEIRO, M.G.; ALVES, F.A. Características epidemiológicas e fatores de virulência em *Staphylococcus aureus*. **Revista Acta Scientiae and Technicae**. v.3, n.1, p.9-20, 2015.

FERNANDES, T. G.; DE MESQUITA, A. R. C.; RANDAU, K. P.; FRANCHITTI, A. A.; XIMENES, E. A. *In vitro* synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **The Scientific World Journal**, p.1-7, 2012.

FITZGERALD, J. R.. Evolution of *Staphylococcus aureus* during human colonization and infection. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 21, p. 542-547, 2014.

KONG, L.Y.; JEAN, A.; WONG, H.; SEMRET, M.; FRENETTE, C.; SIMOR, A.E.; FENN, S.; LOO, V.G. Bacteremia caused by a mecA-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain with inducible resistance. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n.4, p. 377-378, 2015.

LAURETI, L.; MATIC, I.; GUTIERREZ, A. Bacterial responses and genome instability induced by subinhibitory concentrations of antibiotics. **Antibiotics**, v.2, n.1, p.100-114, 2013.

LEE, J.H.; CHO, M.H.; LEE, J. 3-indolylacetoneitrile decreases *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Environmental Microbiology**, v.13, n.1, p.62-73, 2011.

LIN, J.C.; AUNG, G.; THOMAS, A.; JAHNG, M.; JOHNS, S.; FIERER, J. The use of ceftaroline fosamil in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis and deep-seated MRSA infections: a retrospective case series of 10 patients. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.19, n.1, p.42–49, 2013.

MARTINS, A.; RIBOLI, D.F.M.; PEREIRA, V.C.; CUNHA, M.L.R.S. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a Brazilian university hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 331- 335, 2014.

MATIAS, E.F.F; SANTOS, F.A.V.; SILVA, J.M.F.L.; et al. Screening the in vitro modulation of antibiotic activity of the extracts and fractions of *Ocimum gratissimum* L. **African Journal of Microbiology Research**. v.6, n.9, p. 1902-1907, 2012.

MCCLANAHAN, C. Phytochemicals. **Biofililes Sigma-Adrich**. v. 7, p.4, 2012.

MESQUITA, M. O.; PINTO, T.M.F.; MOREIRA, R.F. Antimicrobial potential of extracts and molecules isolated from Caatinga plants: a review. **Revista Fitos**, v. 11, n.2, p.119-249, 2017.

MISTRY, H.; SHARMA, P.; MAHATO, S.; SARAVANAN, R.; KUMAR, P.A.; BHANDARI, V. Prevalence and characterization of oxacillin susceptible meca-positive clinical isolates of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in India. **PLoS ONE**, v. 11, n.9, p.1-10, 2016.

MONACO, M.; DE ARAUJO, F.P.; CRUCIANI, M.; COCCIA, E.M.; PANTOSTI, A. Worldwide epidemiology and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.409, p. 1-36, 2016.

OLIVEIRA F., RITTO J. L. A., AKISUE G., BACCHI E. M. 2010. **Fundamentos de cromatografia aplicada a fitoterápicos**. São Paulo, Ed. Atheneu, 1 ed.

OLIVEIRA, L. M. B.; MACEDO, I.T.F.; VIEIRA, L.S.; CAMURÇA VASCONCELOS, A.L.F.; TOMÉ, A.R.; SAMPAIO, R.A.; LOUVANDINI, H.; BEVILAQUA, C.M.L. Effects of *Mimosa tenuiflora* on larval establishment of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, vol.196, n.3-4, p.341-346, 2013.

PADILHA, I.Q.M.; PEREIRA, A.V.; RODRIGUES, O.G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; PEREIRA, M.S.V. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. from northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, vol.20, n.1, p.45-47, 2010.

PALACE, S.G.; GANDRA, S.; TORRES, B.; WEIR, S.; STILES, T.; ELLISON, R.T. 3rd, GOGUEN, J.D. Reversion of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* during treatment of bacteremia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 6, p. 1041-1046, 2016.

PATERSON, G.K.; HARRISON, E.M.; HOLMES, M.A. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**. v.22, n.1, p.42-47, 2014.

PENN, C.; MODDRELL, C.; TICKLER, I.A.; HENTHORNE, M.A.; KEHRLI, M.; GOERING, R.V.; TENOVER, F.C. Wound infections caused by inducible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.1, n.2, p.79-83, 2013.

PROMPANYA, C.; DETHOUP, T.; BESSA, L.J.; PINTO, M.M.; GALES, L.; COSTA, P.M.; SILVA, A.M.; KIJJOA, A. New isocoumarin derivatives and meroterpenoids from the marine sponge-associated fungus *Aspergillus similanensis* sp. Nov. KUFA 0013. **Marine Drugs**, v.12, n.10, p.5160–5173, 2014.

PU, W.X.; SU, Y.; LI, J.X.; LI, C.H.; YANG, Z.Q.; DENG, H.P.; NI, C.X. High incidence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. **PLoS ONE**, v.9, n.2, p.1-9, e88134, 2014.

REUK-Ngam, N.; CHIMNOI, N.; KHUNNAWUTMANOTHAM, N.; TECHASAKULET, S. Antimicrobial activity of coronarin D and its synergistic potential with antibiotics. **BioMed Research International**. v. 2014, p.1-8, 2014.

ROCKENBACH, I.I.; JUNGFER, E.; RITTER, C.; SANTIAGO-SCHÜBEL, B.; THIELE, B.; FETT, R.; GALENSA, R. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS, **Food Research International**. v.48, n.2, p.848–855, 2012.

ROMERO, D.; TRAXLER, M.F.; LÓPEZ, D.; KOLTER, R. Antibiotics as signal molecules. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 9, p. 5492-5505, 2011.

RONDEVALDOVA, J.; NOVY, P.; URBAN, J.; KOKOSKA, L. Determination of anti-staphylococcal activity of thymoquinone in combinations with antibiotics by checkerboard method using EVA capmat as a vapor barrier. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 10, n.4, p. 566-572, 2015.

SANTURIO, J.M.; SANTURIO, D.F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P.R.; ALVES, S.H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p. 803-808, 2007.

SILVA, A.M.; SILVA, J.C.S.; SILVA, L.K.M.; OLIVEIRA, A.R.N.; MOURA, D.M.F. Conjuntura da pecuária leiteira no Brasil: Bovinocultura leiteira, cadeia produtiva, agronegócio. **Nutritime**, v.14, n.1, p.4954-4958, 2017.

SILVA, E. Ro.; PEREIRA, A.M.G.; MORAES, W.S.; SANTORO, K.R.; SILVA, T.R.M. “*In vitro*” antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastites. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.3, p.701-711, 2012.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Orgs). 2010. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 1104p.

SOUZA, E.O.; BARRETO, S.F.; RODRIGUES, F.F.G; COSTA, J.G.M. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* Linn e *Lantana montevidensis* Briq na resistência de aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Biociências**. v.9, n.1, p.1-5. 2011.

TENOVER, F. C.; TICKLER, I. A. Is that *Staphylococcus aureus* isolate really methicillin susceptible? **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 37, n. 10, p. 79-84, 2015.

THAKUR, N.; ARYA, V. Preliminary Phytochemical Analysis of the Extracts of *Psidium* Leaves. **Journal of Scientific Research**, v.19, n.11, p.1421-1424, 2014.

TINTINO, S.R.; da CUNHA, F.A.B.; SANTOS, K.K.A.; et al. Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas. **Revista Brasileira de Biociências**. v.11, n.2, p.157-162, 2013.

WAGNER, H.; BLADT. S. 1996. **Plant drug analysis**. New York: Springer Verlag, 2.ed.

YU, T., YANG, Y., KWAK, Y.S., SONG, G.G., KIM, M.Y., RHEE, M.H., CHO, J.Y. Ginsenoside Rc from *Panax ginseng* exerts anti-inflammatory activity by targeting TANK-binding kinase 1/interferon regulatory factor-3 and p38/ATF-2. **Journal of Ginseng Research**. v.41, n.2, p.127–133, 2017.

Capítulo II

Submetido para publicação no periódico *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*

(Qualis Capes (Biotecnologia): B1 / Fator de impacto: 3,155)

Atividade antibiofilme de extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora* frente a *Staphylococcus aureus* de leite bovino

Marielly Bastos Cavalcante^{1*}, Renata de Moraes Peixoto Araújo², Noelly Bastos Cavalcante¹,
Dielson da Silva Vieira³, Mateus Matiuzzi da Costa⁴.

*Autor para correspondência. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. Brasil. Email: mari.cavalcante@yahoo.com.br

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Recife-PE. Brasil. Email: lys.cavalcante@hotmail.com

²Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, *Campus* Patos-PB. Brasil. Email: renatavet_peixoto@hotmail.com

³Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-SP. Brasil. Email: dielson.vieira@ig.com.br

⁴Universidade Federal do Vale do São Francisco-UNIVASF, Petrolina-PE. Brasil. Colegiado de Zootecnia. Email: mateus.costa@univasf.edu.br

Resumo

Introdução: Os *Staphylococcus* spp. com habilidade para formar biofilmes são cada vez mais reconhecidos por causar infecções intramamárias persistentes, protegendo-as da ação de antibióticos, além de prejudicar a saúde do animal e afetar a saúde pública. A busca de alternativas para inibir desenvolvimento dos biofilmes é fundamental, principalmente quando utilizadas plantas com potencial terapêutico. Os objetivos desse estudo foram avaliar o efeito antimicrobiano e antibiofilme do extrato etanólico bruto de *Mimosa tenuiflora* frente a

Staphylococcus aureus produtores de biofilme, bem como avaliar a capacidade dessas bactérias produzirem bomba de efluxo como mecanismo de resistência.

Metodologia: Foram utilizados 58 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF – campus Ciências Agrárias. Foi realizado teste fenotípico, em microplacas, para analisar a produção de biofilme bem como teste antimicrobiano para identificar a concentração bactericida mínima (CBM) e teste antibiofilme, ambos utilizando o extrato etanólico bruto de *Mimosa tenuiflora*. Para o teste de bomba de efluxo, utilizou-se placas de plástico e estéreis contendo ágar Mueller Hinton acrescido de brometo de etídio.

Resultados: No teste fenotípico em microplacas, todos os isolados produziram biofilme. A atividade antimicrobiana do extrato vegetal foi observada em 100% dos isolados. Com relação ao efeito antibiofilme, o extrato foi eficaz apenas durante a formação do biofilme, não mostrando efeito quando o mesmo já estava consolidado. Com relação à bomba de efluxo, nenhum isolado de *S. aureus* foi capaz de produzir tal mecanismo. Há poucos estudos com relação ao potencial de plantas contra a formação do biofilme bacteriano e, partir desses resultados, é possível considerar o extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora* como uma importante alternativa terapêutica sendo promissora no combate de *S. aureus* formadores de biofilme.

Conclusões: O extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana sobre todos os isolados, mostrando ação contra biofilme que ainda está em formação; porém não é eficaz contra biofilme consolidado. Nenhum isolado foi capaz de produzir bomba de efluxo quando em contato com brometo de etídio.

Palavras-chave: bactéria, biofilme, resistência bacteriana, fitoterápicos, jurema preta.

Introdução

A bovinocultura vem se destacando cada vez mais no agronegócio brasileiro, sendo considerado o maior rebanho bovino comercial do mundo [1]. Entretanto, algumas doenças, como a mastite, contribuem para redução da produção, gerando prejuízos diretos à pecuária leiteira em função da diminuição da quantidade e qualidade do leite produzido, ou até mesmo pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária ocasionando, muitas vezes, o descarte dos animais [2, 3].

A mastite é a doença mais amplamente difundida na indústria leiteira e inúmeros microrganismos patogênicos podem ser responsáveis por este tipo de inflamação sendo, o *Staphylococcus aureus*, o principal agente patológico da mastite bovina [4, 5]. Bactérias do gênero *Staphylococcus* podem produzir uma série de fatores de virulência [6]. Dentre eles, o biofilme tem papel fundamental nas infecções bacterianas sendo que, a cronicidade e resistência a agentes antimicrobianos de determinadas infecções, estão intimamente ligadas à presença dessa estrutura [7].

Estratégias para controle de biofilmes podem interferir na sua formação, no entanto, nenhuma substância antibiofilme foi registrada ou está em uso clínico, o que torna o tratamento de infecções relacionadas com biofilmes muito difícil [8, 9]. Muitas pesquisas estão sendo feitas visando descobrir novos compostos capazes de inibir biofilmes, e os produtos naturais, com destaque para as plantas, continuam a despertar o interesse para o desenvolvimento de componentes com estruturas e atividades biológicas interessantes [9].

Dentre as espécies vegetais bastante estudadas nesse sentido, destaca-se a *Mimosa tenuiflora* (Família Fabaceae). Essa planta tem sido estudada como agente antimicrobiano em diversas pesquisas, apresentando excelentes resultados contra diferentes espécies de microrganismos [10–13]. Porém, os estudos com relação ao seu efeito sobre a formação de biofilmes bacterianos ainda é escasso, sendo de grande relevância a realização de pesquisas

sobre tal assunto, já que estratégias para controle de biofilmes podem contribuir com a produção de subsídios para sua aplicação na terapia dos animais [8].

Outro mecanismo de resistência bacteriana são os sistemas de efluxo de multidrogas [14]. O sistema de bombas de efluxo serve para proteger as bactérias de danos por toxinas, e podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento de resistência a diversos agentes antimicrobianos [15].

A superexpressão de bombas de efluxo de multidrogas pode promover resistência a diversas classes de antimicrobianos, principalmente devido à sua falta de especificidade a substratos, mas também podem diminuir a suscetibilidade a biocidas, resultando num fenótipo de resistência multidroga [16]. No entanto, apesar das bombas de efluxo estarem amplamente implicadas na resistência a antibióticos, há evidências que sugerem que elas podem participar de uma série de comportamentos bacterianos, incluindo a formação de biofilme [17].

Diante do exposto, os objetivos dessa pesquisa foram analisar fenotipicamente a capacidade de *Staphylococcus aureus* produzirem biofilme, avaliar o efeito antimicrobiano e antibiofilme do extrato etanólico bruto de *Mimosa tenuiflora*, bem como analisar a capacidade dos isolados bacterianos de produzirem bomba de efluxo como mecanismo de resistência.

Metodologia

Amostras bacterianas

Foram utilizados 58 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF – campus Ciências Agrárias. Todos esses isolados foram obtidos a partir de pesquisa realizada por [18].

Obtenção do extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora*

Cascas de *Mimosa tenuiflora* foram coletadas em uma área de caatinga preservada nas dependências do Centro de Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD) – localizado na Univasf *campus* Ciências Agrárias (S 09°19'35,43" / W 040°32'53,106") para processamento. O material foi seco em estufa com circulação de ar a uma temperatura média de 45 °C durante 7 dias. Após este passo, obteve-se um rendimento de 350 g de material seco. Posteriormente, a moagem do material foi realizada com o auxílio de um moinho de facas, obtendo-se o material vegetal seco em pó, com rendimento de 298,6 g.

O material vegetal seco e em pó foi submetido a maceração exaustiva, utilizando como solvente o etanol (95%) em um recipiente de aço inoxidável, com renovação de solvente a cada 72 horas. Sucessivas extrações foram realizadas até a exaustão máxima. Após este processo, a solução extrativa foi submetida a um processo de destilação do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida, a uma temperatura média de 50 °C, obtendo-se no final 84,95 g do extrato etanólico bruto de *Mimosa tenuiflora* (CEEMT).

Análise química do EEBMT

A análise química foi realizada conforme já descrito no capítulo I, onde inicialmente foi realizada a triagem fitoquímica preliminar e, posteriormente, a análise por UPLC-DAD-QTOF-MS/MS.

Determinação da atividade antibacteriana do EEBMT

A atividade antimicrobiana do EEBMT foi realizada conforme metodologia do capítulo I, adotando as descrições de [19].

Análise da produção de biofilme

Para avaliar a produção de biofilme, seguiu-se a metodologia de [20], com modificações. Inicialmente, realizou-se a turvação de cada isolado em solução salina 0,85% visando obter uma densidade óptica (D.O.) entre 0,153 e 0,316 ($\sim 3 \times 10^8$ ufc/mL) correspondente à escala 1 de McFarland. Para isso, as amostras foram levadas ao espectrofotômetro onde, através do comprimento de onda de 600 nm, foi feita a leitura das mesmas. Após alcançar a turvação ideal, 100 μ L dessa suspensão foram transferidos para tubos contendo 3 mL de caldo TSB (Tryptone Soya Broth) acrescido de 1% de glicose. Posteriormente, foram retirados 5 μ L de cada tubo e colocados em placas de Elisa contendo 195 μ L de caldo TSB (também acrescido de 1% de glicose) recentemente colocado. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e, depois desta etapa, todas as amostras foram lavadas três vezes com 200 μ L de água destilada. Em seguida foi feita a coloração com 100 μ L de cristal violeta a 0,25% e exposta de 2 a 3 minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas mais três vezes com água destilada para diluição do corante e depois foram adicionados 200 μ L de álcool-acetona (80:20). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, inclusive os controles positivo e negativo. A absorbância foi medida em leitor de microplaca (modelo EXPERT PLUS-UV) e mensurada em 620 nm. Como controle positivo foi utilizado a ATCC 25923 e como controle negativo apenas o TSB sem inoculação.

Interação do EEBMT com o biofilme em formação

Para avaliar a interferência do extrato sobre a formação do biofilme, os inóculos bacterianos foram cultivados em 10 mL de TSB com 1% de glicose, por 24 h a 37 °C. Depois disso, 100 μ L dessa suspensão foram acrescidos nos poços da microplaca, já contendo 100 μ L do extrato vegetal (com concentração referente ao valor da CBM para cada isolado) e 100 μ L

de meio de cultura nos controles. Após 24 h de incubação a 37°C, as microplacas foram submetidas à coloração por Violeta de Genciana, conforme descrito acima. A eficácia do extrato em interferir com a formação do biofilme foi definida pela equação: $\text{DO média dos poços tratados} / \text{DO média dos poços controle} \times 100$. Adaptado de [21].

Interação do extrato vegetal com o biofilme consolidado

Para avaliar interação do extrato com o biofilme já consolidado, foi necessário induzir a formação do biofilme através da incubação de 100 µL da suspensão bacteriana em microplacas por 24 h a 37 °C. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com água destilada (para a remoção de células planctônicas) e posteriormente, foram acrescentados 200 µL do extrato vegetal (de acordo com a CBM de cada amostra). A densidade ótica (DO) foi determinada imediatamente após a adição do extrato (0 h) e 24 h depois. A interferência do extrato no biofilme consolidado foi definida pela equação: $\text{DO}_{24\text{h}} \text{ média} - \text{DO}_{0\text{h}} \text{ média} \times 100$. Adaptado de [21].

Avaliação da presença de bomba de efluxo

A produção de bomba de efluxo foi avaliada seguindo a metodologia de [22]. Para isso, as bactérias foram semeadas em placas de petri (de plástico e estéreis) contendo ágar Mueller Hinton acrescido de brometo de etídio em uma concentração de 0,5 µg/mL. Após a semeadura, as placas foram levadas para estufa por 24 h a 37 °C. A análise do resultado foi feita em transiluminador onde as bactérias produtoras de bomba de efluxo foram aquelas cujas colônias não emitiram luminescência sob luz ultravioleta. As colônias que emitiram luminescência foram classificadas como negativas para o teste.

Resultados

Atividade antibacteriana do EEB de *Mimosa tenuiflora*

Os resultados correspondentes à atividade antimicrobiana do EEBMT podem ser observados no artigo I desta pesquisa.

Análise da produção de biofilme

Os resultados da quantificação do biofilme revelaram que todos os isolados produziram biofilme no meio TSB (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação de *Staphylococcus aureus* de acordo com a produção de biofilme.

Classificação	Nº de isolados	Percentual (%)
Fraca Produção de Biofilme	25	43,1
Moderada Produção de Biofilme	25	43,1
Forte Produção de Biofilme	8	13,8
Não Produtor de Biofilme	-	-
TOTAL	58	100

NPB (Não Produtor de Biofilme) apresentaram a densidade óptica (D.O) $\leq 0,064$; FPB (Fraca Produção de Biofilme): $0,06 < D.O \leq 0,128$; MPB (Moderada Produção de Biofilme): $0,128 < D.O \leq 0,256$ e FoPB (Forte Produção de Biofilme): $> 0,256$.

Interação do Extrato com o Biofilme em Formação

O extrato da *Mimosa tenuiflora* foi testado em 33 isolados classificados como moderados (25/33) e fortes produtores de biofilme (8/33). O mesmo apresentou potencial para afetar o biofilme, quando em formação, em 31/33 isolados, sendo que, após a sua adição, dos 25 isolados com moderada produção, 23 passaram a ser considerados como fracos produtores. Os dois restantes permaneceram com produção moderada. Com relação aos oito isolados com forte produção, todos foram reclassificados como fracos produtores. Assim, 94% (31/33)

foram reclassificados como fracos produtores e apenas 6% (02/33) permaneceram como produtores moderados (Figura 1).

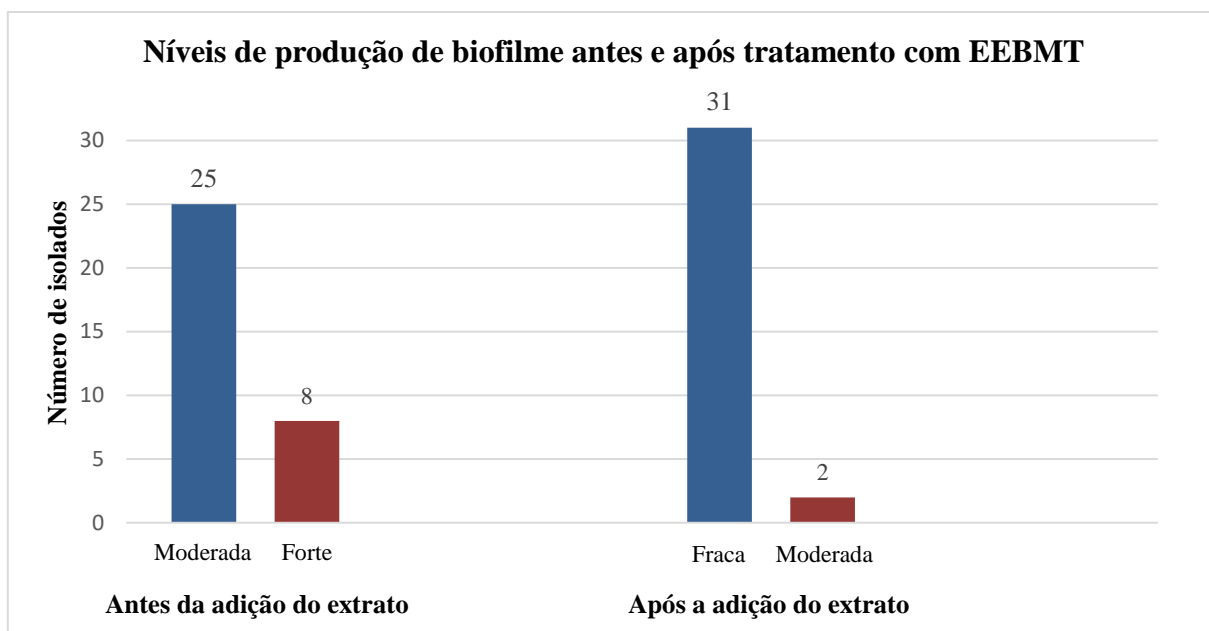


Figura 1. Reclassificação dos isolados após tratamento com extrato de *M. tenuiflora* sobre o biofilme em formação. Antes do tratamento: 25 isolados com formação de biofilme moderada e oito com forte produção. Após o tratamento: 31 isolados com fraca produção de biofilme e dois com moderada produção.

Interação do Extrato com o Biofilme Consolidado

O extrato da *Mimosa tenuiflora* não teve ação inibitória sobre o biofilme consolidado, sendo observado um pequeno aumento da D.O. 24 h após a adição do mesmo. Apesar desse aumento, não houve diferença expressiva entre as densidades ópticas quando comparados os valores de D.O. sobre a formação de biofilme 0 h e 24 h após a adição do extrato (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de Densidade Óptica de biofilme consolidado de *S. aureus* antes (0 h) e após (24 h) o tratamento com o EEBMT.

Isolado (n° de referência)	Médias de D.O. 0 h	Médias de D.O. após 24 h
<i>S. aureus</i> (02)	0,078	0,075
<i>S. aureus</i> (03)	0,078	0,076
<i>S. aureus</i> (04)	0,075	0,082
<i>S. aureus</i> (08)	0,060	0,061
<i>S. aureus</i> (09)	0,049	0,053
<i>S. aureus</i> (11)	0,068	0,069
<i>S. aureus</i> (13)	0,075	0,074
<i>S. aureus</i> (18)	0,050	0,053
<i>S. aureus</i> (19)	0,090	0,093
<i>S. aureus</i> (20)	0,091	0,092
<i>S. aureus</i> (21)	0,090	0,091
<i>S. aureus</i> (22)	0,087	0,087
<i>S. aureus</i> (33)	0,076	0,083
<i>S. aureus</i> (36)	0,086	0,095
<i>S. aureus</i> (37)	0,080	0,085
<i>S. aureus</i> (38)	0,076	0,083
<i>S. aureus</i> (44)	0,103	0,113
<i>S. aureus</i> (49)	0,085	0,090
<i>S. aureus</i> (50)	0,081	0,090
<i>S. aureus</i> (51)	0,082	0,089
<i>S. aureus</i> (52)	0,083	0,080
<i>S. aureus</i> (58)	0,098	0,100
<i>S. aureus</i> (59)	0,088	0,091

<i>S. aureus</i> (61)	0,088	0,087
<i>S. aureus</i> (63)	0,092	0,104
<i>S. aureus</i> (65)	0,054	0,054
<i>S. aureus</i> (66)	0,082	0,084
<i>S. aureus</i> (68)	0,083	0,086
<i>S. aureus</i> (71)	0,088	0,124
<i>S. aureus</i> (72)	0,144	0,125
<i>S. aureus</i> (74)	0,082	0,083
<i>S. aureus</i> (75)	0,080	0,082
<i>S. aureus</i> (76)	0,088	0,090

Bomba de efluxo

Após a análise das placas em transiluminador, foi verificado que todas colônias bacetrianas apresentaram luminescência sob luz ultravioleta, demonstrando que nenhum isolado de *S. aureus* foi considerado positivo para a produção da bomba de efluxo (Figura 2).

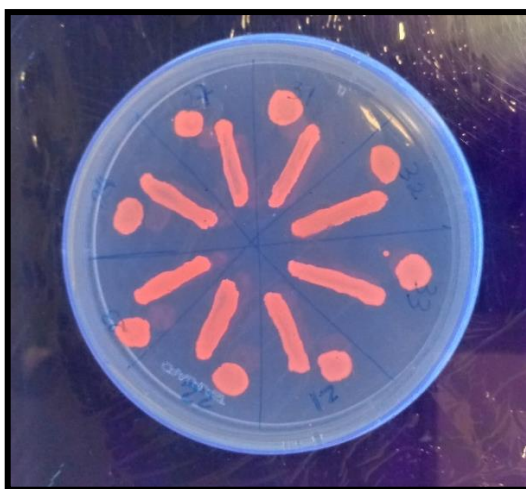


Figura 2. Teste fenotípico para Bomba de Efluxo com uso de Brometo de Etídio. A luminescência confirma o resultado negativo para os isolados de *S. aureus* formadores de biofilme.

Discussão

Análise da produção de biofilme

A capacidade de formação de biofilmes é de grande importância para vários patógenos bacterianos, inclusive aqueles causadores de mastite como o *S. aureus* [23]. Nesse estudo, todos os *S. aureus* foram capazes de produzir biofilme, seja de forma fraca, moderada ou forte. Os resultados mostram que não existe um padrão específico quanto ao percentual de *S. aureus* isolados de mastite bovina com capacidade de formar biofilme. Esta variação pode ser explicada pelas diferenças nas metodologias empregadas, como utilização de glicose, que pode influenciar na expressão de genes envolvidos na formação do biofilme [24].

O padrão de formação de biofilme para as bactérias desse estudo foi diferente, mostrando que houve formação de slime em diferentes níveis. Bactérias fortemente produtoras de biofilme podem ser mais virulentas, e acredita-se que a formação de biofilme forte está ligada a diferentes linhagens genéticas [25]. A aplicação de métodos a nível genômico, transcriptômico e proteômico dessas linhagens provavelmente poderia explicar os diferentes fenótipos observados [26], sendo necessários mais estudos genéticos que comprovem essas diferenças de comportamento bacteriano em relação ao seu mecanismo de resistência.

Além disso, é importante destacar que nem todos os subtipos de *S. aureus* são distribuídos igualmente em todo o mundo. Nesse contexto, a aplicação de subtipagem é uma ferramenta muito importante, além da necessidade de mais estudos regionais sobre a formação de biofilme, incluindo aqueles genótipos que predominam na produção de leite de regiões específicas [26].

Porém acredita-se que, com o simples fato de produzir essa estrutura, os isolados já se tornam um grave perigo a saúde, visto que a formação da mesma é considerada um

mecanismo vantajoso pois facilita a adesão e a colonização bacteriana no epitélio da glândula mamária além de impedir a ação das células de defesa, estabelecendo infecções persistentes [27–29].

Dessa forma, estudos como esse são importantes para que se lancem pesquisas sobre novas estratégias para controlar esse modo complexo de vida bacteriana, que é bem desafiador para os órgãos de saúde [30]. É de grande relevância obter estudos que analisam infecções persistentes devido a patógenos transmitidos por alimentos capazes de produzir biofilmes. Isso porque a importância da formação dessa estrutura pelas bactérias é subestimada, devido ao fato de haver ainda pouca informação sobre as características de aderência de vários patógenos transmitidos pelos alimentos durante o processo dinâmico de formação dos biofilmes, incluindo aderência reversível, ligação irreversível e dispersão do mesmo [31].

Interações do extrato com o ‘Biofilme em Formação’ e ‘Consolidado’

O extrato da *M. tenuiflora* foi capaz de agir no biofilme em formação, porém não teve ação no biofilme consolidado. [32] avaliaram o perfil de atividade de plantas como a *S. macranthera*, *A. absinthium*, *C. nardus* e a *B. dracunculifolia*, e observaram que os extratos dessas plantas tiveram atividade frente ao biofilme formado por *Staphylococcus aureus* provenientes de casos de mastite bovina. É importante observar que ao se utilizar produtos com ação antibiofilme, é preciso que estes sejam eficazes em várias fases, já que a camada polimérica (slime) possui um processo de formação sequencial.

Como já mencionado, o EEBMT não foi eficaz em agir no biofilme já consolidado pelos isolados de *S. aureus*. De acordo com [33], a presença de certos compostos em extratos de plantas poderá proporcionar a formação de um filme condicionante levando à adesão microbiana ao invés da sua inibição. Os mesmos autores afirmam que a falta de capacidade

em inibir tal estrutura só confirma que esses microrganismos, quando em biofilmes, se tornam ainda mais resistentes aos agentes antimicrobianos.

A presença de vários compostos foi observada a partir da triagem fitoquímica do EEBMT (dados não mostrados). Dentre eles estão taninos, saponinas, compostos fenólicos e antocianinas. Diversos estudos comprovam que esses compostos apresentam atividades medicinais importantes, como antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, entre outras [34–37]. No entanto, a ação do extrato contra a formação dessa estrutura bacteriana não está esclarecida, sugerindo que os compostos podem ter relação com a atividade antibiofilme observada nessa pesquisa.

Os biofilmes podem ser eliminados, basicamente, através de duas vias: pelo uso de substâncias bactericidas ou bacteriostáticas, que levarão a inibição do crescimento bacteriano, ou pelo emprego de compostos capazes de bloquear a adesão bacteriana, não resultando em morte bacteriana [38, 39]. Pesquisas sobre o desenvolvimento de compostos que inibem a adesão bacteriana são muito importantes, pois estes, ao manterem as células em seu estado planctônico, favorecem a ação do sistema imune do hospedeiro e dos antibióticos existentes, mantendo a eficácia dos antimicrobianos [40].

Nesse estudo, não foi possível identificar qual composto presente no EEBMT poderia ter atuado sobre o biofilme em formação. Dessa forma, são necessários estudos mais detalhados sobre as substâncias fitoquímicas do extrato, visando identificar o possível mecanismo de ação envolvido na formação dessa estrutura de resistência bacteriana.

Parte da atividade antibiofilme observada também pode estar relacionada com a possível concentração de flavonoides no extrato cuja presença foi observada a partir da triagem fitoquímica (dados não mostrados). Muitos são os compostos presentes no grupo dos compostos fenólicos que possuem atividade antimicrobiana e inibidora de biofilme. Em estudo realizado por [31], relataram-se os primeiros resultados ao se utilizar a rotina frente a

formação de biofilme em *Staphylococcus aureus* e *E. coli*, e esse produto se mostrou eficaz nessa função.

Outra pesquisa realizada por [41] avaliou a ação da luteolina na formação de biofilme por *Escherichia coli* uropatogênica (UEPC) e concluíram que a UPEC pré-tratada com a substância mostrou uma menor capacidade de formação de biofilme. Além disso, os resultados indicaram que a luteolina diminuiu a ligação e invasão da UPEC em células epiteliais da bexiga, atenuou a citotoxicidade induzida pela mesma e a formação de biofilme através da regulação negativa da expressão do gene da adesina, reduzindo a hidrofobicidade e a motilidade da superfície bacteriana. Vale destacar que os resultados desse estudo mostraram que o EEBMT foi eficaz na redução do biofilme em formação, sugerindo que essa atividade pode ocorrer em função da presença da luteolina no extrato, necessitando de mais estudos a respeito da função dessa substância na formação de biofilmes bacterianos.

Esses resultados só confirmam a importância da atividade dos flavonoides frente a patógenos presentes em alimentos. Além disso, o perfil de resistência observado pode estar relacionado às substâncias exopoliméricas do biofilme que formam uma barreira para a entrada de antibióticos, impedindo a ação dos mesmos [42]. Portanto, o extrato de *M. tenuiflora* pode ter importantes aplicações para implementação de estratégias como agentes de suporte aos antimicrobianos e ação antibiofilme em formação, sendo alternativas promissoras para combater microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus*.

Presença de bomba de efluxo

Com relação à presença de bomba de efluxo, nenhum isolado apresentou capacidade de produção desse mecanismo pelo teste fenotípico com brometo de etídio. O aumento da atividade de sistemas de efluxo é relatado como estratégia importante para a regulação dos

níveis intracelulares de compostos residuais do metabolismo celular no ambiente limitado da matriz do biofilme [43].

Várias famílias de bomba de efluxo podem estar presentes nas bactérias. Dentre as elas, as MFS predominam entre bactérias Gram-positivas incluindo o *S. aureus*. Bombas da família MFS em *S. aureus* incluem as bombas de efluxo multidroga resistentes (MDR): LmrS, NorA, NorB, NorC, MdeA, SdrM, e QacA/B e os transportadores específicos da tetraciclina Tet38, e TetK [44, 45]. Isso comprova que diversas bombas de efluxo podem atuar em uma única bactéria, porém com funções diferentes.

Para esse estudo, não foram realizados testes para identificar todas as famílias, sendo utilizado apenas o teste fenotípico com brometo de etídio. As bombas são proteínas que podem ser específicas de um substrato ou transportar vários compostos estruturalmente não relacionados. Caso exista alguma dessas proteínas nas bactérias desse estudo, talvez ela esteja associada com baixos níveis de resistência ao brometo de etídio e, portanto, não foi capaz de expulsá-lo quando em contato com as bactérias no teste fenotípico. Além disso, o extrato etanólico não foi capaz de agir sobre o biofilme já consolidado, o que pode sugerir que um grupo específico de bomba de efluxo possa estar interferindo nessa atuação através da resistência a alguma substância presente no extrato, não permitindo a desestruturação do biofilme quando em contato com o EEB.

O papel exato das bombas de efluxo nas diferentes etapas da formação do biofilme não é claro e ainda precisa ser investigado. Por exemplo, não está claro se as bombas de efluxo são necessárias para a fixação inicial das células, a maturação do biofilme ou a manutenção dele. É provável que isso varie consideravelmente entre espécies diferentes e cepas individuais de bactérias e com diferentes substratos [17].

Uma vez que sistemas de bomba de efluxo parecem exercer um papel crucial no desenvolvimento da formação de biofilmes bacterianos, é importante esclarecer o papel desses

sistemas em isolados bacterianos já que estes, como é o caso do *S. aureus*, são considerados importantes patógenos na saúde animal.

Conclusões

Todos os *Staphylococcus aureus* utilizados nesse estudo foram capazes de formar biofilme em diferentes níveis, seja de forma fraca, moderada ou forte.

O extrato etanólico bruto da casca de *Mimosa tenuiflora* apresentou ação contra o biofilme em formação, porém não foi eficaz contra o biofilme já consolidado, necessitando de mais estudos que visem esclarecer, de forma mais detalhada, o seu mecanismo de ação antibiofilme.

Nenhum isolado apresentou bomba de efluxo quando em contato com brometo de etídio. Faz-se necessário aprofundar os estudos de bomba de efluxo relacionados aos *S. aureus* dessa pesquisa, a fim de confirmar se existem tais proteínas e qual a sua verdadeira função nos isolados bacterianos.

Abreviações

µL: Microlitro

µM: Micromolar

CBM: Concentração bactericida mínima

CTAB: Brometo de Cetiltrimetilamônio

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade ótica

g: grama

mL: Mililitro

mM: Milimolar

nm: Nanometro

TSB: Trypiti Soy Broth

UFC: Unidade formadora de colônia

DECLARAÇÕES:

Aprovação ética e consentimento para participar

Não aplicável.

Consentimento para publicação

Não aplicável.

Disponibilidade de dados e material

Todos os questionários estão disponíveis com os autores.

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter interesses conflitantes.

Contribuição dos autores

RMPA contribuiu com uma coleta de leite e reações de PCR. NBC realizou uma extração e triagem fitoquímica do extrato vegetal. DSV contribuiu na redação do manuscrito. MMC auxiliou e orientou no desenvolvimento de toda a pesquisa.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer colegas do laboratório de microbiologia que participaram do estudo. Os autores também gostariam de agradecer a Universidade Federal do Vale do São Francisco por ceder o laboratório para conduzir a pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PEA. Bovinos e bubalinos. <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-ebubalinos>. Acessado em 27 de set. 2016. 2013.
2. Coser SM, Lopes MA, Costa GM. Mastite bovina : Controle e Prevenção. Bol Técnico UFL. 2012;;1–30.
3. Oliveira Ribeiro W, Leortina de Oliveira R, Lopes Martins M, Manoel Martins J, Herbet Moreira Arcaño A, Barroca de Almeida Neto O. Enumeração de microrganismos causadores da mastite bovina e estudo da ação de antimicrobianos. Rev do Inst Laticínios Cândido Tostes. 2014;69:45. doi:10.14295/2238-6416.v69i1.305.
4. BANDOCH, P.; de MELO LS. Revista científica eletrônica de medicina veterinária – issn: 1679-7353. 2011.
5. Krewer CC, Izabela IP, Amanso ES, Cavalcante NB, de M. Peixoto R, Pinheiro JW, et al. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of Staphylococcus spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and pernambuco. Pesqui Vet Bras. 2013;33:601–6.
6. Coelho SMO, Pereira IA, Soares LC, Pribul BR, Souza MMS. Short communication: Profile of virulence factors of Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. J Dairy Sci. 2011;94:3305–10. doi:10.3168/jds.2010-3229.
7. Jain A, Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. J Microbiol Methods. 2009;76:88–92. doi:10.1016/j.mimet.2008.09.017.
8. Millezi AF, Cardoso M das G, Alves E, Piccoli RH. Reduction of Aeromonas hydrophyla biofilm on stainless steel surface by essential oils. Brazilian J Microbiol. 2013;44:73–80.
9. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Agents that inhibit bacterial biofilm formation. Future Med Chem. 2015;7:647–71. doi:10.4155/fmc.15.7.
10. Athayde ACR, Mota RA, Medeiros ES, Rodrigues SC. Bezerra_et_al-2009-Revista_Brasileira_de_Farmacognosia. 2009;19 July 2008:814–7.
11. Padilha IQM, Pereira A V, Rodrigues OG, Siqueira-Junior JP, Pereira M do S V. Antimicrobial activity of Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir. from Northeast Brazil against clinical isolates of Staphylococcus aureus. Rev Bras Farm J Pharmacogn. 2010;20 November 2008:45–7.
12. Krewer CC, Gressler LT, Costa MM, Krewer CC, Vargas AC. Suscetibilidade a desinfetantes e perfil de resistência antimicrobianos em isolados de Escherichia coli. Pesqui Vet Bras. 2012;32:1116–20.
13. Oliveira LMB, Macedo ITF, Vieira LS, Camurça-Vasconcelos ALF, Tomé AR, Sampaio RA, et al. Effects of Mimosa tenuiflora on larval establishment of Haemonchus contortus in sheep. Vet Parasitol. 2013;196:341–6.
14. Blair JMA, Richmond GE, Piddock LJV. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. Future Microbiol. 2014;9:1165–77.
15. Brown AR, Etefagh KA, Todd D, Cole PS, Egan JM, Foil DH, et al. A mass spectrometry-based assay for improved quantitative measurements of efflux pump inhibition. PLoS One. 2015;10:1–12.
16. Silva VA, Gonçalves GF, Pereira MSV, Gomes IF, Freitas AFR, Diniz MFFM, et al. Assessment of mutagenic, antimutagenic and genotoxicity effects of Mimosa tenuiflora. Brazilian J Pharmacogn. 2013;23:329–34.
17. Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. J

Antimicrob Chemother. 2018;73:2003–20.

18. Brasil de Moraes Peixoto Araújo S, Moraes Peixoto de, Silva Peixoto J, Gouveia V, da Costa M, Scientiae A, et al. Virulence Factors in *Staphylococcus aureus* and Quality of Raw Milk from Dairy Cows in a Semiarid Region of Northeastern Brazil. 2017;45 October:56302–970. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289053641021>.

19. Santurio JM, Santurio DF, Pozzatti P, Moraes C, Franchin PR, Alves SH. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. *Ciência Rural*. 2007;37:803–8.

20. Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, et al. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2009;191:832–43.

21. Nostro A, Roccaro AS, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol*. 2007;56:519–23.

22. Jostein Bjorland, Terje Steinum, Bjørg Kvitle SW, Marianne Sunde and EH. Widespread Distribution of Disinfectant Resistance Genes among *Staphylococci* of Bovine and Caprine Origin in Norway. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4363–8.

23. Melchior MB, van Osch MHJ, Lam TJGM, Vernooij JCM, Gaastra W, Fink-Gremmels J. Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. *J Dairy Sci*. 2011;94:5926–37. doi:10.3168/jds.2011-4243.

24. Melchior MB, van Osch MHJ, Graat RM, van Duijkeren E, Mevius DJ, Nielen M, et al. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. *Vet Microbiol*. 2009;137:83–9.

25. Naicker PR, Karayem K, Hoek KGP, Harvey J, Wasserman E. Biofilm formation in invasive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with the clonal lineage. *Microb Pathog*. 2016;90:41–9. doi:10.1016/j.micpath.2015.10.023.

26. Thiran E, Di Ciccio PA, Graber HU, Zanardi E, Ianieri A, Hummerjohann J. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes. *J Dairy Sci*. 2018;101:1000–12.

27. Dhanawade NB, Kalorey DR, Srinivasan R, Barbuddhe SB, Kurkure N V. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun*. 2010;34:81–9.

28. Wu X, Wang Y, Tao L. Sulfhydryl compounds reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation by inhibiting PIA biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett*. 2011;316:44–50.

29. Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams H, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol*. 2011;186:6585–96.

30. Trentin DS, Silva DB, Amaral MW, Zimmer KR, Silva M V., Lopes NP, et al. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. *PLoS One*. 2013;8.

31. Al-Shabib NA, Husain FM, Ahmad I, Khan MS, Khan RA, Khan JM. Rutin inhibits mono and multi-species biofilm formation by foodborne drug resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*. 2017;79:325–32. doi:10.1016/j.foodcont.2017.03.004.

32. Diaz MAN, Rossi CC, Mendonça VR, Silva DM, de Ribon AOB, Aguilar AP, et al. Screening de plantas medicinais com atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Brazilian J Pharmacogn*. 2010;20:724–8.

33. Sandasi M, Leonard CM, Viljoen AM. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol*. 2010;50:30–5.

34. Okoro IO, Osagie A, Asibor EO. Antioxidant and antimicrobial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Nigeria. 2010;9:2989–93.
35. Dimech GS, Soares LAL, Ferreira MA, De Oliveira AGV, Carvalho MDC, Ximenes EA. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. *Sci World J.* 2013;2013.
36. Castro MR, Victoria FN, Oliveira DH, Jacob RG, Savegnago L, Alves D. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. *Pharm Biol.* 2015;53:242–50.
37. da Silva AM, Silva JC de S, da Silva LKM, Oliveira ARN de, Moura DMF de. Conjuntura da pecuária leiteira no Brasil. *Nutr Time.* 2017;14:4954–8. http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/Artigo_410.pdf.
38. Trentin DDS da S, Giordani RB, Macedo AJ. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate 1. *Rev Lib.* 2013;14:113–238.
39. Villa F, Cappitelli F. Plant-derived bioactive compounds at sub-lethal concentrations: Towards smart biocide-free antibiofilm strategies. *Phytochem Rev.* 2013;12:245–54.
40. Arossi K, Hoehne L, Baggio Gnoatto SC, Pacheco LA, Kauffmann C, Buhl B, et al. Potencial Antimicrobiano E Antibiofilme in Vitro De Espécies Do Gênero *Eugenia*, Myrtaceae, Nativas Do Sul Do Brasil. *Rev Cad Pedagógico.* 2018;14:110–27.
41. Shen X fei, Ren L bin, Teng Y, Zheng S, Yang X long, Guo X juan, et al. Luteolin decreases the attachment, invasion and cytotoxicity of UPEC in bladder epithelial cells and inhibits UPEC biofilm formation. *Food Chem Toxicol.* 2014;72:204–11.
42. Maheshwari M, Ahmad I, Althubiani AS. Multidrug resistance and transferability of blaCTX-M among extended-spectrum β -lactamase-producing enteric bacteria in biofilm. *J Glob Antimicrob Resist.* 2016;6:142–9. doi:10.1016/j.jgar.2016.04.009.
43. Baugh S, Phillips CR, Ekanayaka AS, Piddock LJ V, Webber MA. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:673–81.
44. Floyd JL, Smith KP, Kumar SH, Floyd JT, Varela MF. LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:5406–12.
45. Schindler BD, Jacinto P, Kaatz GW. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Futur Microbiol.* 2013;8:491–507.

Conclusão Geral

Todos os isolados de *Staphylococcus aureus* desse estudo foram capazes de produzir biofilme, sendo todos sensíveis ao extrato etanólico bruto de *Mimosa tenuiflora* e à oxacilina. Substâncias capazes de interferir na formação do biofilme são fundamentais para reduzir a resistência bacteriana visando tratamentos mais eficazes e o EEBMT conseguiu interagir com o biofilme durante sua formação, sendo que essa característica pode ser atribuída aos seus compostos químicos. Além disso, a associação de produtos naturais com antibióticos torna-se muito relevante, uma vez que minimiza a pressão seletiva de bactérias resistentes potencializando o efeito do antimicrobiano sintético.

Mais estudos são necessários para entender os mecanismos de resistência bacterianos, como a bomba de efluxo, visando esclarecer sua verdadeira função diante de condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento durante uma infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. 2017. Disponível em: <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>> Acesso em: 14 de fev. de 2018.

AHMED, Z.; KHAN, S.S.; KHAN, M.; TANVEER, A.; LONE, Z.A. Synergistic effect of *Salvadora persica* extracts, tetracycline and penicillin against *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Basic and Applied Sciences**, v.2, n.1-2, p.25-29, 2010.

ALBUQUERQUE, U.P.; DE MEDEIROS, P. M.; DE ALMEIDA, A.L.; MONTEIRO, J.M.; NETO, E.M.F.L.; MELO, J.G., DOS SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, n.3, p.325-354, 2007.

AL-SHABIB, N. A.; HUSAIN, F. M.; AHMAD, I.; KHAN, M. S.; KHAN, R. A. e KHAN, J. M. Rutin inhibits mono and multi-species biofilm formation by foodborne drug resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 79, p. 325-332, 2017.

ALVES, E.C.C.; LEMOS, M.V.F. Detecção de genes da resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos da *Staphylococcus* spp. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 74, n. 3, p. 2007-2013, 2007.

ALVES, J.J.A.; ARAÚJO, M.A., NASCIMENTO, S.S. Degradação da Caatinga: uma investigação ecofisiográfica, **Rev Caatinga Mossoró**, v.22, p. 126-135, 2009.

ANAYA-LÓPEZ, J.L.; CONTRERAS-GUZMÁN, O.E.; CÁRABEZ-TREJO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V.M.; LÓPEZ-MEZA, J.E.; VALDEZALARCÓN, J.J.; OCHOA-ARZOSA, A. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v.81, n.3, p.358-361, 2006.

ANTUNES, A.L.S.; BONFANTI, J.W.; PEREZ, L.R.; PINTO, C.C.; FREITAS, A.L.; MACEDO, A.J.; BARTH, A.L. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n.1, p.51-55, 2011.

ANTUNES, A.L.S.; PEREZ, L.R.R.; REITER, K.C.; SECCHI, C.; FREITAS, A.L.P. Detecção da produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. por Agar congo red. **Revista de Saúde da UCPEL**, v.1,n.1, p.27-31, 2007.

ARAÚJO, R.M.P.; PEIXOTO, R.M.; PEIXOTO, L.J.S.; GOUVEIA, G.V.; COSTA, M.M. Virulence Factors in *Staphylococcus aureus* and Quality of Raw Milk from Dairy Cows in a Semiarid Region of Northeastern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, n.1491, p. 1-8, 2017.

AUSUBEL, FM.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley e Sons, New York, N.Y., USA, 1989.

AZIZ ABD, S.M; LOW, C.N.; CHAI, L.C.; ABD RAZAK, S.S.N.; SELAMAT, J.; SON, R.; SARKER, M.Z.I.; KHATIB, A. Screening of selected Malaysian plants against several food borne pathogen bacteria. **International Food Research Journal**, v.18, n. 3, p.1195-1201, 2011.

AZIZ, N.; KIM, M.; CHO, J. Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.225, p.342-358, 2018.

BANDOCH, P.; de MELO, L. S. Prevalence of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*: a review. **Revista Publicatio UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde**, v.17, n.1, p. 47-51, 2011.

BASKARAN, S.N.; KAZMER, G.W.; HINCKLEY, L.; ANDREW, S.M.; VENKITANARAYANAN, K. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.4, p.1423-1429, 2009.

BAUTISTA, E.; CALZADA, F.; ORTEGA, A.; YÉPEZ-MULIA, L. Antiprotozoal Activity of Flavonoids Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae). **Journal of the Mexican Chemical Society**, v.55, n.4, p.251-253, 2011.

BEREITER, D.A.; HARGREAVES, K.M. HU. **Mecanismos de nocicepção trigeminal: organização periférica e do tronco cerebral** MCBA Bushnell (Ed.), Os Sentidos, Uma Referência Abrangente , Imprensa Acadêmica , San Diego p. 435 – 460, 2008.

BEZERRA, D. A. C.; PEREIRA, A.V.; LÔBO, K.M.S.; RODRIGUES, O.G.; ATHAYDE, A.C.R.; MOTA, R.A.; MEDEIROS, E.S.; RODRIGUES, S.C. Atividade biológica da jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.4, p.814-817, 2009.

BEZERRA, D.A.C.; RODRIGUES, F.F.G.; COSTA, J.G.M.; PEREIRA, A.V.; SOUSA.; E.O.; RODRIGUES, O.G. Abordagem fitoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. **Acta Scientiarum-Biological Sciences**, v.33, p.99-106, 2011.

BJARNSHOLT, T.; ALHEDE, M.; ALHEDE, M.; EICKHARDT-SORENSEN, S.R; MOSER, C.; KÜHL, M.; JENSEN, P.O.; HOIBY, N. The *in vivo* biofilm. **Trends Microbiology**, v.21, n.9, p.466-474. 2013.

^aBLAIR, J.M.A.; SMITH, H.E.; RICCI, V.; LAWLER, A.J.; THOMPSON, L.J.; PIDDOCK, L.J. Expression of homologous RND efflux pump genes is dependent upon AcrB expression: Implications for efflux and virulence inhibitor design. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.70, n.2, p.424–431, 2015.

^bBLAIR, J. M.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L.J. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature**, v.13, n.1, p.42-51, 2015.

BORGES, I.V.; PEIXOTO, A.R.; CAVALCANTI, L.S.; LIMA, M.A.G.; SILVA, M.S. Extratos de jurema preta no controle de mancha-de-alternária em melancia. **Revista Caatinga**, v.26, n.3, p.36-45, 2013.

BRAMBILLA, L.Z.; ENDO, E.H.; CORTEZ, D.A.; DIAS FILHO, B.P. Anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA of neolignans and extract of *Piper regnellii*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.27, n.1, p.112–117, 2017.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1950-1969/D30691.htm>. Acesso em: 21/10/2016.

BRAZ R. et al. 2011. **Quality control and TLC profile data selected plant species commonly found in the Brazilian Market**. Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 22, n.5, p. 1111-1118.

BUITRAGO, E.M.; HERNÁNDEZA, C.; PALLARES, C.; PACHECO, R.; HURTADO, K.; RECALDE, M. Frecuencia de aislamientos microbiológicos y perfil de resistencia bacteriana en 13 clínicas y hospitales de alta complejidad en Santiago de Cali - Colombia. **Infectio**. [online]. vol.18, n.1, p.3-11, 2014.

BUOMMINO, E.; SCOGNAMIGLIO, M.; DONNARUMMA, G.; FIORENTINO, A.; D'ABROSCA, B. Recent Advances in Natural Product-Based Anti-Biofilm Approaches to Control Infections. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.14, n.14, p.1169-1182, 2014.

BUSTOS P. S., DEZA-PONZIO R., PÁEZ P. L., CABRERA J. L., VIRGOLINI M. B., ORTEGA M. G. Flavonoids as protective agents against oxidative stress induced by gentamicin in systemic circulation. Potent protective activity and microbial synergism of luteolin. **Food and Chemical Toxicology**, v.118, p. 294-302, 2018.

CADES, M.; ZANINI, D. S.; SOUZA, H. L.; SILVA, J. D.; FINK, A. A. B.; MUNIZI, M. Perfil de resistência antimicrobiana de mastite bovina em propriedade leiteira no município de Monte Negro/RO. **Revista Brasileira de Ciências da Amazônia**, v.6, n.1, p.1 – 62, 2017.

CALIXTO JÚNIOR, J. T.; DRUMOND, M. A.; ALVES JÚNIOR, F. T. Estrutura e distribuição espacial de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. em dois fragmentos de Caatinga em Pernambuco. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 2, p. 95-100, 2011.

CASTELANI, L.; PILON, L. E.; MARTINS, T.; POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P. Investigation of biofilm production and *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis. **Animal Science Journal**. v. 86, n. 3, p.340-344, 2014.

CASTRO, M. R.; VICTORIA, F.N.; OLIVEIRA, D.H.; JACOB, R.G.; SAVEGNAGO, L.; ALVES, D. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n.2, p.242-250, 2015.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, v.1, n.13, p. 520-529, 2011.

CHOI, J.S.; ISLAM, M.N.; ALI, M.Y.; KIM, Y.M.; PARK, H.J.; SOHN, H.S.; JUNG, H.A. The effects of C-glycosylation of luteolin on its antioxidant anti-Alzheimer's disease, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities. **Archives of Pharmacal Research.**, v.37, p. 1354-1363, 2014.

COELHO, S.M.; PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; PRIBUL, B.R.; SOUZA, M.M. Short communication: profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.7, p.3305–3310, 2011.

COENYE, T.; BRACKMAN, G.; RIGOLE, P.; DE WITTE, E.; HONRAET, K.; ROSSEL, B.; NELIS, H.J. Eradication of *Propionibacterium acnes* biofilms by plant extracts and putative identification of icariin, resveratrol and salidroside as active compounds. **Phytomedicine**, v.19, n.5, p.409-412, 2012.

COKLAR, H.; AKBULUT, M. Anthocyanins and phenolic compounds of *Mahonia aquifolium* berries and their contributions to antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p.166-174, 2017.

COSER, S. M.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M. **Mastite bovina: controle e prevenção**. In: Boletim Técnico. Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG, n. 93, p. 1-30, 2012.

COSTA, A.L.P. e SILVA JUNIOR, A.C.S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v.7, n.2, p.45-57, 2017.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

COSTA, J.C.M.; ESPESCHIT, I.F.; PIERI, F.A.; CARVALHO, I.A.; MOREIRA, M.A.S. Sensitivity profile of planktonic and sessile cells of *Escherichia coli* to antimicrobial used in the treatment of bovine mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.66, n.1, p.129-136, 2014.

COSTA, S.; JUNQUEIRA, E.; PALMA, C.; VIVEIROS, M.; MELO-CRISTINO, J.; AMARAL, L.; COUTO, I. Resistance to Antimicrobials Mediated by Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**. v.2, n.1, p.83–99, 2013.

COYNE, S.; COURVALIN, P.; PÉRICHON, B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.55, n.3, p.947–53, 2011.

CRUZ, M.P.; ANDRADE, C.M.F.; SILVA, K.O.; SOUZA, P.; YATSUDA, R.; MARQUES, L.M.; DAVID, J.P.; NAPIMOGA, M.H.; CLEMENTE-NAPIMOGA, T. Atividade antinoceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico, frações e flavonas isoladas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae) **PLoS One**. v.11, n.3, p. 1-29, 2016.

CRUZ M. P., ANDRADE C. M. F., SILVA K. O., SOUZA E. P., YATSUDA R., MARQUES L. M.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M.; NAPIMOGA, M.H.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T. Antinoceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and flavones isolated from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae). **PLoS ONE**, v.11, n.3, p. 1-29, 2016.

CUCARELLA, C.; TORMO, M.A.; ÚBEDA, C.; TROTONDA, M.P.; MONZÓN, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J. R. Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v.72, n.4, p.2177–2185, 2004.

D'AMICO, D. J.; DONNELLY, C. W. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk utilized in small-scale artisan cheese production. **Journal of food protection**, v.74, n. 8, p. 1353-1358, 2011.

DARWISH, S.F.; ASFOUR, H.A.E. Investigation of biofilm forming ability in staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. **The Scientific World Journal**. v. 2013, p. 1-9, 2013.

DA SILVA, D.T.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.

DE OLIVEIRA, K. R.; MUNARETTO, P. Uso racional de antibióticos: responsabilidade de prescritores, usuários e dispensadores. **Revista Contexto e Saúde**, v. 10, n. 18, p. 43-51, 2013.

DHANAWADE, N.B.; KALOREY, D.R.; SRINIVASAN, R.; BARBUDDHE S.B.; KURKURE, N.V. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **Veterinary Research Communications**. v.34, p.81–89, 2010.

DIAZ, M.A.N.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, D. M.; RIBON, A. D. O.; AGUILAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.5, p. 724-728, 2010.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINOB, A.R.; PALUDI, D.; ZANARDIA, E.; GHIDINIA, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, v. 50, p. 930-936, 2015.

DIMECH, G.S.; SOARES, L.A.L.; FERREIRA, M.A.; DE OLIVEIRA, A.G.V.; CARVALHO, M. DA C.; XIMENES, E.A. Phytochemical and Antibacterial Investigations of the Extracts and Fractions from the Stem Bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and Effect on Ultrastructure of *Staphylococcus aureus* Induced by Hydroalcoholic Extract. **The Scientific World Journal**, p.1-8, 2013.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23, n.1, p.160-201, 2010.

EBRAHIMI A.; SOLEIMANI F.; MOATAMEDI A.; SHAMS, N.; LOTFALIAN, S. Study on some characteristics of Staphylococci isolated from sheep sub clinical mastitis milk in Shahrekord, Iran. **Biological Journal of Microorganism**, v.2, n.8, p.57-62, 2014.

FAN W., QIAN S., QIAN P., LI X. Antiviral activity of luteolin against Japanese encephalitis virus. **Virus Research**, v.220, p.112-116, 2016.

FERNANDES, M. R. V.; FERNANDES, M.R.; AZZOLINI, A.E.; MARTINEZ, M.L.; SOUZA, C.R.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; OLIVEIRA, W.P. Assessment of Antioxidant Activity of Spray Dried Extracts of *Psidium guajava* Leaves by DPPH and Chemiluminescence Inhibition in Human Neutrophils. **BioMed Research International**. p.10, 2014.

FERNANDES, T. G.; DE MESQUITA, A. R. C.; RANDAU, K. P.; FRANCHITTI, A. A.; XIMENES, E. A. *In vitro* synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **The Scientific World Journal**, p.1-7, 2012.

FLEMMING H.-C.; WINGENDER J.; KJELLEBERG S.; STEINBERG P.D.; RICE S.A. and SZEWZYK U. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v.14, n.9, p.563-75. 2016.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.623-633, 2010.

FONTANA, V.L.D.S.; GIANNINI, M.J.S.M.; LETFE, C.Q.F.; MIRANDA, E.T.; ALMEIDA A.M.F.; FONTANA C.A.P.; SOUZA C.M. e STELLA A.E. 2010. Etiology of bovine subclinical mastitis, susceptibility of the agents to antimicrobial drugs and detection of the gene β -lactamasis in *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**. v.17, p.552-559, 2010.

FOSTER, T.J.; GEOGHEGAN, J.A.; GANESH, V.K.; HOEOEK, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49, 2014.

FREY, Y.; RODRIGUEZ, J.P.; THOMANN, A.; SCHWENDENER, S.; PERRETEN, V. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 4, p. 2247-2257, 2013.

GAO, J.; FERRERI, M.; YU, F.; LIU, X.; CHEN, L.; SU, J.; HAN, B. Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China. **The Veterinary Journal**, v. 192, n. 3, p. 550-552, 2012.

GARO, L.; ELDRIDGE, G.R.; GOERING, M.G.; DELANCEY PULCINI, E.; HAMILTON, M.A.; COSTERTON, J.W.; JAMES, G.A. Asiatic acid and corosolic acid enhance the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to tobramycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.5, p.1813–1817, 2007.

GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; PIOCHON-GAUTHIER, M.; PICHETTE, A. Advances in the synthesis and pharmacological activity of lupane-type triterpenoid saponins. **Phytochemistry Reviews**, v.10, n.4, p.521-544, 2011.

GÓMEZ, P.; GONZÁLEZ-BARRIO, D.; BENITO, D.; GARCÍA, J. T.; VIÑUELA, J.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-FONS, F.; TORRES, C. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in wild small mammals in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 8, p. 2061-2064, 2014.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta de Novos Agentes. **Química Nova**, v.33, n.3, p.667-679, 2010.

HARAN K. P.; GODDEN S. M.; BOXRUD D.; JAWAHIR S.; BENDER J. B.; SREEVATSAN S. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, p. 688 – 695, 2012.

HASSAN, A.; USMAN, J.; KALEEM, F.; OMAIR, M.; KHALID, A.; IQBAL, M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.15, n.4, p.305-311, 2011.

HASSAN, W.H.; HATEM, M.E.; ELNWARY, H.A.; SEDIEK, S.H. Characterization of antimicrobial resistant bacterial pathogens recovered from cases of bovine mastitis with special reference to *Staphylococcus aureus*. **Journal Veterinary Medicine and Research**. v.23, n.1, p.101-111, 2016.

HAVERI, M.; SUOMINEN, S.; RANTALA, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; PYÖRÄLÄ, S. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. **Veterinary microbiology**, v. 106, n. 1, p. 97-102, 2005.

HOIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, t. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. **Future Microbiology**, v.5, n.11, p.1663-1674, 2010.

HU, W.; XU, T.; WU, P.; CHEN, J.P.; ZHANG, B.; ZHU, H.; LI, D. Luteolin improves cardiac dysfunction in heart failure rats by regulating sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2a. **Scientific Reports**, v.7, p.1-16, 2017.

HUANG, J.M.; WANG, X.G.; JIANG, Q.; SUN, Y.; YANG, C.H.; JU, Z.H.; HAO, H.S.; WANG, C.F.; ZHONG, J.F.; ZHU, H.B. Identification of CD14 transcript in blood

polymorphonuclear neutrophil leukocytes and functional variation in Holsteins. **Genetics and Molecular Research**. v.15, n.2, p.1-10, 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2016. Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br/ibge-abate-de-bovinos-cresce-90-relatorio/> Acesso em: 14 de fev. de 2018.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2018. Disponível em: <https://www.sna.agr.br/ibge-producao-de-leite-totalizou-33-5-bilhoes-de-litros-em-2017-com-queda-de-05-em-relacao-a-2016/> Acesso em: 13 de fev. de 2019.

IM, E.; YEO, C.; LEE, E. Luteolin induces caspase-dependent apoptosis via inhibiting the AKT/osteopontin pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep-1 cells. **Life Sciences**, v.209, p. 259-266, 2018.

JACQUES, M.; ARAGON, V.; TREMBLAY, Y.D.N. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. **Animal Health Research Reviews**, v.11, n.2, p.97–121, 2010.

JAIN, A.; AGARWAL, A. Biofilm Production, a Marker of Pathogenic Potential of Colonizing and Commensal Staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, v.76, p.88-92, 2009.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DADRASNIA, A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, p. 383-388, 2015.

JOHLER S.; LAYER F.; STEPHAN R. Comparison of virulence and antibiotic resistance genes of food poisoning outbreak isolates of *Staphylococcus aureus* with isolates obtained from bovine mastitis milk and pig carcasses. **Journal of Food Protection**. v.74, p.1852 – 1859, 2011.

KATEETE D, KIMANI C, KATABAZI F, OKENG A, OKEE M, NANTEZA A, JOLOBA M, NAJJUKA F: Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.9, n.1, p.23-29, 2010.

KLOCKE, P.; IVEMEYER, S.; BUTLER, G.; MAESCHLI, A.; HEIL F. A randomized controlled trial to compare the use of homeopathy and internal Teat Sealers for the prevention of mastitis in organically farmed dairy cows during the dry period and 100 days post-calving. **Homeopathy**. v.99, n.2, p.90-98. 2010.

KONOPKA, A. What is microbial community ecology? **ISME Journal**, v.3, n.11, p.1223-1230, 2009.

KOURTESI, C.; BALL, A.R.; HUANG, Y.Y.; JACHAK, S.M.; VERA, D.M.; KHONDKAR, P.; GIBBONS, S.; HAMBLIN, M.R.; TEGOS, G.P. Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug 95 discovery and the challenge of clinical implementation. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, p. 34–52, 2013.

KREWER, C.C.; LACERDA, I.P.D.S.; AMANSO, E.S.; CAVALCANTE, N.B.; PEIXOTO, R.D.M.; PINHEIRO-JÚNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.5, p.601-606, 2013.

KULKARNI, A.G.; KALIWAL, B. Bovine mastitis: a review. **International Journal of Recent Scientific Research**. v.4, n.5, p.543-548. 2013.

KUMAR, S., VARELA, M. F. Molecular Mechanisms of bacterial Resistance to antimicrobial Agents. **Microbial Pathogens and strategies for Combating Them: Science, technology and education**, Formatex, p. 522-534, 2013.

LEE, J.H.; CHO, M.H.; LEE, J. 3-indolylacetonitrile decreases *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Environmental Microbiology**, v.13, n.1, p.62-73, 2011.

LEE, YOUNG-SOO; JANG, KYEUNG-AE; CHA, JEONG-DAN. Synergistic Antibacterial Effect between Silibinin and Antibiotics in Oral Bacteria. **Journal of Biomedicine and Biotechnolog**, v. 2012, 07 p., 2012.

LEWIS, K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 211, p. 121-133, 2012.

LIM, S.K.; NAM, H.; JANG, G.; LEE, H.; JUNG, S.; KIM, T. Transmission and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk, environment and workers in dairy cattle farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n.8, p.731-736, 2013.

LI, H.; WANG, X.; ZHANG, Y.; ZHAO, C.; HONGBIN, C.; JIANG, S.; ZHANG, F.; WANG, H. The role of RND efflux pump and global regulators in tigecycline resistance in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. **Future Microbiology**. v.10, n.3, p.337-46, 2015.

LIN, M.F.; LIN, Y.Y.; LAN, C.Y. The role of the two-component system BaeSR in disposing chemicals through regulating transporter systems in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS One**. v.10, n.7, p.1-15, 2015.

LOPES, M.A.; F.A. DEMEU; G.M. DA COSTA, C.M.B.M. DA ROCHA; L.R. DE ABREU, G DOS SANTOS. A. Franco Neto. Influência da contagem de células somáticas sobre o impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos Do Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 493- 499, 2011.

MACEDO, L.; FERNANDES, T.; SILVEIRA, L.; MESQUITA, A.; FRANCHITTI, A.A.; XIMENES, E.A. β -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**, v. 21, n. 1, p. 25-29, 2013.

MADSEN, J.S.; BURMOLLE, M.; HANSEN, L.H.; SORENSEN, S.J. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.65, n.2, p.183-195, 2012.

MAHESHWARI, MEENU; AHMAD, IQBAL; ALTHUBIANI, ABDULLAH SAFAR. Multidrug resistance and transferability of *bla* CTX-M among extended-spectrum β -lactamase producing enteric bacteria in biofilm. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 6, p. 142-149, 2016.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Bovinos e bubalinos. 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-ebubalinos>> Acesso em 27 de set. 2015.

MARQUES, V.F.; SOUZA, M.M.S. de; MENDONÇA, E.C.L. de; ALENCAR, T.A. de; PRIBUL, B.R; COELHO, S. de M. de O.; LASAGNO, M.; REINOSO, E.B. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.2, p.161-170, 2013.

MARTI, M.; TROTONDA, M. P.; TORMO-MAS, M. A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; CHEUNG, A. L.; LASA, I.; PENADES, J. R. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Microbes and Infection**, v. 12, n.1, p. 55-64, 2010.

MARTINS, M.; MCCUSKER, M.P.; VIVEIROS, M.; COUTO, I.; PAGÈS, J.; AMARAL, L. A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. **Open Microbiol Journal**. v.7, p.1–5, 2013.

MARTÍNEZ J.L.; BAQUERO F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. **Uppsala Journal of Medical Science**, v.119, n.2, p.68–77, 2014.

MCCALLUM N.; BERGER-BACHI B.; SENN M. M. Regulation of anti-biotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 300, p.118 – 129, 2010.

MELCHIOR, M.B.; FINK-GREMMELS, J.; GAASTRA, W. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. **Veterinary Microbiology**, v.125, n.1-2, p.141–149, 2007.

MELO, P.C.; FERREIRA, L.M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L.F.; VICENTE, H.I.G. Phenotypic and molecular analysis of biofilm production by *Staphylococcus aureus* strains isolated of bovine mastitis case. **Bioscience Journal**. v.28, n.1, p.94-99, 2012.

MERINO N.; TOLEDO-ARANA A.; VERGARA-IRIGARAY M.; VALLE J.; SOLANO C.; CALVO E.; LOPEZ, J.A.; FOSTER, T.J.; PENADES, J.R.; LASA, I. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**. v.191, p.832–843, 2009.

MILLEZI, A.F.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E.; PICCOLI, R.H. Reduction of *Aeromonas hydrophyla* biofilm on stainless steel surface by essential oils. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, (in press), 2013.

MIR, A.Q.; BANSAL, B.K.; GUPTA, D.K. Subclinical mastitis in machine milked dairy farms in Punjab: prevalence, distribution of bacteria and current antibiogram. **Veterinary World**. v.7, p.291-294, 2014.

MIRANDA, J.A.L.; ROCHA, J.A.; ARAÚJO, K.M.; QUELEMES, P.V.; MAYO, S.J.; ANDRADE, I.M. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, supl. 3, p.1142-1149, 2015.

MOHAMMADI, S.; SEKAWI, Z.; MONJEZI, A.; MALEKI, M.; SOROUGH, S.; SADEGHIFARD, N.; PAKZAD, I.; AZIZI-JALILIAN, F.; EMANEINI, M.; ASADOLLAHI, K.; POURAHMAD, F.; ZARRILLI, R.; TAHERIKALANI, M. Emergence of SCCmec type III with variable antimicrobial resistance profiles and spa types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from healthcare and community-acquired infections in the west of Iran. **International Journal of Infectious Diseases**, v.25, p.152-158, 2014.

MORENO, M.A.; ZAMPINI, I.C.; COSTAMAGNA, M.; SAYAGO, J.E.; ORDOÑEZ, R.M.; ISLA, M.I. Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of *Psidium guajava* Fresh Fruits and Flour. **Food and Nutrition Sciences**, v.5, n.8, p.725-732, 2014.

MOURA, F.M.L.; BAPTISTA, R.I.A.A.; SANTOS, V.V.M.; MOURA, A.P.B.L.; COSTA, M.M. Utilização de plantas do bioma caatinga no controle de patógenos de interesse na área de alimentos – uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.125-136, 2013.

NAM, H. M.; LEE, A.L.; JUNG, S.C.; KIM, M.N.; JANG, G.C.; WEE, S.H.; LIM, S.K. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. **Foodborne pathogens and disease**, v. 8, n. 2, p. 231-238, 2011.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2002. RESEARCH ON MICROBIAL BIOFILMS. Available from: <http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html> (accessed june 2017).

NEGRI, G.; TABACH, R. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.23, n.6, p.851-860, 2013.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A.S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A.; PIZZIMENTI, F.C.; CIONI, P.L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A.R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, n.4, p.519-23, 2007.

O'GARA, J. P. *ica* and Beyond: Biofilm Mechanisms and Regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.270, n.2, p.179-188, 2007.

OKONKWO, C. J.; NJOKU, O. U.; OKONKWO, T. J.; AFIEROHO, O. E.; e PROKSCH, P. Two new acylated flavonol glycosides from *Mimosa pigra* L. leaves sub-family Mimosoideae. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 71-75, 2016.

OKORO, I.O.; OSAGIE, A.; ASIBOR, E.O. Antioxidant and antimicrobial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.20, p.2989–2993, 2010.

OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S. SILVA, A.E.; FARIAS, Y.J.M.D.; DAMASCENO, C.A.R.; BRITO, P.D.; QUEIROZ, S.A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FREITAS, C.I.A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.12, n.3, p.302-310, 2010.

OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.466-476, 2007.

OLIVEIRA, L. M. B.; MACEDO, I.T.F.; VIEIRA, L.S.; CAMURÇA VASCONCELOS, A.L.F.; TOMÉ, A.R.; SAMPAIO, R.A.; LOUVANDINI, H.; BEVILAQUA, C.M.L. Effects of *Mimosa tenuiflora* on larval establishment of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, vol.196, n.3-4, p.341-346, 2013.

ORÚS, P.; GOMEZ-PEREZ, L.; LERANOZ, S.; BERLANGA, M. Increasing Antibiotic Resistance in Preservative-Tolerant Bacterial Strains Isolated from Cosmetic Products. **International Microbiology**, n.18, p. 51-59, 2015.

OTTER, J. A.; FRENCH, G. L. Molecular epidemiology of community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **Lancet Infectious Diseases**, v.10, n.4, p.227–239, 2010.

PADILHA, I.Q.M.; PEREIRA, A.V.; RODRIGUES, O.G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; PEREIRA, M.S.V. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. from northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, vol.20, n.1, p.45-47, 2010.

PAIVA, D.C.; C.A.ZZI, DA FALCÃO. Efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos do extrato hidroalcoólico da casca interna de *Pseudobombax marginatum* da Caatinga Potiguar **journal of Ethnopharmacoly**. v.149, p. 416 – 442, 2013.

PANTOJA, J. C. F.; REINEMANN, D.; RUEGG, P. L. Associations among milk quality indicators in raw bulk milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.10, p. 4978-4987, 2009.

PAREKH, J.; CHANDA, S.V. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turkish Journal of Biology**, v. 31, p. 53-58, 2007.

PEIXOTO, R.M.; SILVA, W.E.L.; ALMEIDA, J.R.G.S.; BRANCO, A.; COSTA, M.M. Potencial antibacteriano de plantas nativas do bioma caatinga frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite em pequenos ruminantes. **Revista Caatinga**, v.29, n.3, p.758-763, 2016.

PEREIRA, A.V.; AZEVÊDO, T.K.B.; SANTANA, G.M.; TREVISAN, L.F.A.; HIGINO, S.S.S.; MARIA REGINA MACÊDO-COSTA, M.R.; PEREIRA, M.S.V.; AZEVEDO, S.S. Análise da atividade antimicrobiana de taninos totais de plantas aromáticas do Nordeste brasileiro. **Revista Agropecuária Técnica-AGROTEC**, v. 36, n. 1, p. 109-114, 2015.

PICOLI, T; ZANI, J L; DA SILVA BANDEIRA, F; BÜTTOW ROLL, V F; ROCHA RIBEIRO, M E; D'ÁVILA VARGAS, G; OLIVEIRA HÜBNER, S; DE LIMA, M; ARAÚJO MEIRELES, M C; FISCHER, G. Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de microrganismos em leite cru. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.4, p.2471-2480, 2014.

PITKALA, A.; SALMIKIVI, L.; BREDBACKA, P.; MYLLYNIEMI, A.L.; KOSKINEN M.T. Comparison of tests for detection of beta-lactamase-producing staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.6, p.2031-2033, 2007.

PRAKASH, P. H.; RAJAN, V.; GOPAL, S. Predominance of SCCmec types IV and V among biofilm producing device-associated *Staphylococcus aureus* strains isolated from tertiary care hospitals in Mysuru, India. **Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica (English ed.)**, v. 35, n. 4, p. 229-235, 2017.

Queiroz et al. **Leguminosae**. In: GIULIETTI et al (Orgs). Plantas raras do Brasil. Belo Horizonte: conservação internacional, 2009. P.212-237.

RABIN, N.; ZHENG, Y.; OPOKU-TEMENG, C.; DU, Y.; BONSU, E.; SINTIM, H.O. Agents that inhibit bacterial biofilm formation. **Future Medicinal Chemistry**, v.7, n.5, p.647-671, 2015.

RASZEK, M.; GUAN, L.L.; PLASTOW, G.S. Use of genomic tools to improve cattle health in the context of infectious diseases. **Frontiers in Genetics**. v.7, p.1-15, 2016.

REIS, C.B.M; BARREIRO, J.R.; MESTIERI, L.; PORCIONATO, M.A.F.; SANTOS, M.V. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. **BMC Veterinary Research**, v.9, n.67, p. 1-7, 2013.

RENDUELES, O.; GHIGO, J.M. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors, **FEMS Microbiology. Reviews**, v.36, n.5, p.972-989, 2012.

RIBEIRO, M.; MONTEIRO, F.; FERRAZ, M. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. **Biomatter**, v.2, n.4, p.176-194, 2012.

RIBEIRO, W. O.; OLIVEIRA, R. L.; MARTINS, M. L.; MARTINS, J.M.; ARCANJO, A.H.M.; ALMEIDA NETO, O.B. Enumeração de microrganismos causadores da mastite bovina e estudo da ação de antimicrobianos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n.1, p. 45-52, 2014.

RIVERA-ARCE, E.; GATTUSO, M.; ALVARADO, R.; ZÁRATE, E.; AGÜERO, J.; FERIA, I.; LOZOYA, X. Pharmacognostical studies of the plant drug *Mimosa tenuiflora* cortex. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 400-408, 2007.

RIVERA-ARCE, E.; CHÁVEZ-SOTO, M.A.; HERRERA-ARELLANO, A.; ARZATE, S.; AGÜERO, J.; FERIA-ROMERO, I.A.; CRUZ-GUZMÁN, A.; LOZOYA, X. Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n.3, p. 523-528, 2007.

RODRIGUES, C.G.; FERREIRA P.R.B.; OLIVEIRA C.S.M.; JÚNIOR R.R.; VALÉRIO H.M.; BRAMDI I.V.; OLIVEIRA D.A. Antibacterial activity of tannins from *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plant Research**, v.8, n. 35, p.1095-1100, 2014.

ROSENGREN, A.; FABRICIUS, A.; GUSS, B.; SYLVEN, S.; LINDQVIST, R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 2, p. 263-269, 2010.

ROVAI, M.; CAJA, G.; SALAMA, A.A.K.; JUBERT, A.; LÁZARO, B.; LÁZARO, M. e LEITNER, G. Identifying the major bacteria causing intramammary infections in individual milk samples of sheep and goats using traditional bacteria culturing and real-time polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.9, p.5393-5400, 2014.

SALIMENA, A.P.S. Formação de biofilme na indústria de alimentos por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Ces Revista**. v. 28, n. 1. p. 88-102, 2014.

SAMPAIO, P.S.; SANCHO, L.G.; DO LAGO, R.F. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Cadernos Saúde Coletiva**, v.26, n.1, p.15-22, 2018.

SAMUELS, T.L.; PEARSON, A.C.; WELLS, C.W.; STONER, G.D. e JOHNSTON, N. (2013). Curcumin and anthocyanin inhibit pepsin-mediated cell damage and carcinogenic changes in airway epithelial cells. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.122, n.10, p.632 – 641, 2013.

SANDASI, M.; LEONARD, C. M.; VILJOEN, A. M. The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. **Letters in applied microbiology**, v. 50, n. 1, p. 30-35, 2010.

SANTOS, J.C.; LEAL, I.R.; ALMEIDA-CORTEZ, G.W.; FERNANDES J.S. Tabarelli. Caatinga: The scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**, v.4, p. 276-28, 2011.

SANTOS, J.K.; BARROS, L.S.S.; MEDEIROS, E.S.; SILVA, T.M.S.; SOARES, K.D.A.; SILVA, A.E. Phenotypic characterization of biofilm and antimicrobial resistance of coagulase positive staphylococci present in pasteurized milk under state inspection. **Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanitary**. v.12, n.2, p.190-197, 2018.

SANTURIO, J.M.; SANTURIO, D.F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P.R.; ALVES, S.H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p. 803-808, 2007.

SATORRES, S. E.; ALCARÁZ, L. E. Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. **Central European Journal of Public Health**, v. 15, n. 2, p. 87-90, 2007.

SAWANT, A.A.; GILLESPIE, B.E.; OLIVER, S.P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Veterinary Microbiology**, v.134, n.1-2, p.73-81, 2009.

SCHIAVON, D.B.A.; SCHUCH, L.F.D.; OYARZABAL, M.E.B.; PRESTES, L.S.; ZANI, J.L.; HARTWIG, C.A. Aplicación de plantas medicinales para la antisepsia de pezones de vacas posordeño. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.16, n.3, p.12, 2011.

SCHIESARI JUNIOR, A.; BENTO, A.M.; E SILVA, A.C.M.A.A.; XAVIER, C.M.; BLUM, R.F.P. Infections caused by biofilm forming bacteria: a brief review. **Revista Brasileira de Medicina Interna**, v.2, n.1, p.37-47, 2015.

SCHUCH, L.F.D.; WIEST, J.M.; COIMBRA, H.S.; PRESTES, L.S.; TONI, L.; LEMOS, J.S. Cinética da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**. v.9, n.1, p.161-169, 2008.

SCHVARZ, D. W.; SANTOS, J. M. G. Mastite Bovina em Rebanhos Leiteiros: Ocorrência e Métodos de Controle e Prevenção. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**. v.5, n.3, p. 453-473, 2012.

SEGATORE, B.; BELLIO, P.; SETACCI, D.; BRISDELLI, F.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.A.; NICOLETTI, M.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.; CELENZA, G. *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. **Phytomedicine**, v. 19, p. 341-347, 2012.

SEO, J.; LEE, S.; ELAM, M.L. JOHNSON, S.A.; KANG, J.; ARJMANDI, B.H. Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. **Food Science & Nutrition**, v.2, n.2, p.174-180, 2014.

SHAMILA-SYUHADA, A. K.; RUSUL, G.; WAN-NADIAH, W. A.; e CHUAH, L. O. Prevalence and Antibiotics Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolates Isolated from Raw Milk Obtained from Small-Scale Dairy Farms in Penang, Malaysia. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 36, n. 1, p. 98-102, 2016.

SHEN, X.; REN, L.; TENG, Y.; ZHENG, S.; YANG, X.; GUO, X.; WANG, X.; SHA, K.; LI, N.; XU, G.; TAN, H.; WANG, X.; LIU, X.; LI, J.; HUANG, N. Luteolin decreases the attachment, invasion and cytotoxicity of UPEC in bladder epithelial cells and inhibits UPEC biofilm formation. **Food and Chemical Toxicology**, v.72, p.204-211, 2014.

SHI, D.; HAO, Y.; ZHANG, A.; WULAN, B.; FAN, X. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.57, n.4, p.221-224, 2010.

SILVA, A.G.; SILVA, L.C.N.; BEZERRA FILHO, C.M.; ARAÚJO, D.R.C.; SILVA, J.F.V.; ARRUDA, I.R.; ARAÚJO, J.M.; CORREIA, M.T.S.; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V. Antimicrobial activity of medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil. **Current Topics in Phytochemistry**. v.11, p.81-94, 2012.

SILVA, A.M.; SILVA, J.C.S.; SILVA, L.K.M.; OLIVEIRA, A.R.N.; MOURA, D.M.F. Conjuntura da pecuária leiteira no Brasil: Bovinocultura leiteira, cadeia produtiva, agronegócio. **Nutritime**, v.14, n.1, p.4954-4958, 2017.

SILVA, J.G.; ALCÂNTARA, A.M.; MOTA, R.A. Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n.2, p.223-228, 2018.

SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana de extrato de *Anacardium occidentale* Linn em amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n.4, p. 572-577, 2007.

SILVA, M.J.D.; ENDO, L.H.; TRANCOS DIAS, A.L.L.; SILVA, A.G.; SANTOS, M.A.; SILVA. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Mimosaceae) **Revista Ciências, Fazenda Básica Aplicada**. v.33, n.2, p. 267 – 274, 2012.

SILVA, S.; COSTA, E.M.; CALHAU, C.; MORAIS, R.M.; PINTADO, M.E. Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.57, n.14, p.3072-3083, 2017.

SILVA, V. A.; GONÇALVES, G. F.; PEREIRA, M. S.; GOMES, I. F.; FREITAS, A. F.; DINIZ, M. F.; PESSÔA, H. L. Assessment of mutagenic, antimutagenic and genotoxicity effects of *Mimosa tenuiflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.23, n.2, p.329-334, 2013.

SIMÕES C. M. O., SCHENKEL E. P., GOSMANN G., MELLO J. C. P., MENTZ L. A., PETROVICK P. R. (Orgs). 2010. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 1104p.

SINGER, G.; BESEMER, K.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; HÖDL, I.; BATTIN, T.J. Physical heterogeneity increases biofilm resource use and its molecular diversity in stream mesocosms. **PLoS One**, v.5, n.4, p.1-11, 2010.

SOHN, D.W.; BAE, W.J.; KIM, H.S.; KIM, S.W.; e KIM, S.W. The anti-inflammatory and antifibrosis effects of anthocyanin extracted from black soybean on a Peyronie disease rat model. **Urology**, v.84, n.5, p.1112 – 1116, 2014.

SOUZA, R. S. O. D.; ALBUQUERQUE, U. P. D.; MONTEIRO, J. M.; AMORIM, E. L. C. D. Jurema preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a Review of its Traditional Use, Phytochemistry and Pharmacology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, n.5, p.937-947, 2008.

SUN, D.D.; MA, X.X.; HU, J.; TIAN, Y.; PANG, L.; SHANG, H.; CUI, L.Z. Epidemiological and molecular characterization of community and hospital acquired *Staphylococcus aureus* strains prevailing in Shenyang, Northeastern China. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.17, n.6, p.682-690, 2013.

SYTAR, O.; HEMMERICH, I.; ZIVCAK, M.; RAUH, C.; BRESTIC, M. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p.1-11, 2016.

TEIXEIRA, J. P.; SILVA, N.; FONSECA, L. M.; COSTA, G. M. Uso de PCR Duplex para detecção dos genes *femA* e *mecA* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.73, n.3, p.272-279, 2014.

THAKUR, N.; ARYA, V. Preliminary Phytochemical Analysis of the Extracts of *Psidium* Leaves. **Journal of Scientific Research**, v.19, n.11, p.1421-1424, 2014.

TRENTIN, D. DA S.; GIORDANI, R.B.; ZIMMER, K.R.; DA SILVA, A.G.; DA SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.; BAUMVOL, I.J.; MACEDO, A.J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semiarid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**. v.137, n.1, p.327-335, 2011.

VAN HOEK, A. H. A. M.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A. P.; AARTS, H. J. M. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**, v.2, n.203, p.1-27. 2011.

VASUDEVAN, P.; Nair, M.K.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.179-185, 2003.

VERT, M.; DOI, Y.; HELLWICH, K.H.; HESS, M.; HODGE, P.; KUBISA, P.; RINAUDO, M.; SCHUÉ, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v.84, n.2, p. 377-410, 2012.

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

ZADOKS, R.N.; TASSI, R.; MARTIN, E.; HOLOPAINEN, J.; MCCALLUM, S.; GIBBONS, J.; BALLINGALL, K.T. Comparison of bacteriological culture and PCR for detection of bacteria in ovine milk-Sheep are not small cows. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.10, p.6326-6333, 2014.

ZUNIGA, E.; SAIDENBERG, A.B.S.; BRACONARO, P.; SALABERRY, S.R.S.; MELVILLE, P.A.; LAES, M.A.; BENITES, N.R. "Analysis of somatic cell count of *Staphylococcus* spp. associated with virulence factors isolated from bovine subclinical mastites. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 2, p.52-54, 2013.

XING, L.; AMOAH BARNIE, P.; SU, Z.; XU, H. Development of Efflux Pumps and Inhibitors (EPIs) in *A. baumannii*. **Clinical Microbiology**. v.3, n.1, p.1-6, 2014.

WADE, K.A.; POUNDER, J.I.; CLOUD, J.L.; GAIL L. Woods Comparison of Six Methods of Extracting Mycobacterium tuberculosis DNA from Processed Sputum for Testing by Quantitative Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.2471-2473, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. 1996. **Plant drug analysis**. New York: Springer Verlag, 2.ed.

WANGENSTEEN, H.; DIALLO, D.; PAULSEN, B.S. Medicinal plants from Mali: Chemistry and biology. **Journal of Ethnopharmacology**, v.176, p.429-437, 2015.

WU, X.; WANG, Y.; TAO, L. Sulfhydryl compounds reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation by inhibiting PIA biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v.316, n.1, p.44–50, 2011.

YANG, S.; CHEN, P.; CHANG, S.; WENG, Y.; CHANG, F.; CHANG, K.; CHEN, C.; KAO, T.; HWANG, T. Luteolin attenuates neutrophilic oxidative stress and inflammatory arthritis by inhibiting Raf1 activity. **Biochemical Pharmacology**, v.154, p.384-396, 2018.

ANEXOS

Anexo I

Applied Microbiology and Biotechnology

Evaluation of the synergistic effect of the ethanolic extract of *Mimosa tenuiflora* against bovine milk *Staphylococcus aureus* .

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Evaluation of the synergistic effect of the ethanolic extract of <i>Mimosa tenuiflora</i> against bovine milk <i>Staphylococcus aureus</i> .
Article Type:	Original Article
Section/Category:	Applied microbial and cell physiology
Corresponding Author:	Marielly Bastos Cavalcante Universidade Federal Rural de Pernambuco BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal Rural de Pernambuco
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Marielly Bastos Cavalcante
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Marielly Bastos Cavalcante Renata de Moraes Peixoto Araújo Noelly Bastos Cavalcante Dielson da Silva Vieira Tania Maria Sarmiento da Silva Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida Mateus Matiuzzi da Costa
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Currently, a high number of <i>Staphylococcus aureus</i> infections have become increasingly persistent and many antibiotics that have been used in the treatment of mastitis have become less effective or even ineffective for this resistant bacterium. In this way, the development of new therapies, efficient and of lower cost, is extremely necessary. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial effect as well as the synergistic effect of the <i>Mimosa tenuiflora</i> ethanolic extract against <i>S. aureus</i> from bovine milk. Were used fifty-eight bacterial isolates from the bacterioteca of the Laboratory of Microbiology and Animal Immunology of the Universidade Federal do Vale do São Francisco. All these isolates were obtained from a research carried out by Araújo et al. (2017). A phenotypic test was performed in microplates to analyze the antimicrobial test to evaluate the minimal bactericidal concentration (MBC) as well as the effect of the association of the ethanolic extract of <i>M. tenuiflora</i> with oxacillin against <i>S. aureus</i> . In the phenotypic test in microplates, the antimicrobial activity of the extract was observed in 100% of the isolates. In combination with oxacillin, it was observed that MBC for extract was 32 times lower for all isolates, showing a 96.87% reduction of the MBC value. For oxacillin, the mean MBC reduction value was 86%. In conclusion, the ethanolic extract presented antimicrobial activity for all <i>S. aureus</i> isolates tested. The MBC concentrations of the extract and oxacillin presented an expressive reduction, showing a synergistic effect when both were tested in association.
Suggested Reviewers:	Catherine Boccadoro

	International Research Institute of Stavanger. mari-cavalcante@hotmail.com Acting in the area of microbiology
	Fábio Luis da Silva Faria Oliveira Universidade Federal de Ouro Preto. mari-cavalcante@hotmail.com Acting in the area of microbiology
	Santiago Martin Lattar Universidade de Sao Paulo mari-cavalcante@hotmail.com Acting in the area of microbiology
	Juan Josue Puño Sarmiento Universidade Estadual de Londrina mari-cavacante@hotmail.com Acting in the area of microbiology
Opposed Reviewers:	

Anexo II

Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials

Evaluation of the antibiofilm activity of the ethanolic extract of *Mimosa tenuiflora* against bovine milk *Staphylococcus aureus*

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	CMAM-D-19-00005
Full Title:	Evaluation of the antibiofilm activity of the ethanolic extract of <i>Mimosa tenuiflora</i> against bovine milk <i>Staphylococcus aureus</i>
Article Type:	Research
Funding Information:	
Abstract:	<p>Background</p> <p><i>Staphylococcus</i> spp. with the ability to form biofilms are increasingly recognized for causing persistent intramammary infections, protecting them from the action of antibiotics, as well as harming the animal's health and affecting public health. The search for alternatives to inhibit the development of biofilms is fundamental, especially when using plants with therapeutic potential. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm effect of the crude ethanolic extract of <i>Mimosa tenuiflora</i> against biofilm producing <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>Methods</p> <p>Fifty-five <i>Staphylococcus aureus</i> isolates were used from the microbiology laboratory of the Laboratory of Microbiology and Animal Immunology of UNIVASF - Agrarian Sciences Campus. All these isolates were obtained from research conducted by Araújo et al. (2017). A phenotypic test was performed in microplates to analyze the biofilm production as well as the antimicrobial test to identify the minimum bactericidal concentration (MBC) and antibiofilm test, both using the crude ethanolic extract of <i>Mimosa tenuiflora</i>.</p> <p>Results</p> <p>In the phenotypic test in microplates, all the isolates produced biofilm. The antimicrobial activity of the vegetal extract was observed in 100% of the isolates. Regarding the antibiofilm effect, the extract was effective only during the formation of the biofilm, showing no effect when it was already consolidated. There are few studies regarding the potential of plants against the formation of bacterial biofilm and, from these results, it is possible to consider the ethanolic extract of <i>Mimosa tenuiflora</i> as an important therapeutic alternative being promising in the fight against biofilm forming <i>S. aureus</i>.</p> <p>Conclusions</p> <p>All <i>Staphylococcus aureus</i> used in this study are capable of producing biofilm. The ethanolic extract presented antimicrobial activity on all the isolates, showing action against biofilm that is still in formation; but is not effective against consolidated biofilm.</p>
Corresponding Author:	Marielly Bastos Cavalcante Universidade Federal Rural de Pernambuco BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal Rural de Pernambuco
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Marielly Bastos Cavalcante
First Author Secondary Information:	

Order of Authors:	Marielly Bastos Cavalcante
	Renata de Moraes Peixoto Araújo
	Noelly Bastos Cavalcante
	Dielson da Silva Vieira
	Mateus Matiuzzi da Costa
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Is this study a clinical trial?<hr><i>A clinical trial is defined by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes'.</i>	No